

ХРОМАТОГРАФИЯ  
НА БУМАГЕ



# PAPÍROVÁ CHROMATOGRAFIE

*Redigováni*

*Ivo M. Hais · Karel Macek*

NAKLADATELSTVÍ ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE VĚD

PRAHA 1959

# *ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ*

*Под редакцией*  
*И. М. Хайса и К. Мацека*

*Перевод с чешского*  
Б. М. ВОЛЬФСОНА, Ю. А. МИЩЕНКО, А. П. СЕРГЕЕВА  
и канд. техн. наук Е. Е. ШНАЙДЕРА

*Под редакцией*  
канд. биол. наук М. Н. ЗАПРОМЁТОВА

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ  
Москва 1962

Книга состоит из двух частей — общей и специальной. В общей части дается классификация хроматографических методов разделения веществ и методов проявления хроматограмм, а также краткий вывод основных уравнений теории хроматографии. Большое место уделяется связи между структурой вещества и его хроматографическим поведением. Подробно описываются техника хроматографии на бумаге и методы проявления бумажных хроматограмм.

Рассматриваются физические, химические и биологические методы обнаружения пятен на хроматограммах, способы элюирования отдельных компонентов из хроматограммы и всевозможные методы количественного определения этих компонентов на хроматограмме или после их извлечения. Рассматриваются новейшие физико-химические методы анализа — фотометрический, высокочастотный, потенциометрический, полярографический и др. Обсуждается препаративная хроматография на бумаге и на колонках из целлюлозы.

В специальной части книги рассматриваются случаи конкретного применения хроматографии на бумаге к отдельным веществам, объединенным по общим химическим свойствам (спирты, альдегиды, нитросоединения), биологическим функциям (витамины, инсектициды) или по промышленному назначению (синтетические красители).

Книга предназначена для широкого круга химиков-аналитиков, биохимиков, радиохимиков и специалистов многих других областей.

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемый вниманию читателя перевод книги под редакцией Хайса и Мацека «Хроматография на бумаге» (издание 2-е, Прага, 1959 г.) восполняет существенный пробел в литературе по этому вопросу, имеющейся на русском языке. Интенсивное развитие хроматографического анализа привело к тому, что за последние 10 лет только по хроматографии на бумаге ежегодно публикуется более тысячи оригинальных работ. В связи с этим изданная в 1954 г. монография Блока, Лестранжа и Цвейга «Хроматография на бумаге» в значительной мере потеряла свою ценность и во всяком случае уже не отвечает современному состоянию вопроса.

Нет нужды говорить о том значении, которое приобрел в наши дни метод хроматографии на бумаге в химии и биохимии. Он проник в ряд смежных дисциплин и широко используется в физиологических, ботанических, фармакологических, клинических и других исследованиях. С его помощью открываются новые страницы в химии природных соединений, в изучении сокровеннейших тайн обмена веществ в организме растений и животных.

Капитальный труд, созданный большой группой чехословацких исследователей под общей редакцией Хайса и Мацека, охватывает почти все основные классы органических соединений. После краткого исторического введения, в котором видное место отведено замечательным исследованиям русского ученого Михаила Семеновича Цвета и справедливо подчеркивается, что именно «М. С. Цвета следует считать основоположником хроматографии во всех ее современных направлениях...», излагаются принципы и теоретические основы хроматографии на бумаге (Токштейн, Дворжак и Хайс). В специальном разделе освещается зависимость между строением веществ и их поведением при хроматографировании на бумаге. Далее следует глава, посвященная приготовлению анализируемых растворов, технике нанесения на бумагу (Хайс) и свойствам хроматографических бумаг (Коноп, Мацек и Хайс).

Весьма подробно и с большим знанием дела рассматривается важнейший вопрос о рациональном выборе систем растворителей (Мацек и Прохазка), о самой технике процесса хроматографирования и о возможных причинах искажения формы пятен, появления двойных пятен и других помех и артефактов (Хайс). Отдельно освещаются физические, химические, ферментативные и биологические методы обнаружения пятен анализируемых веществ на хроматограммах, а также способы их элюции с бумаги (Хайс). Методы количественного анализа веществ, разделенных при помощи хроматографии на бумаге, Хайс и Зуман объединяют в две основные группы: методы определения непосредственно на хроматограммах, т. е. *in situ*, и методы, использующие предварительную элюцию веществ с бумаги. В обоих случаях для собственно количественных определений могут быть применены оптические, электрохимические, химические, радиометрические, ферментативные и биологические методы анализа. Общая часть завершается главами, посвященными хроматографии на бумаге радиоактивных веществ (Хайс) и препаративной хроматографии на бумаге и на колонках порошкообразной целлюлозы (Прохазка и Кутачек). Последняя глава представляет особую ценность, поскольку для окончательной идентификации неизвестного соединения, как правило, необходимо выделить его в достаточных количествах.

Специальная часть книги включает 21 главу и составляет значительную часть основного текста. Размеры отдельных глав соответствуют как вниманию, уделяемому изучению данной группы соединений, так и роли, которую играет в этом изучении хроматография на бумаге. В конце каждой главы помещен список литературы, охватывающий публикации до 1956 г. включительно. В некоторых случаях в одну главу попадают вещества, весьма различные по химической природе, но объединяемые по своему биологическому действию (главы «Витамины», «Антибиотики», «Инсектициды») или по техническому применению (глава «Красители»). Отдельные главы специальной части посвящены хроматографии на бумаге аминокислот, пептидов и белков (Хайс, Мелоун и Мацек), причем значительное место уделено вопросу о применении метода для изучения строения последних двух групп соединений. Наиболее крупные главы отведены также хроматографии углеводов (Мацек), неорганических веществ (Какач), стероидов (Сиблюкова), алкалоидов (Мацек), витаминов (Хайс), фенолов и ароматических кислот (Прохазка), алифатических кислот (Мацек и Михалец), азотсодержащих гетероциклов (Мацек, Прохазка, Женишек, Комаркова и Михалец) и пуринов и пиримидинов (Падр).

Большой заслугой авторов является подробное и четкое изложение материала, сопровождаемое многочисленными сводными таблицами и рисунками. Использование книги в качестве настольного руководства значительно упрощается выделением прописей в специальные разделы, помещенные в конце книги. Так, в разделе *D* собраны рецепты приготовления проявителей и наиболее рационального их использования. Раздел *H* включает прописи специальной обработки бумаги перед процессом хроматографирования, а также прописи, касающиеся приготовления растворителей, получения производных, методов количественного анализа и некоторых общих приемов.

За четыре года, прошедшие со времени подготовки книги ко второму чешскому изданию, хроматография на бумаге, естественно, продолжала развиваться бурными темпами. Это развитие шло как по линии совершенствования самого метода, так и в направлении расширения круга анализируемых соединений. Получают распространение ионообменные бумаги, хроматография в тонком слое силикагеля на стеклянных пластинках (*Dünnschichtchromatographie*). Делаются попытки ускорить процесс хроматографирования путем использования центробежных сил (например, «центрифугальный хроматограф», демонстрировавшийся на выставке приборов во время V Международного биохимического конгресса в Москве). Совершенствуются системы растворителей, разрабатываются новые, более специфичные и высоко чувствительные проявители для качественных и количественных определений.

В 1958 г. вышел первый номер международного ежемесячного журнала «*Journal of chromatography*» (Elsevier publishing company, Amsterdam). В нем печатаются обзорные статьи и оригинальные сообщения по хроматографии, причем основное место занимает хроматография на бумаге. Кроме того, в 1959 г. начал выходить ежегодник «*Chromatographic reviews*», помещающий обзоры по важнейшим разделам хроматографии, электрофореза и близким к ним методам. Пользуясь этими изданиями, читатель может получить информацию об успехах, достигнутых в хроматографии на бумаге после выхода в свет книги под редакцией Хайса и Мацека.

*М. Запромёт*

## ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ЧЕШСКОМУ ИЗДАНИЮ

«... Наука движется толчками, в зависимости от успехов, делаемых методикой. С каждым шагом методики вперед мы как бы поднимаемся ступенью выше, с которой открывается нам более широкий горизонт, с невидимыми раньше предметами». Это высказывание академика Павлова прекрасно иллюстрируется ролью, которую играет в науке метод хроматографии на бумаге. Многие новые проблемы, связанные с существованием неизвестных до последнего времени веществ, содержащихся в биологическом материале или в реакционных смесях, не возникли бы, если бы эти вещества нельзя было обнаружить хроматографически. Метод хроматографии на бумаге совместно с использованием соединений, меченных изотопами, сыграл особенно большую роль в биохимии. Применение метода хроматографии на бумаге в органическом синтезе расширилось настолько, что это позволило нам исключить из второго издания популярную статью Прохазки, написанную с целью привлечения внимания химиков-органиков к этому методу.

При выборе материала для данного тома мы руководствовались тем, чтобы читатель имел возможность без особого труда разобраться в тех областях, которые имеют хорошо разработанные методики. Кроме того, мы попытались указать пути, как поступать при хроматографировании других групп веществ. Поэтому необходимо было выбрать из примерно десяти тысяч работ, посвященных хроматографии на бумаге, только те, которые содержат ценные методики или представляют теоретический интерес. Не приводятся способы, которые мы не можем рекомендовать, а также способы, связанные с затруднениями, и методики, не содержащие ничего нового. В отличие от первого издания уменьшено число примеров конкретного применения различных методов. Несколько позже должен выйти в виде отдельного тома библиографический сборник по хроматографии на бумаге, включающий работы до 1956 г. В данном томе мы использовали литературу до конца 1955 г. и лишь небольшое число работ 1956 г. При выборе методик и их критической оценке невозможно было избежать субъективного подхода. Для сокращения количества ссылок мы часто не упоминаем авторов некоторых обычных методик, поскольку в подобных случаях очень трудно судить о приоритете того или иного из них.

После краткого исторического введения следует теоретическая глава, в которой достаточно подробно излагаются основные принципы и практически важные выводы. Даже те читатели, которые не будут последовательно, шаг за шагом изучать выводы формул, найдут здесь достаточно полное объяснение типов хроматографии и наиболее важные сведения относительно общих зависимостей между структурой соединений и их хроматографическим поведением. В разделе, посвященном общей технике, материал излагается в последовательности, соответствующей ходу отдельных операций в процессе хроматографирования. Наконец, в главе, посвященной препаративной технике, кратко рассматривается метод хроматографии на целлюлозных колонках. В специальной части сначала описываются методы обнаружения (проявления), а затем хроматографические системы, поскольку при выборе условий эксперимента, как правило, сталкиваются с трудностями в обнаружении вещества на хроматограмме.

При разделении специальной части на главы мы в большей степени, чем в первом издании, придерживались принципа химической систематики: сначала рассматри-

ваются соединения с кислородсодержащими функциональными группами, затем азотсодержащие соединения, от простых соединений переходят к более сложным. Отдельная глава посвящена соединениям, содержащим серу. Только некоторые соединения, обычно хроматографирующиеся совместно, хотя они и являются химически различными, мы оставили в обычных группах. К ним относятся витамины, антибиотики, инсектициды и красители. Специальная глава, посвященная радиоактивным веществам, из второго издания исключена.

Мы должны были уделить некоторое внимание значению метода хроматографии на бумаге, указав хотя бы в общих чертах на современный масштаб его применения и на перспективы развития в будущем, проиллюстрировав это примерами из соответствующих областей.

В конце книги приведены методы приготовления проявляющих реактивов и другие методики (модифицированные сорта бумаги, пропитка, сложные системы растворителей, приготовление образцов, количественный анализ).

Значения  $R_f$  приводятся в графической форме гораздо чаще, чем в первом издании. Это было сделано потому, что такие схематические хроматограммы, «одномерные карты», дают более полное представление о разделении, чем цифровые данные, приведенные в таблицах, и, кроме того, следует иметь в виду, что о возможности разделения свидетельствует не только взаимная удаленность центров пятен, но также вид и компактность последних. Во всех случаях, однако, мы предостерегаем от излишней веры в табличные значения  $R_f$ . Эти величины указывают только на последовательность расположения пятен на хроматограмме и не могут заменить использование стандартных образцов (метчиков, или свидетелей).

В обозначении символов мы главным образом опирались на номенклатуру, разработанную комиссией Чехословацкого химического общества [Chem. Listy, 47, 1722 (1953)]. Для экономии места и большей наглядности мы придерживались в тексте и главным образом в таблицах и рисунках принятых или оригинальных сокращений.

Выход в свет второго издания совпал со временем, когда количество опубликованных работ в области хроматографии на бумаге уже не увеличивается в геометрической прогрессии, хотя и остается на уровне 1500 работ ежегодно. В некоторых областях химии, биохимии и технологии применение описываемого метода пока еще ограничено, хотя, безусловно, имеет большое будущее. Однако тенденция к упрощению хроматографического метода и к выбору более рациональных условий проведения анализов имеет место в большей степени, чем стремление расширять его применение. Понимание связи между химической структурой и хроматографическим поведением делает этот метод особенно важным при получении сведений о форме молекулы и о распределении сил на ее поверхности. Эта тенденция до сих пор еще не привела к определенным результатам, равно как и попытки разработать на основе комбинации методов проявления и хроматографирования системы идентификации соединений. Все же в данной книге мы стремились показать на конкретных примерах обе эти тенденции.

*И. М. Хайс и К. Мацек*

Прага, май 1957 г.

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И СИМВОЛОВ

В этом перечне не приведены общеизвестные сокращения и символы, комбинации уже приводившихся сокращений, а также символы, которые объяснены в том месте, где они используются.

А	Аденин
	11-Дигидрокортикостерон
А	Максимальная работа, производимая при переводе 1 моля вещества из одной фазы в другую
адип.	Адициновая кислота
АДриб	Дезоксирибозид аденозина (дезоксаденозин)
АДФ	Аденозиндифосфат
АК	Аминокислоты
Ала	Аланин ( $\alpha$ -аланин)
Ам	Амил-(пентил-)
АмОН	Амиловый спирт
АМФ	Адениловая кислота (аденозинмонофосфат)
Ара	Арабиноза
Арг	Аргинин
АРиб	Аденозин
Асп	Аспарагиновая кислота
АспNH <sub>2</sub>	Аспарагин
АТФ	Аденозинтрифосфат
Ац	Ацетил-
АцО	Ацетокси
б.	Белый
Б	Кортикостерон
БензИм	Бензимидазол
Бз	Бензил-
Бк	Бензойная кислота
Бу	Бутил-
БуОН	Бутанол
В	Ватман
Вал	Валин
восх.	Восходящий

втор-	Вторичный
Г	Гуанин
Гал	Галактоза
ГДриб	Дезоксирибозид гуанина (дезоксигуанозин)
ГДФ	Гуанозиндифосфат
Ген	Гентиобиоза
ГИН	Гидразид изоникотиновой кислоты
Гис	Гистидин
ГКс	Гипоксантин
ГКсДриб	Дезоксирибозид гипоксантина (дезоксиинозин)
ГКсРиб	Инозин
Гл	Глюкоза
Гли	Гликокол
Глицеринов.	Глицериновая кислота
Гл-1-Ф	Глюкозо-1-фосфат
Гл-6-Ф	Глюкозо-6-фосфат
Глу	Глутаминовая кислота
ГлуNH <sub>2</sub>	Глутамин
ГлуН	Глутатион (восстановленная форма)
ГлуО	Глутатион (окисленная форма)
ГМФ	Гуаниловая кислота (гуанозинмонофосфат)
гомоСер	Гомосерин
гомоЦис	Гомоцистеин
ГРиб	Гуанозин
ГТФ	Гуанозинтрифосфат
Гул	Гулоза
Д	См. «Методики», раздел Д
ДАК	Дезоксиадениловая кислота
ДГ	Дегидро-
ДГК	Дезоксигуаниловая кислота
ДДЕ	Дихлордифенилэтилен
ДДТ	Дихлордифенилтрихлорэтан
Дезокси-Риб	Дезоксирибоза
диЛиз	$\alpha, \epsilon$ -бис-(2,4-Динитрофенил)-лизин
ДИМ-1	3,3'-Диметил-4,4'-диокси-5,5'-диметилдифенилметан
ДИМ-2	2,2'-Диокси-5,5'-диметилдифенилметан
ДИМ-3	3,3',5,5'-Тетра-(оксиметил)-4,4'-диоксидифенилметан
ДиМеКс	Диметилксантин
диNH <sub>2</sub> пим	Диаминопимелиновая кислота
6,8-диОНПу	6,8-Диоксипурин
диОНФАл	3,4-Диоксифенилаланин
диТир	N,O-бис-(2,4-Динитрофенил)-тирозин

ДЙТир	3,5-Дийодтирозин
2,3-диФГК	2,3-Дифосфоглицериновая кислота
ДКА	11-Дезоксикортикостеронацетат
ДМАБ	Диметиламинобензальдегид
ДНФ	2,4-Динитрофенил
ДНФБ	Динитрофторбензол
ДНФГ	2,4-Динитрофенилгидразон
ДПН	Дифосфопиридиннуклеотид
ДУМФ	Дезоксиуридинмонофосфат
ДЦК	Дезоксицитидиловая кислота
Е	17 $\alpha$ -Окси-11-дегидрокортикостерон (кортизон)
ж.	Желтый
з.	Зеленый
и	Изо
И	Индол, индолил-
ИААмид	Индолил-3-ацетамид
ИАкрК	Индолил-3-акриловая кислота
ЗИАлл	3-Аллилиндол
ИБАмид	Амид индолилмасляной кислоты
Идо	Идоза
ИДФ	Инозиндифосфат
ил	Изолейцин
Им	Имидазол, имидазолил-
иМал	Изомальтоза
им-ДНФ-гис	Гистидин с заместителем 2,4-динитрофенил в кольце имидазола
ИМК	Индолил-3-масляная кислота
ИМолК	$\beta$ -(Индолил-3)-молочная кислота
ИМФ	Инозиновая кислота (инозинмонофосфат)
ИПиВК	Индолил-3-пировиноградная кислота
ИПК	$\beta$ -(Индолил-3)-пропионовая кислота
ЗИПр	3-Пропилиндол
ИПрдиОН	Индолилпропандиол
ИТФ	Инозинтрифосфат
ИУК	Индолил-3-уксусная кислота
ИЭт <sub>2</sub> ААмид	Индолил-3-диэтилацетамид
К	Кето
К-та	Кислота
К <sub>д</sub>	Константа димеризации
К <sub>н</sub> , К <sub>он</sub>	Константы диссоциации кислот и оснований
Кат	Катехин
к.	Коричневый

кр.	Красный
Кс	Ксантин
Ксил	Ксилоза
КсРиб	Ксантозин
Л	Лейцин
Лак	Лактоза
Лиз	Лизин
Лик	Ликсоза
ЛNH <sub>2</sub>	Лейцинамид
<i>M</i>	Вес носителя, приходящийся на единицу длины
Мал	Мальтоза
малин.	малиновый
Ман	Манноза
мас	Масляная кислота
Ме	Метил-
ME 87	Алкалоид, содержащийся в спорынье, с $R_{\text{метилэргобазин}} = 0,87$
MeГис	Метилгистидины
MeКс	Метилксантин
Мел	Мелибиоза
MeO	Метокси-
MeOH	Метанол
Мет	Метионин
МетО	«Метионинсульфоксид»
МетО <sub>2</sub>	«Метионинсульфон»
МетОкис	Окисленный метионин
5-MeЦ	5-Метилцитозин
5-MeЦДриб	Дезоксирибозид 5-метилцитозина (дезоксид-5-метилцитидин)
МЙТир	Моноидтирозин
<i>n</i>	Нормальный (с неразветвленной цепью)
НАСК	Нафтиламиносульфокислота
НВал	Норвалин
висх.	Нисходящий
НЛ	Норлейцин
НСК	Нафтолсульфокислота
о.	Оранжевый
ОН	окси-, гидроксильная группа
ОНпр	Оксипролин
Орн	Орнитин
орто-ф	Ортофосфорная кислота

---

ПАБ	<i>n</i> -Аминобензойная кислота
ПАСК	<i>n</i> -Аминосалициловая кислота
ПДМеАБ	<i>n</i> -Диметиламинобензальдегид
пим	Пимелиновая кислота
пип, пипек,	Пипеколиновая кислота
пипекол	
Пир	Пиридин
ПирСООН	Пиридинмонокарбоновая кислота
Пир-диСООН	Пиридиндикарбоновая кислота
ПироФ	Фосфоэнолпировиноградная кислота
Пкат	Пирокатехин
подв.	Подвижная фаза
Порф	Порфирин
Пр	Пропил-
Про	Пролин
ПрОН	Пропанол
Пт	Птеридин
Пу	Пурин
пурп.	Пурпурный
<i>П</i>	См. «Методики», раздел <i>П</i>

Рам	Рамноза
Раф	Рафиноза
Риб	Рибоза
	Рибозид
р., роз.	Розовый

с., сер.	Серый
Сах	Сахароза
св.	Светлый
Сер	Серин
симм.	Симметричный
син.	Синий
Сор	Сорбоза

Т	Абсолютная температура
т. кип.	Температура кипения
т. пл.	Температура плавления
Таг	Тагатоза
Тал	Талоза
Тау	Таурин
ТДриб	Тимидин
ТДФ	Тиаминдифосфат

---

ТЕТР	2,4,6-Три-(2'-окси-5'-метилбензил)-фенол
Тим	Тимин
Тир	Тирозин
тм.	Темный
ТМФ	Тимидинмонофосфат Тиаминмонофосфат
ТПН	Трифосфопиридиннуклеотид
Тр	Треонин
ТРИМ-1	4-Метил-2,6-ди-(2'-окси-5'-метилбензил)-фенол
Трип	Триптамин
Трипт	Триптофан
ТТФ	Тиаминтрифосфат
ТТХ	Трифенилтетразолий хлористый
ТХрДФ	Тиохромдифосфат
ТХрМФ	Тиохроммонофосфат
ТХрТФ	Тиохромтрифосфат
У	Урацил
УДриб	Дезоксирибозид урацила (дезоксиуридин)
УДФ	Уридиндифосфат
укс.	Уксусная кислота, уксуснокислая соль
УМФ	Уридиловая кислота (уридинмонофосфат)
Урид	Уридин
УТФ	Уридинтрифосфат
УФ	В ультрафиолетовом свете (обычно относится к флуоресценции)
ф.	Фиолетовый
Ф	17 $\alpha$ -Оксикортикостерон (кортизол, дегидрокортизон)
Ф	Фосфорная кислота, фосфат
ФА	Фенилаланин
ФГК, Ф-гли-	Фосфоглицериновая кислота
церинов.	
ФИ	Фенилиндол
Фру	Фруктоза
Фру-1,6-диФ	Фруктозо-1,6-дифосфат
Фру-6-Ф	Фруктозо-6-фосфат
Фуко	Фукоза
Ц	Цитозин
ЦДриб	Дезоксирибозид цитозина (дезоксицитидин)
Цел	Целлобиоза

Целлозольв	Моноэфир этиленгликоля
ЦиS	Радикал $-S-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ (цистеин или цистин)
Ци <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Цистин
ЦиSH	Цистеин
ЦиSO <sub>2</sub> H	«Цистеинсульфиновая кислота» $HSO_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
ЦиSO <sub>3</sub> H	Цистеиновая кислота $HSO_3-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
Цит	Цитрулин
ЦМФ	Цитидиловая кислота (цитидинмонофосфат)
ЦРиб	Цитидин
ч.	Черный
Эт	Этил-
ЭтО	Этоксид-
ЭтОН	Этанол
<i>c</i>	Концентрация вещества в подвижной фазе
<i>c</i> <sub>макс.</sub>	Максимальная концентрация вещества в зоне
<i>c</i> <sub>R, K</sub>	Критическая концентрация смеси растворителей, при которой вещество уже не адсорбируется (т. е. в этом случае руководствуются принципом «все или ничего»)
27 CX	Полупродукт фотолиза рибофлавина
<i>d</i>	Дифференциал
	<i>d</i> -Конфигурация
	Плотность
	Оптическая плотность, экстинкция, поглощение, $lg(\Phi_0/\Phi)$
<i>e</i>	Основание натуральных логарифмов
<i>f(c), f*(c)</i>	Функция разделения
<i>G</i>	Групповая константа (при разложении <i>R<sub>M</sub></i> на отдельные константы)
<i>G</i> <sub>0</sub>	Константа основной группы
<i>G, G*</i>	Функция разделения при решении с помощью исчисления в конечных разностях
	Количество вещества в колонке
H <sub>4</sub> B	5β-Прегнан-3α,11β,21-триол-20-он
H <sub>4</sub> C	5β-Прегнан-3α,17α,21-триол-20-он
H <sub>2</sub> E	5β-Прегнан-17α,21-диол-3,11,20-трион
H <sub>4</sub> E	5β-Прегнан-3α,17α,21-триол-11,20-дион
НОСН <sub>2</sub> —	Оксиметил-, метилол
H <sub>2</sub> Ф	5β-Прегнан-11β,17α,21-триол-3,20-дион
H <sub>4</sub> Ф	5β-Прегнан-3α,11β,17α,21-тетрол-20-он
<i>l</i>	<i>l</i> -Конфигурация

$l$	Ширина зоны
$L$	Длина колонки
$n$	Нормальный раствор (граммэквивалент/литр) Общее число элементарных слоев в колонке
$n$	Порядковый номер элементарного слоя колонки
$n_a$	Количество вещества, адсорбированного на одной тарелке
$n_c$	Число атомов углерода
НАцИАцет	N-Ацетилиндолилацетон
$NH_2$	Амино-, первичная аминогруппа
$NH_2$ -мас	Аминомасляная кислота
НСГр	N-Сукцинилтриптамин
$P$	Постоянная бумаги (при разложении величины $R_M$ на отдельные константы), $P = \lg(q_H/q_H)$
$q_H$	Часть площади поперечного сечения колонки, занятая подвижной фазой
$q_H$	Часть площади поперечного сечения колонки, занятая неподвижной фазой
$Q$	Количество вещества в хроматограмме
$Q_H$	Количество вещества в подвижной фазе элементарного слоя
$Q_H$	Количество вещества в неподвижной фазе элементарного слоя
$r$	Порядковый номер элементарного слоя подвижной фазы колонки
$R$	Радикал
$R$	Газовая постоянная
$R_f$	Относительное положение зоны (отношение скорости перемещения зоны к скорости движения фронта растворителя); отношение расстояния между пятном вещества и линией старта к расстоянию между фронтом растворителя и линией старта
$R_M$	$\lg(1/R_f - 1)$
$R_R$	Относительное положение пятна при круговом способе хроматографирования, см. уравнение (33), стр. 142
$R_X$	Отношение скорости движения анализируемого вещества к скорости движения какого-либо известного вещества, взятого для сравнения (отношение расстояния между пятном неизвестного вещества и линией старта к расстоянию между пятном известного вещества X и линией старта). Например, $R_{5KG}$ означает, что в качестве образца для сравнения берут 5-кетоглюконовую кислоту, а $R_{TMG}$ соответствует 2,3,4,6-тетрамтилглюкозе
$t$	Время
$v$	Объем подвижной фазы
$\Delta v$	Объем подвижной фазы в элементарном слое

---

$v_R$	Объем подвижного растворителя, удерживаемого колонкой; см. уравнения (34)—(35), стр. 215
$x$	Расстояние от начала колонки
$\Delta x$	Высота элементарного слоя
$x_d$	Положение резкой границы зоны (расстояние резкой границы от начала колонки)
$\alpha$	Коэффициент распределения
$\alpha^*$	Кажущийся (эффективный) коэффициент распределения диссоциирующих веществ
$\beta$	Коэффициент разделения, отношение коэффициентов распределения двух веществ
$\gamma, \delta$	Коэффициенты разделения при решении, использующем исчисление конечных разностей (см. стр. 51)
$\Delta$	Приращение
$\eta$	Вязкость
$\lambda$	Расстояние, проходимое разделяемым веществом за время установления равновесия; высота, эквивалентная одной теоретической тарелке
$\lambda_{\text{макс.}}$	Длина волны при максимальном поглощении
$\mu$	Микро-, микрон
	Дипольный момент
$\nu$	Число эффективных тарелок
$\pi \frac{1}{2}$	Полярнографический потенциал полуволны
$\Sigma$	Сумма
$\Phi$	Световой поток



# ***ОБЩАЯ ЧАСТЬ***



# НЕКОТОРЫЕ СВЕДЕНИЯ ИЗ ИСТОРИИ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

---

И. М. Х а й с

## КАПИЛЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ — ПРЕДВЕСТНИК ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

С давних пор при производстве красителей для определения качества получаемого продукта образец его наносили в виде маленькой капли на фильтровальную бумагу или ткань. Если образец содержал смесь красителей, на фильтровальной бумаге появлялись концентрические круги. Их появление объясняется тем, что, когда капля расплывается, компоненты смеси движутся в направлении от центра с различными скоростями, причем растворитель имеет наибольшую скорость. Таким способом, например, анализировали красители растительного происхождения. Рунге<sup>1)</sup> использовал чистую или пропитанную различными веществами фильтровальную бумагу в качестве среды для проведения химических реакций. Многие из его «самопроизвольно образующихся картин», которые были изданы в сборниках «Musterbilder» (1850 г.) и «Bildungstrieb der Stoffe» (1855 г.), по современной терминологии можно было бы назвать осадочными хроматограммами (Гапон и Гапон), хотя в этом случае имели место и другие физические и химические явления (рис. 1 и 2).

Рунге можно считать одним из основателей метода капельного анализа, развитию которого в дальнейшем значительно способствовали работы Фейгля и Тананаева.

В то время как «картины», полученные Рунге, являются предшественниками круговых хроматограмм, Шенбейн и Гоппельсрелдер при применении капиллярного анализа систематически наблюдали образование отдельных полос при проникновении растворов смесей через фильтроваль-

---

<sup>1)</sup> Фридрих Фердинанд Рунге (1795—1867 г.) был профессором в Вроцлаве и Берлине, затем директором химического завода в Ораниенбурге. Рунге — автор нескольких учебников по химии. Он первым выделил анилин из каменноугольного дегтя. Материалы по его биографии можно найти в работах Аифта, Вейля [1—5] и Грюне с сотрудниками. В третьем томе книги Рунге «Farbenchemie» (1850 г.) на стр. 15 читаем о фильтровальной бумаге следующее: «За счет действия капиллярных сил капля, нанесенная на бумагу, разлагается на составные части. В зависимости от характера жидкости капля образует пятно с темной серединой и светлыми или совсем неокрашенными краями».

ную бумагу. Для определения озона Шенбейн<sup>1)</sup> смачивал полоску фильтровальной бумаги раствором йодистого калия и крахмала или раствором гваяковой смолы. При этом он заметил, что при продвижении раствора по бумаге йодистый калий и крахмал не поднимались на такую высоту, какой достигала вода. Когда в 1861 г. Шенбейн сообщил об использовании этого явления для частичного разделения ряда веществ (красителей, щелочей, кислот, фенолов, солей), Гоппельсредер<sup>2)</sup> заявил, что он считает себя его учеником.

Первая работа Гоппельсредера [1] по капиллярному анализу появилась в том же номере журнала, что и сообщение Шенбейна. С тех пор Гоппельсредер работал в этой области в течение 50 лет. За это время он значительно расширил область применения нового метода. С помощью капиллярного анализа стали анализировать природные и синтетические красители, алкалоиды, масла, нефтепродукты, соли, коллоидные системы, питьевую воду, вина, молоко, мочу. Гоппельсредер дал также некоторые соотношения, устанавливающие связь между химической структурой вещества и высотой подъема его на капиллярограмме. Полученный богатый экспериментальный материал Гоппельсредер опубликовал во многих сообщениях, например в вышедшей в 1901 г. монографии. В то время со стороны официальной химической науки к капиллярному анализу не было особого доверия. Об этом, например, свидетельствует информационный обзорный доклад Рейнбольтта, который в части, посвященной методу капиллярного анализа, прозвучал скептически. Большое распространение этот метод анализа получил в фармацевтической химии (Куниц-Краузе, Платц), где он используется до наших дней (рис. 3). Капиллярный анализ применяют иногда и в других областях.

Гоппельсредеру было известно значение этого метода, о котором уже Шенбейн говорил, что «он мог бы послужить химику-аналитику как средство качественного исследования в тех случаях, когда не могут помочь другие методы, например при анализе смесей растворенных органических красителей».

Многие технические приемы, которые были позже заново открыты для хроматографии на бумаге и с которыми читатель встретится в этой книге, были известны уже основоположникам капиллярного анализа (например, использование флуоресценции или наблюдение адсорбционного спектра веществ прямо на бумаге). Различие капиллярного анализа и распределительной хроматографии на бумаге представлено схематически в табл. 1.

Основное различие между этими методами состоит в следующем. При капиллярном анализе полоску бумаги погружают одним концом в анализируемый раствор, чаще всего водный или этанольный. Это соответствует «фронтальному анализу» смеси (см. стр. 42 и рис. 19,а). В настоящее время при хроматографировании на бумаге на полоску фильтровальной бумаги на небольшом расстоянии от одного края наносят анализируемый раствор в виде маленькой капли или поперечной черточки. Затем конец бумаги ниже нанесенной капли помещают в жидкость, которая действует как проявитель. В этом случае мы имеем «элюентное проявление» (см. стр. 42). Общим для обоих методов является свободное подвешивание полоски бумаги в атмосфере, насыщенной парами используе-

<sup>1)</sup> Христиан Фридрих Шенбейн (1799—1868 гг.) родился в Вюртемберге, был профессором химии в Базеле. В 1840 г. он получил озон.

<sup>2)</sup> Фридрих Гоппельсредер (1836—1919 гг.)—ученик Розе, Бунзена и Шенбейна.

Таблица 1

## СРАВНЕНИЕ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО АНАЛИЗА И МЕТОДА РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Характеристики	Капиллярный анализ (Шенбейн, Гоппельсредер и др., 1861 г.)	Распределительная хроматография на бумаге (Консен, Гордон и Мартин, 1943 г.)
Адсорбенты или носители	Фильтровальная бумага и подобные материалы	
Неподвижная фаза	Целлюлоза бумаги	Один из растворителей смеси (обычно наиболее полярный)
Подвижная фаза	Вода и (или) органический растворитель	
Направление потока	Восходящее и радиальное	Нисходящее, восходящее и радиальное
Методы хроматографии	Преобладает фронтальный анализ, иногда элюентное проявление	Как правило, элюентное проявление
Надежность разделения веществ	Зоны перекрываются	Зоны часто хорошо разделяются
Характер разделяемых веществ	Различные неорганические и органические вещества	
Способ определения зон	Различные способы, чаще всего цветные реакции	
Идентификация веществ	Цвет, химическая реакция, высота подъема	Цвет, химическая реакция, относительное положение ( $R_f$ )
Модификация метода для анализа больших количеств веществ	Древесина	Порошкообразная целлюлоза и другие полисахариды, опилки, столбики из дисков фильтровальной бумаги и т. д.
Возможность использования двумерной хроматографии	Результаты неудовлетворительны (Лизеганг, 1943 г.)	Часто применяется двумерная хроматография

мого растворителя. Кроме того, некоторые авторы при использовании этих методов помещали полоски фильтровальной бумаги между двумя стеклянными пластинками. Трей и Холмгрен предложили круговую модификацию метода, а Скрауп сравнил его с одномерной хроматографией.

В старых работах по капиллярному анализу элюентное проявление чистым растворителем использовали очень редко. Для лучшего разделения компонентов смеси Гоппельсредер рекомендовал погрузить полоску бумаги в разделяемую смесь, затем через некоторый промежуток времени отрезать конец полоски по линии ее погружения в раствор и снова опустить полоску тем же концом в чистый растворитель. В этом случае зоны проявляются более четко. Позже, благодаря влиянию работ Цвета по хроматографии, метод элюентного проявления стали применять чаще. Незадолго до открытия в Англии двумерной распределительной хроматографии в Германии Лизегангом был описан метод двумерного (крестообразного) капиллярного анализа. Однако результаты, полученные Лизегангом в начале работы, были не очень хорошими.

Как мы увидим далее, в современной хроматографии на бумаге разделение чаще всего основывается на различном распределении растворенных веществ между двумя жидкими фазами. Разделение, которое происходит при капиллярном анализе, сначала объясняли отчасти действием

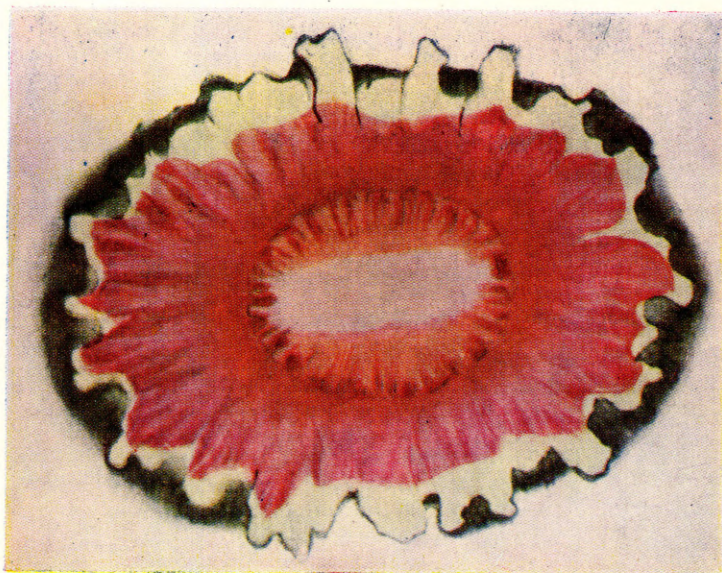
капиллярных сил. Позже Гоппельсредер объяснял его в основном адсорбцией. Неорганический капиллярный анализ на бумаге, пропитанной гидроокисью алюминия (Флуд), основывается главным образом на ионном обмене. Грюсс предложил с помощью капиллярного анализа разделять ферменты, а Фридбергер — даже целые клетки (бактерии). Этот метод основывается на приобретении целлюлозой при соответствующих условиях электрического заряда.

Оценка монографии Гоппельсредера [2] с современных позиций была сделана в работе Хайса [4]. Следовало бы также подробно рассмотреть литературу по капиллярному анализу, появившуюся в более позднее время. Однако провести такой разбор в рамках этой книги мы не можем, поскольку основной ее целью является ознакомление с наиболее совершенными методиками, получившими широкое распространение в повседневной практике.

Цвет также занимался изучением капиллярного анализа. Он указывал, что, кроме диффузии, адсорбции и коагуляции, при капиллярном анализе часто имеет место выпадение в осадок растворенных веществ. Так, при использовании водно-спиртовых растворов выпаривание спирта может привести к тому, что вещества, плохо растворимые в воде, будут выделяться из раствора. Однако следует заметить, что этот механизм не является общим и имеет место, по-видимому, лишь в некоторых случаях: Гоппельсредер обычно помещал бумагу в камеру, атмосфера которой была насыщена парами растворителя, или даже просто между двумя стеклянными пластинками. Цвет полагал, что капиллярный анализ нельзя считать хроматографическим методом. Однако в настоящее время в соответствии с современными взглядами считают, что капиллярный анализ нельзя выделять из хроматографии.

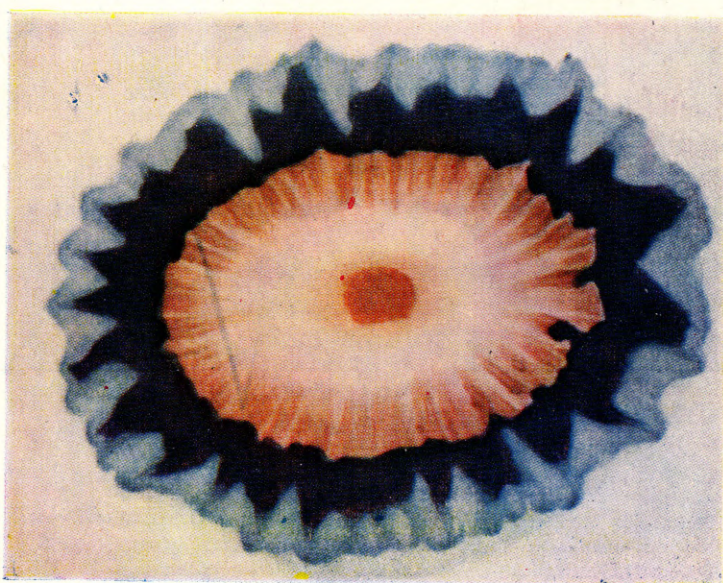
## КОЛОНОЧНЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АДсорбЦИОННЫЙ МЕТОД М. С. ЦВЕТА

Еще Либих отметил, что при фильтровании смеси солей через слой почвы калий захватывается самыми верхними участками слоя, а натрий — более глубокими. Такое распределение Либих приписывал происходящей на поверхности почвы адсорбции (адсорбционные свойства почвы были известны уже Аристотелю). В наше время это явление объясняют ионным обменом. Аналогичное фракционирование описали и другие агрохимики, например Вей. Однако это явление не было использовано с целью разделения или анализа каких-либо веществ. Гоппельсредер пытался использовать для капиллярного аналитического разделения сыпучие материалы (различные виды почв, инфузорную землю, песок), но при этом он не получил положительных результатов. Положительные результаты были получены только в тех опытах, в которых для разделения применяли бумагу, оксицеллюлозу, текстильные и древесные материалы [2]. Для препаративных целей и выделения чистых веществ капиллярный анализ использовали только в виде редких исключений. Фишер и Шмидмер описали способ разделения неорганических ионов, при котором раствор, содержащий эти ионы, пропускается через бумагу, туго скатанную в трубочку. В работах ряда ученых, занимавшихся химией нефти (например, в работах Дея, Энглера и Альбрехта, а также Квитки), были использованы некоторые элементы хроматографии.



Р и с. 1. Пример «картины» Рунге.

Соответствует рис. 23 из книги Рунге «Bildungstrieb der Stoffe». На бумагу нанесен раствор  $\text{MnSO}_4$  и  $\text{CuSO}_4$ . Проявление осуществляли раствором, содержащим ферроцианид калия,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  и  $\text{KOH}$ .



Р и с. 2. Пример «картины» Рунге.

Соответствует рис. 26 из книги Рунге «Bildungstrieb der Stoffe». На бумагу нанесен раствор, содержащий  $\text{AlCl}_3$ , ферроцианид калия и  $\text{CuSO}_4$ .



Р и с. 3. Примеры капиллярного анализа (А. Филип).

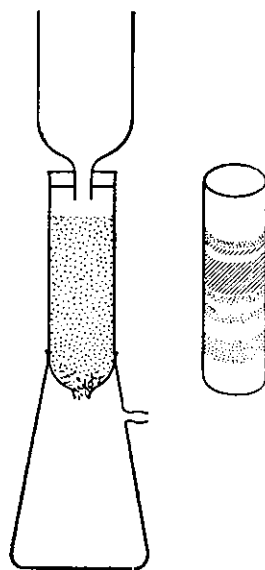
Различные виды тинктур:

1 — *Tinctura absinthii*; 2 — *Tinctura chinae compos*; 3 — *Tinctura myrrhae*.

Образцы *Aqua carminativa regia*:

4 — образец фармацевтического препарата, содержащий кошениль; 5 — образец с кошенилью, но без квасцов; 6 — образец, подкрашенный синтетическим красителем.

Мысль об адсорбционной хроматографии на колонках как о специальном аналитическом и препаративном методе возникла у русского ботаника и биохимика Цвета<sup>1)</sup>. К этой мысли его привело рассмотрение адсорбционной связи между красителями растительного происхождения и белком. Обсуждение этого вопроса было проведено Цветом в его диссертации (Казань, 1901 г.). Уже в 1903 г. Цвет описал принципы и возможности хроматографического метода. Этот метод был назван им хроматографией [3], так как он давал представление о виде и составе красителей. Дальнейшее развитие этого метода было дано Цветом в монографии о красителях естественного происхождения [4]. Хотя многие явления и методики, которые в настоящее время относят к хроматографии, были известны и до Цвета, его следует считать основоположником хроматографии во всех ее современных направлениях, так как Цвет правильно понял принцип этих явлений и использовал их для разработки эффективных препаративных и аналитических методов (рис. 4). Он дал очень тонкий инструмент для разделения сме-



Р и с. 4. Адсорбционная хроматография Цвета на колонках [4, 5].

Слева изображено устройство для проведения хроматографирования; справа приведена хроматограмма красителей, содержащихся в листьях растений, полученная при проявлении чистым растворителем.

сей веществ, что особенно важно для биохимии, которая имеет дело с чрезвычайно сложными смесями веществ. Большой заслугой Цвета является то, что он систематически использовал элюентное проявление. Цвет исследовал 126 адсорбентов, а также большое количество растворителей в отношении их элюирующей способности.

Несмотря на признание значения его работ Академией наук (премия Ахматова за 1911 г.), большинство авторитетных ученых (например, замечательный польский исследователь Мархлевский) отнеслись с недоверием к опытам Цвета с хлорофиллом, каротиноидами и другими кра-

<sup>1)</sup> Михаил Цвет родился в Асти (Северная Италия) в 1872 г. Отец ученого — Семен Николаевич Цвет — был уроженцем Чернигова. Родные матери, урожденной де Дороцца, были родом из Кюютахьи (Турция). Цвет учился в Лозанне и Женеве, где он в 1896 г. представил к защите диссертацию по ботанике. В том же году Цвет отправился в Россию. Сначала он преподавал ботанику в Петрограде. С 1901 по 1915 г. он работал в Варшаве. Хроматографический метод Цвет разработал в лаборатории ветеринарного института. В 1907 г. Цвету было присвоено в этом институте звание профессора ботаники и агрономии, в 1908 г. — профессора ботаники и микробиологии в высшем техническом учебном заведении Варшавы. Его деятельность была прервана войной. В связи с наступлением немцев он должен был покинуть Варшаву, оставив там свою библиотеку. Цвет побывал в Москве и Нижнем Новгороде. В 1917 г. после тяжелой болезни он отдыхал во Владикавказе. В 1918 г. работал в Юрьевском университете (Тарту). После оккупации города немцами университет был переведен в Воронеж. Здесь в мае 1920 г. Цвет умер от туберкулеза. Более подробные сведения о жизни М. С. Цвета можно найти в воспоминаниях Дерё, опубликованных в приложении к избранным сочинениям Цвета [5], а также у Хессе и Вейля [2]. Оценка деятельности Цвета дана, например, в работах Коштоянца и Калмыкова, Свешникова, Самсонова, Вржештала.

сителями, которые он настойчиво исследовал с помощью своего метода. Определенное влияние на формирование такого мнения оказало сообщение Вильштеттера о том, что хлорофилл разлагается на карбонате кальция, который Цвет также использовал в качестве адсорбента. Поэтому до 1931 г. этот метод, кроме работ самого Цвета, был использован лишь в немногих исследованиях. К ним относится работа Стокласа, Брдлика и Эрнеста (1909 г.), которые воспроизвели результаты опытов Цвета по разделению на карбонате кальция красителей, содержащихся в листьях. Однако в противоположность правильному взгляду Цвета они пытались доказать, что хлорофилл содержит фосфор.

Только в тридцатых годах в основном благодаря работам ученых гейдельбергской школы Куна и Ледерера [1, 2] метод Цвета нашел широкое применение. В Чехословакии он получил распространение благодаря работам Ржетовского и Урбана с Коштиржем. Наряду с наблюдением зон и их вырезанием из столбика адсорбента все большее значение приобретала элюентная хроматография. Цвет использовал в своих работах оба метода. Методы фронтального анализа и вытеснительного проявления с использованием определения показателя преломления вытекающей жидкости были разработаны Тизелиусом с сотрудниками в Упсале. Практическое значение приобрела также хроматография газов и ее модификация — термохроматография (Жуховицкий с сотрудниками). Успехи производства синтетических ионообменных смол позволили развить ионообменную хроматографию.

Название «хроматография» сохранилось, хотя хроматографический метод пригоден для исследования не только красителей, но и неокрашенных веществ. Названия «анализ Цвета» (Хессе), «эография» (Стрейн) или «синтетотикмизис» (Смит) не прижились. Верную оценку значения адсорбционной хроматографии дал Каррер: «Ни одно другое открытие не имело такого влияния и не расширило в такой степени область исследования химика-органика, как хроматографический анализ Цвета. Метод Цвета показал, что многие природные вещества, казавшиеся простыми, на самом деле имеют сложный состав. Только благодаря этому методу удалось достигнуть такого быстрого и значительного прогресса в исследовании витаминов, гормонов, каротиноидов и других природных веществ».

При исследовании липофильных органических веществ успехи адсорбционной хроматографии были большими, чем в случае таких гидрофильных веществ, как, например, аминокислоты. Возможности хроматографии в этой области были расширены благодаря внедрению метода распределительной хроматографии.

## РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

При анализе аминокислот обычно использовали повторную экстракцию бутанолом. Усовершенствованием экстракционного метода явилось противоточное распределение. Метод противоточного распределения является в сущности моделью хроматографии (см. стр. 34). На рис. 6 и 7 (см. стр. 35, 36) схематически изображены процессы 5-кратной и 10-кратной экстракции, проводившиеся в делительных воронках. При использовании большего числа экстракционных аппаратов достигается значительно лучшее разделение (см. рис. 9). Однако их число по техническим соображениям ограничивают. Если вместо «неподвижных» слоев экстракционной системы (на рис. 6 и 7 — нижние слои) взять порошкообразный мате-

риал, пропитанный водой, и пропускать через него органическую фазу, то получим такое же разделение, как и при использовании большого числа делительных воронок. Мартин и Синг, применявшие сначала для разделения ацетиламинокислот экстракционный метод [1], решили закрепить одну из фаз на порошкообразном носителе. В качестве такого носителя сначала был выбран силикагель. Так, в 1941 г. появился метод распределительной хроматографии [2]. В качестве подвижной фазы Мартин и Синг использовали, например, смеси хлороформа с возрастающими концентрациями бутанола. Последний добавляли для того, чтобы воспрепятствовать действию силикагеля как адсорбента, а также для повышения растворимости в подвижной фазе. Местоположение ацетиламинокислот в колонке определялось по изменению окраски индикатора. Действие силикагеля как адсорбента и трудность стандартизации его приготовления оказывают неблагоприятное влияние на разделение при использовании силикагеля в качестве носителя. Консен, Гордон, Мартин и Синг (рис. 5), которые в то время проводили работы в Лидсе по исследованию шерсти, использовали для анализа малых количеств неацелированных аминокислот фильтровальную бумагу. Таким образом, можно сказать, что распределительная хроматография на бумаге, появившаяся в 1943 г. благодаря работам Гордона с сотрудниками [1] и Консена с сотрудниками, имела три источника: хроматографию Цвета, противоточное распределение и частично капиллярный анализ. Различие между распределительной хроматографией на бумаге и капиллярным анализом уже было рассмотрено выше (см. стр. 22 и табл. 1).

Фильтровальная бумага обладает с точки зрения ее хроматографического использования многими преимуществами. Машинная выработка гарантирует ее однородность. Кроме того, она сравнительно устойчива, прозрачна и имеет форму листа, которая позволяет проводить анализ незначительных количеств веществ и осуществлять двумерную хроматографию (см. стр. 134). Хорошие результаты, получаемые при работе с бумагой, соответствуют данным, полученным Гордоном с сотрудниками [1] для таких носителей, как крахмал и порошкообразная целлюлоза. Эти полисахаридные носители использовались в данной работе в виде столбиков. Кроме того, для набивки колонок стали шире применять специальным образом обработанную инфузорную землю, обладающую незначительной адсорбционной способностью. В последнем случае при хроматографировании, по-видимому, имеет место распределение между протекающей жидкостью и жидкостью неподвижной, тогда как в остальных случаях (силикагель, крахмал, отчасти, вероятно, бумага), согласно Муру и Стейну, — скорее распределение между жидкостью и гелем. Большое значение приобрела газо-жидкостная распределительная хроматография, при которой неподвижной фазой является жидкость, а подвижной — газ (Мартин и Джеймс).

Разделение диссоциирующих веществ с помощью распределительной хроматографии было усовершенствовано путем использования в качестве неподвижной фазы буферного раствора. Этот метод был использован независимо друг от друга Хайсом с сотрудниками [2] (по инициативе Виснера) и Леви с Терьесеном для очистки пенициллина. Распределение между двумя органическими фазами было использовано Гордоном, Мартином и Сингом [2] уже в 1943 г. Кроме того, Синг [2] предложил метод «обращенных фаз», в котором неподвижная фаза является липофильной.

В связи с огромным значением распределительной хроматографии Мартину и Сингу в 1952 г. была присуждена Нобелевская премия.

## ДАЛЬНЕЙШЕЕ РАЗВИТИЕ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Консен с сотрудниками использовали метод хроматографии на бумаге для анализа аминокислот и пептидов. Применение этого метода вызвало в химии белков действительно революционные изменения, так как и в этой области, как в свое время в биохимии, ключом к решению многих проблем оказался метод разделения. Таким образом, подтвердилось мнение Синга, который в 1943 г. писал [1]: «Главной помехой при изучении строения белков с использованием методов органической химии является скорее непригодность этих методов, а не принципиальные трудности. Создание новых экспериментальных методов в этой области приведет нас, очевидно, к намного более ясному представлению о белках».

По названиям глав нашей монографии можно судить, насколько разнообразны группы веществ, при исследовании которых в настоящее время применяется этот метод. Особенно большое значение приобрела хроматография на бумаге в микроанализе радиоактивных веществ.

Было бы неправильным предполагать, что все видоизменения хроматографии на бумаге, возникшие в последние годы, можно объединить понятием «распределительная хроматография» (обсуждение этого вопроса см. на стр. 72, 73). Некоторые методы хроматографии на бумаге основаны на принципах адсорбции, «высаливания», осаждения, обмена. Однако большинство случаев разделения неорганических ионов основывается, по-видимому, на распределительном принципе.

Рост числа работ в 1943—1949 гг., в которых использовалась хроматография на бумаге, можно характеризовать геометрической прогрессией. В биохимических лабораториях этот метод стали применять почти так же часто, как колориметрию, и, по-видимому, чаще, чем титрование. В настоящее время невозможно сделать исчерпывающий обзор всех технических приемов и случаев применения этого метода. В «Bibliografie parigové chromatografie», которая выйдет в виде отдельной книги, не будут охвачены все исследования, в которых была использована хроматография на бумаге. В эту книгу войдут лишь те работы, в которых подробно описаны техника эксперимента или случаи решения особенно важных задач, возникавших в аналитической химии и биохимии.

Ниже приведен список наиболее известных монографий по хроматографии на бумаге.

### НОВЫЕ КНИГИ ПО ХРОМАТОГРАФИИ

- Brimley R. C., Barrett F. C., Practical Chromatography, Chapman & Hall, London (1953).
- Cassidy H. G., Adsorption and Chromatography. (Technique of Organic Chemistry, vol. V). Interscience, New York (1951). Fundamentals of Chromatography (Technique of Organic Chemistry, vol. X). Interscience, New York (1957).
- Фукс Н. А., Метод Цвета (хроматография) в органической химии. (Реакции и методы исследования органических соединений, том 1). Госхимиздат, Москва (1951).
- Keil B. (red.), Laboratorní technika organické chemie. Nakl. Českoslov. akad. věd., Praha (1954).
- Lederer E., Progrès récents de la chromatographie. I. Chimie organique et biologique, Hermann & Cie, Paris (1949).
- Lederer E., Lederer M., Chromatography. A Review of Principles and Applications, Elsevier, Amsterdam (1953).
- Lederer M., Progrès récents de la chromatographie. II. Chimie minérale. Hermann & Cie, Paris (1952).

- Martin A. J. P., James A. T., *Fundamentals of Chromatography*. Elsevier, Amsterdam (в печати).
- Orieńska-Blauth J., Waksmundzki A., Kański M., *Chromatografia*. Państw. wydawnic. nauk, Warszawa (1957).
- Рачинский В. В., Гапон Т. Б., *Хроматография в биологии*, Изд. АН СССР, Москва (1953).
- Самсонов Г. В., *Хроматография. Применение в биохимии*. Медгиз, Ленинград (1955).
- Šimek J., *Chromatografické metody*. Stát. nakl. techn. literatury, Praha (1955).
- Turba F., *Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie, einschliesslich verwandter Methoden wie Gegenstromverteilung, Papier-Ionophorese*. Springer Verlag, Berlin (1954).
- Williams R. T., Syngé R. L. M. (red.), *Partition Chromatography*, Biochem. Soc. Symposia, 3, Cambridge Univ. Press, London (1949).
- Williams T. I., *The Elements of Chromatography*. Blackie & Son, Glasgow (1954).
- Zechmeister L., *Progress in Chromatography 1938—1947*, Chapman & Hall, London (1950).
- Шемякин Ф. М., Мицеловский Э. С., Романов Д. В., *Хроматографический анализ*, Госхимиздат, Москва (1955).
- Chromatografie*. Přírodovědecké vydavatelství, Praha (1952).
- Chromatographic Analysis*. Discussions Faraday Soc., 7 (1949).
- Chromatography* (Discussion). Annals New York Acad. Sci., 49, art. 2, 141—326 (1948).
- Chromatography*. Brit. med. Bull., 10, 161—252 (1954).
- Труды Комиссии по аналитической химии, 6 (9). Доклады на совещании по применению хроматографического метода М. С. Цвета в химическом анализе, Изд. АН СССР, Москва (1955).

#### КНИГИ ПО ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

- Balston J. N., Talbot B. E., Jones T. S. G., *A Guide to Filter Paper and Cellulose Powder Chromatography*. H. Reeve Angel & Co., London, W. & R. Balston, Maidstone (1952).
- Block R. J., LeStrange R., Zweig G., *Paper Chromatography. A Laboratory Manual*. Academic Press, New York (1952), *Хроматография на бумаге*, Издатель-лит, Москва (1954).
- Block R. J., Durrum E. L., Zweig G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*. Academic Press, New York (1955).
- Cramer F., *Papierchromatographie*. Chemie, Weinheim (1951). 3. vyd. 1954. *Paper Chromatography*. Macmillan, London (1954).
- Grüne A., *Literaturzusammenstellung über Papierchromatographie*, I (1950), II (1951), III (1952), IV (1954). C. Schleicher & Schüll, Dassel.
- Hais I. M., Macek K. (red.), *Papírová chromatografie*. Nakl. Českoslov. akad. věd., Praha (1954).
- Linskens H. F. (red.), *Papierchromatographie in der Botanik*. Springer Verlag, Berlin (1955).
- Pollard F., McOmie J. F., *Chromatographic Methods of Inorganic Analysis with Special Reference to Paper Chromatography*. Butterworths, London (1953).
- Schoen C., *Analisi cromatografica su carta*. Soc. Edit. Farm., Milano (1954).
- Chromatographie*. E. Merck, Darmstadt.
- Journée de la chromatographie sur papier*, Bull. Soc. chim. France, 1952, 815—910.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Anft B., F. F. Runge, sein Leben und sein Werk. Berlin (1937).
- Consdon R., Gordon A. H., Martin A. J. P., *Biochem. J.*, 38, 224 (1944).
- Day D. T., *Ind. & techn. Petroleum Rev.*, 3, приложение к номеру от 25/VIII/1900, стр. 9.
- Dhéré Ch., *Candollea*, 10, 23 (1943); ref. Lederer E., *Progrès récents de la chromatographie*, I. Hermann & Cie, Paris (1949).
- Engler C., Albrecht E., *Z. angew. Chem.*, 14, 889 (1901).
- Feigl F., *Spot tests*. I. Inorganic applications. II. Organic applications. Elsevier, New York (1954).

- Filip A., Českoslov. Farm., 2, 323 (1953).  
 Fischer E., Schmidmer E., Ann., 272, 156 (1893).  
 Flood H., Tidsskr. Kjemi Bergves., 17, 178 (1937); Discussions Faraday Soc., 7, 190 (1949).  
 Friedberger E., Münchener med. Wschr., 66, 137 (1919).  
 Гапон Е. Н., Гапон Т. Б., ДАН СССР, 60, 401 (1948).  
 Goppelsröder F., Verhandl. naturforsch. Ges. Basel, 3, 268 (1861). [1]  
 Goppelsröder F., Capillaranalyse. Birkhäuser, Basel (1901). [2]  
 Gordon A. H., Martin A. J. P., Syngé R. L. M., Biochem. J., 37, xiii (1943). [1]  
 Gordon A. H., Martin A. J. P., Syngé R. L. M., Biochem. J., 37, 86 (1943). [2]  
 Grüne A., Fischer M., Eichler O., Das chemische Wappen. Schleicher & Schüll, Dassel, UHU-Werke, Bühl (1956).  
 Grüss J., Biologie und Capillaranalyse der Enzyme. Gebr. Bornträger, Berlin (1912). [1]  
 Grüss J., в книге E. Abderhalden (red.), Handbuch der biol. Arbeitsmethoden, Bd. IV/1, S. 37, Urban & Schwarzenberg, Berlin (1936). [2]  
 Жуховицкий А. А., Золотарева О. В., Соколов В. А., Туркельтауб Н. М., ДАН СССР, 77, 435 (1951).  
 Hais I. M., Chemie (Prah), 6, 222 (1950). [1]  
 Hais I. M., Košťál J., Vondráček M., Wiesner K., Čas. čes. Lékárnictva, věd. Píl., 58, 29 (1945); чехослов. пат. 9580/83295/1950. [2]  
 Hesse G., Adsorptionsmethoden im chemischen Laboratorium mit besonderer Berücksichtigung der chromatographischen Adsorptionsanalyse (Tswett-Analyse). W. de Gruyter & Co., Berlin (1943). [1]  
 Hesse G., Weil H., M. Tswetts erste chromatographische Schrift. Woelm, Eschwege (1954). [2]  
 Holmgren I., Biochem. Z., 14, 181 (1908).  
 James A. T., Martin A. J. P., Biochem. J., 50, 679 (1952).  
 Karrer P., Internat. Congress pure appl. Chem., London (1947).  
 Квитка С. К., Сообщение технического комитета в Баку, 17/VI—1900. Цитируется Коштыяцем и Калмыковым.  
 Košťál J. V., Čas. čes. Lékárnictva, 20, 227, 246 (1940).  
 Коштыяц Х. С., Калмыков К. Ф., Биохимия, 16, 479 (1951).  
 Kuhn R., Lederer E., Ber., 64, 1349 (1931). [1]  
 Kuhn R., Winterstein A., Lederer E., Z. physiol. Chem., 197, 141 (1931). [2]  
 Kunz-Krause H., Chem.-Ztg., 21, 940 (1897).  
 Levi A. A., Terjesen S. G., англ. пат. 569844 (1945).  
 Liebig J. von, Die Chemie in ihrer Anwendung auf Agrikultur and Physiologie. Braunschweig, 1840, cit. Goppelsröder. [2]  
 Liesegang R. E., Naturwissenschaften, 31, 348 (1943). [1]  
 Liesegang R. E., Z. anal. Chem., 126, 172 (1943). [2]  
 Martin A. J. P., Syngé R. L. M., Biochem. J., 35, 91 (1941). [1]  
 Martin A. J. P., Syngé R. L. M., Biochem. J., 35, 1358 (1941). [2]  
 Moore S., Stein W. H., Annual Review Biochem., 21, 251 (1952).  
 Platz H., Ueber Kapillaranalyse und ihre Anwendung im pharmazeutischen Laboratorium. Schwabe, Leipzig, 1922, cit. Rheinboldt.  
 Rheinboldt H., в книге Houben J., Die Methoden der organischen Chemie, Bd. I. Thieme, III. vyd., стр. 291, Leipzig (1925).  
 Runge F. F., Farbenchemie, III, Mittler u. Sohn, Berlin (1850). [1]  
 Runge F. F., Zur Farbenchemie, Musterbilder für Freunde des Schönen und zum Gebrauch für Zeichner, Maler, Verzierer und Zeugdrucker, Berlin (1850). [2]  
 Runge F. F., Der Bildungstrieb der Stoffe. Veranschaulicht in selbständig gewachsenen Bildern. Selbstverlag, Oranienburg (1855). [3]  
 Рябчиков Д. Л., Сенявин М. М., Труды Комиссии по аналитической химии, 6 (9), 12—20 (1955).  
 Řetovský R., Urban A., Chem. Obzor., 11, 107 (1936).  
 Самсонов Г. В., Природа, 42, № 6, 3 (1953).  
 Свешников Б. Е., Природа, 40, № 9, 65 (1951).  
 Schoenbein Ch. F., Verh. naturwiss. Ges. Basel, 3, 249 (1861).  
 Skraup Z. H., Monatsh., 30, 675 (1909).  
 Smith D. M., Chem. & Ind., 1954, 519.  
 Stoklasa J., Brdlík V., Ernest A., Ber. dtsh. botan. Ges., 27, 10 (1909).  
 Strain H. H., Anal. Chem., 22, 41 (1950).  
 Syngé R. L. M., Chem. Rev., 32, 135 (1943). [1]

- Sy n g e R. L. M., *Analyst*, **71**, 256 (1946). [2]  
Т а н а н а е в Н. А., Капельный метод, ГОНТИ, Свердловск — Москва (1939),  
цитируется Рачинским В. В., *Успехи химии*, **19**, 445 (1950).  
T r e u H., *Z. analyt. Chem.*, **37**, 743 (1898).  
V ř e š ť á l J., *Sovětská Věda-Chemie*, **4**, 169 (1954).  
W a y J. T., *J. roy. agr. Soc.*, **11**, 313 (1850); **13**, 123 (1952), cit. W i l l i a m s T. I.,  
W e i l H., *Experientia*, **8**, 476 (1952).  
W e i l H., *Farbe u. Lack*, **59**, 128 (1953). [1]  
W e i l H., *Kolloid-Z.*, **132**, 149 (1953). [2]  
W e i l H., *Chem.-Ztg.*, **78**, 416, 496 (1954). [3]  
W e i l H., *Naturwiss. Rundschau*, **1954**, 110. [4]  
W e i l H., W i l l i a m s T. I., *Naturwissenschaften*, **40**, 1 (1953). [5]  
W i l l i a m s T. I., W e i l H., *Arkiv Kemi*, **5**, 283 (1953).  
Ц в е т М. С., Труды казанского общества естествоиспытателей, Отделение биологии,  
**35**, № 3, 286 (1901). [1]  
Ц в е т М. С., О новой категории адсорбционных явлений и о применении их для биохимического анализа. Труды варшавского общества естествоиспытателей, Отделение биологии, **14**, 20 (1903); перепечатано: Цвет [5], Хессе и Вейль [2]. [2]  
T s w e t t M. S., *Ber. deutsch. botan. Ges.*, **24**, 316, 384 (1906). [3]  
Ц в е т М. С., Хромофиллы в растительном и животном мире. Типография варшавского учебного округа, Варшава (1910). [4]  
Ц в е т М. С., Хроматографический адсорбционный анализ. Избранные работы. Изд. АН СССР, Ленинград (1946). [5]  
Nobel Prize for Chemistry for 1952. *Nature*, **170**, 826 (1952), *Brit. med. J.*, **2**, 1089 (1952), *Experientia*, **8**, 483 (1952); *Chem. & eng. News*, **31**, 155 (1953).

# ПРИНЦИПЫ И ТЕОРИЯ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

---

*А. Токштейн, И. Дворжак, И. М. Хайс*

## *Введение*

### СУЩНОСТЬ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ И ЕЕ МОДЕЛЬ

Хроматография является физико-химическим методом разделения жидких или газообразных смесей, при котором компоненты смеси выделяются в виде отдельных полос или зон. Хроматографический метод разделения основан на различии в распределении отдельных веществ между двумя фазами (жидкость — жидкость, жидкость — гель, газ — поверхность твердой фазы, газ — жидкость, жидкость — поверхность твердой фазы). В процессе продвижения разделяемой смеси через неподвижный носитель происходит многократное повторение акта распределения вещества между двумя фазами, причем этот акт каждый раз происходит на новом участке носителя.

Было дано несколько определений хроматографии. Однако почти все определения вызвали ряд возражений. Некоторые определения оказались чересчур узкими, так как они не охватывали всех хроматографических методов<sup>1)</sup>. Другие же, наоборот, являясь слишком общими, затрагивают и методы, близкие к хроматографии. Такие определения не давали читателю ясного представления о сущности хроматографии<sup>2)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Определение, данное Цехмейстером: «Под термином «хроматография» понимают процессы, которые позволяют разделить смесь растворенных веществ благодаря избирательному захвату или выделению их на поверхности твердого носителя, происходящему при протекании жидкости в определенном направлении».

Определение Рачинского: «Основной принцип хроматографии состоит в том, что «произвольная жидкая или газообразная смесь веществ разделяется в процессе движения через слой сорбента, если существует различие в адсорбционном взаимодействии компонентов смеси с сорбентом».

Определение, данное Стрейном [1], ограничивает понятие хроматографии разделением веществ, нанесенных в виде общей узкой зоны. Этим Стрейн подчеркивает приоритет Цвета.

<sup>2)</sup> Определение, данное Вильямсом и Вейлем: «Под хроматографией мы подразумеваем процессы, приводящие к выделению из смеси некоторых или всех компонентов в виде отдельных зон на поверхности или внутри фаз, не содержащих сначала разделяемых веществ, причем действие этих процессов рассматривается независимо от характера сил, вызывающих переход веществ из одной фазы в другую».

Не рассматривая других определений, опишем сначала в общих чертах процессы, которые протекают на бумаге при хроматографировании.

Нанесем на полоску фильтровальной бумаги каплю раствора, содержащего смесь веществ, и дадим ей высохнуть. Один конец полоски поместим в сосуд с растворителем (подвижной фазой, элюирующим раствором). При этом растворитель под действием капиллярных сил будет просачиваться вдоль полоски бумаги. Для того чтобы не происходило испарения растворителя с бумаги, которое может привести к нежелательному изменению состава растворителя, поместим все устройство в закрытую камеру, атмосфера которой насыщена парами растворителя. Как только подвижная фаза подходит к месту, на которое была нанесена исследуемая смесь, происходит распределение молекул отдельных компонентов смеси между подвижной и неподвижной фазами. Неподвижной фазой является или бумага, или система, образованная целлюлозой бумаги и жидкостью (чаще всего водой), или адсорбционный чехол волокон целлюлозы, образованный соответствующей пропиткой<sup>1)</sup>. При не очень большой скорости движения подвижной фазы отношение концентраций определенного компонента разделяемой смеси в подвижной и неподвижной фазах приближается к равновесному. Уравнение, определяющее взаимозависимость этих концентраций, будем называть функцией разделения. При распределении вещества между двумя жидкостями это уравнение будет соответствовать уравнению коэффициента распределения. Если же мы имеем дело с адсорбцией растворенных веществ на поверхности твердой фазы, это уравнение будет соответствовать уравнению изотермы адсорбции и т. п. Молекулы, попадающие в подвижную фазу, переносятся к соседнему месту неподвижной фазы. Однако здесь концентрация вещества не является равновесной по отношению к концентрации этого вещества в подвижной фазе. Поэтому снова происходит переход вещества из одной фазы в другую, приводящий к установлению равновесия в новом месте. Та часть молекул, которая осталась в подвижной фазе, переносится дальше. В результате этого процесса более удаленный от фронта подвижного растворителя край пятна, образовавшегося при нанесении капли раствора на фильтровальную бумагу, как бы «съедается», а более близкий край нарастает. Таким образом пятно движется вдоль листа бумаги в направлении потока подвижной фазы. Скорость движения пятна зависит от функции разделения соответствующего вещества. Если при равновесии в подвижной фазе оказывается намного больше молекул, чем в неподвижной, то пятно движется сравнительно быстро. Если же равновесие сдвинуто в сторону неподвижной фазы, пятно перемещается медленно. Все вещества, у которых величины констант функций разделения (например, величины коэффициента распределения) различаются хотя бы незначительно, образуют при хроматографировании пространственно разделенные зоны.

Таким образом, мы видим, что при хроматографировании на бумаге происходит многократное повторение акта распределения веществ между двумя фазами. Связь между однократным распределением и процессом, происходящим во время хроматографирования на фильтровальной бумаге, аналогична связи между однократной перегонкой и процессом ректификации на насадочной колонне (см. стр. 54).

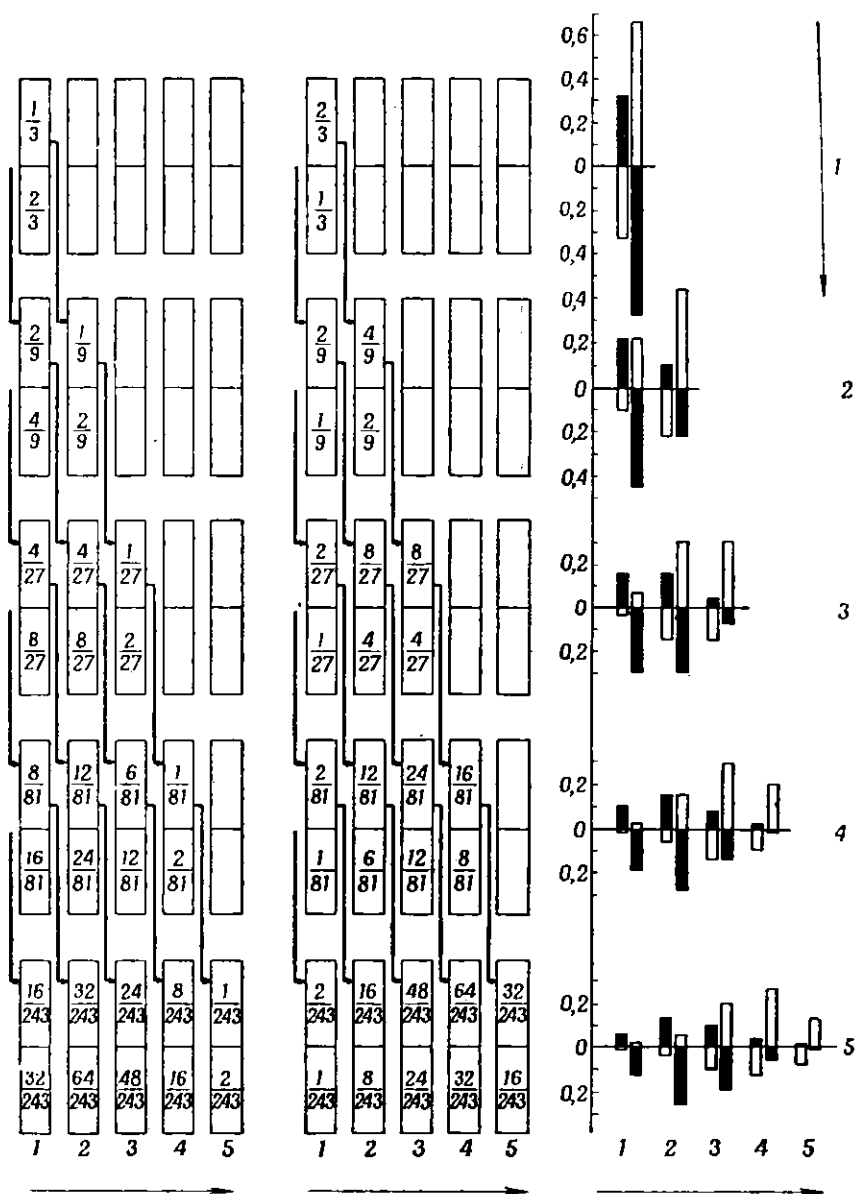
<sup>1)</sup> Если при хроматографировании в качестве стационарной фазы принимает участие главным образом жидкость, захваченная порошкообразным или волокнистым носителем, то можно говорить о неподвижной фазе.

Разъясним это еще раз на примере проводимого в делительной воронке многократного распределения двух веществ между двумя несмешивающимися между собой жидкостями. Такой способ, часто используемый в практике, называют противоточным распределением (в ректификации этому процессу соответствовала бы дистилляция на тарельчатой колонне).

Если ввести в соприкосновение две несмешивающиеся между собой жидкости и растворимое в них вещество, то последнее распределяется между обеими жидкостями. Равновесное значение отношения концентраций этого вещества в обеих жидкостях всегда постоянно, независимо от величин этих концентраций. Это отношение называется коэффициентом распределения (см. стр. 72). Если оба раствора, находящиеся в делительной воронке, интенсивно перемешивать путем встряхивания, то это обычно приводит к более быстрому установлению равновесия за счет сильного увеличения поверхности соприкосновения обеих жидкостей, через которую растворенное вещество переходит из одного растворителя в другой.

Если мы имеем смесь двух веществ с различными коэффициентами распределения, то после достижения равновесия отношения концентраций этих веществ в обеих фазах будут различными. Однако однократно проведенной операции экстракции для достижения полного или почти полного разделения обоих веществ недостаточно. Операцию экстракции можно повторить следующим образом. Более легкий верхний слой («подвижную фазу») перенесем во вторую делительную воронку, в которой уже находится чистый растворитель (тот же растворитель, который образует нижний слой в первой делительной воронке). Вместо удаленного из первой делительной воронки верхнего слоя добавим соответствующий свежий растворитель. Затем снова перемешаем содержимое делительных воронок и т. д.

На рис. 6 схематически изображен процесс разделения веществ А и Б путем экстракции с использованием пяти делительных воронок. Коэффициенты распределения (отношение концентрации вещества в более тяжелом растворителе к концентрации этого вещества в более легком растворителе) веществ А и Б соответственно равны  $\alpha_A=2$  и  $\alpha_B=0,5$ . Объемы растворителей в делительных воронках являются постоянными. Из рис. 6 видно, что вещества в результате такого процесса частично разделяются. Увеличение числа делительных воронок приводит к улучшению разделения. На рис. 7 представлена картина постепенного разделения веществ А и Б, получаемого при проведении процесса экстракции в десяти делительных воронках. Процесс разделения может быть продолжен и после заполнения всех делительных воронок путем отбора раствора в более легком растворителе в последней делительной воронке (метод одностороннего отбора). Состав этой «вытекающей фазы» (отбора) будет постепенно изменяться так, как это показано на рис. 8 для случая разделения на десяти делительных воронках. На рис. 9 приведен пример разделения смеси двух кислот (бензойной и *n*-толуидовой) после проведения 19, 28 и 42 операций экстракции. На этом рисунке по оси ординат отложена общая концентрация обеих кислот, выраженная количеством щелочи, расходовавшейся при их титровании. На оси абсцисс указан порядковый номер делительной воронки, в которой определялась концентрация кислот. На рисунке приведено изменение концентраций, соответствующее средним делительным воронкам. Этим делительным воронкам отвечают максимумы на кривой концентраций.



Р и с. 6. Схематическое изображение постепенного разделения двух веществ (А и Б) в пяти делительных воронках.

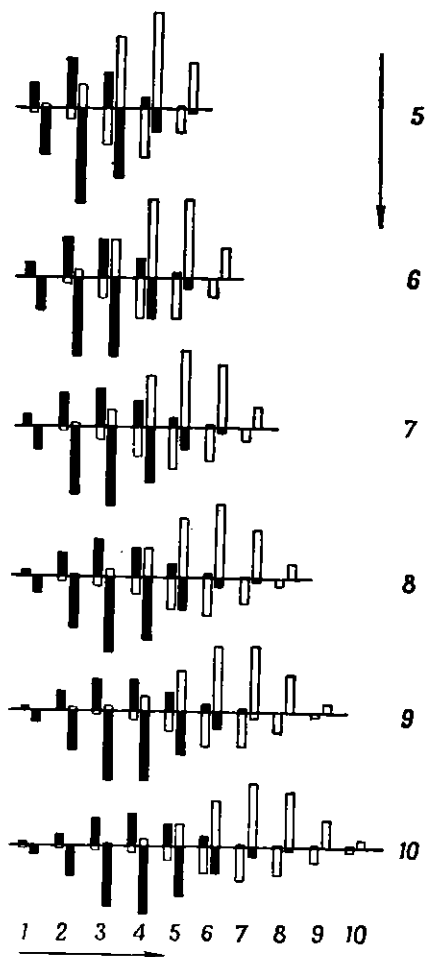
Справа представлена концентрация веществ в обеих фазах растворителей, находящихся в делительных воронках. ■ концентрация вещества А; □ концентрация вещества Б. Верхняя половина каждого рисунка соответствует более легкой фазе, а нижняя — более тяжелой.

Эффективность разделения двух веществ в процессе многократного повторения операции экстракции будет определяться коэффициентом разделения  $\beta$ . Коэффициент разделения представляет собой отношение коэффициентов распределения обоих веществ ( $\beta = \alpha_A/\alpha_B$ ). Эффективность разделения будет тем выше, чем больше отличается от единицы коэффициент разделения. На основании теории можно подсчитать число делительных воронок, необходимых для практически полного разделения двух веществ. Так, при  $\beta = 2$  для такого разделения (до чистоты 99,7%) потребуется 292 делительные воронки (ячейки).

Если число экстракционных ячеек (делительных воронок) увеличивается, то проведение такого процесса вручную становится невозможным. В этом случае необходимо использовать специальные устройства.

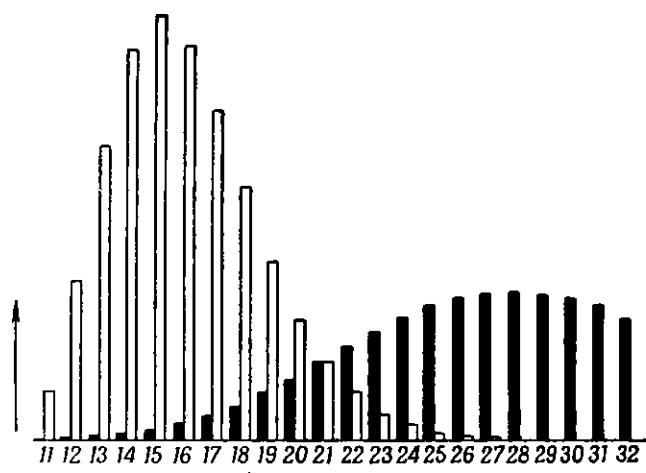
Дальнейшее развитие было достигнуто за счет автоматизации этих устройств. В настоящее время различные модификации метода противоточного распределения нашли широкое применение в аналитической и препаративной химии.

Мартин и Синг [3, 4] создали экстракционный аппарат, основанный на принципе противотока; они обнаружили, что число теоретических тарелок (ячеек) нельзя увеличивать неограниченно. Тогда они решили сделать одну из фаз неподвижной, закрепив ее на каком-либо твердом носителе, а другой фазе дать возможность непрерывно протекать через неподвижную фазу. Для

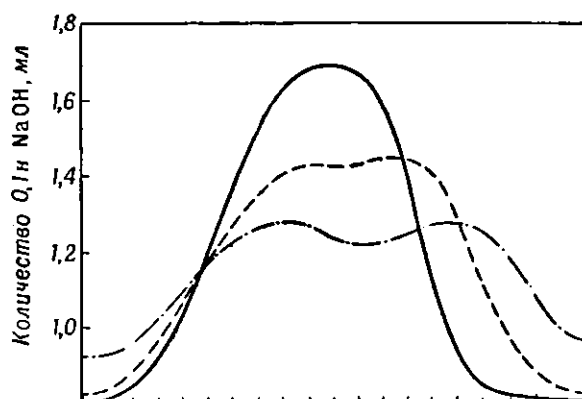


Р и с. 7. Отношение концентраций при проведении разделения в десяти делительных воронках, начиная с шестой операции извлечения (продолжение процесса, представленного на рис. 6).

того чтобы ускорить достижение равновесного распределения, неподвижную фазу закрепляют на носителе с большой поверхностью так, чтобы растворенные вещества при диффундировании к границе между фазами преодолевали незначительные расстояния. Так возникла распределительная хроматография. Сначала в качестве носителя неподвижной фазы использовали силикагель. Однако его высокая и плохо воспроизводимая адсорбционная способность явилась помехой в некоторых случаях разделения. Поэтому были выбраны другие носители. Для набивки колонок наиболее пригодными оказались инфузорная земля, крахмал и порошкообразная целлюлоза, для листовой формы носителя — бумага.



Р и с. 8. Состав верхней фазы в десятой делительной воронке (продолжение процесса, представленного на рис. 7).



Р и с. 9. Разделение бензойной и *p*-толуиловой кислот в 19 (————), 28 (-----) и 42 (— · —) делительных воронках (по данным Крейга).

## КЛАССИФИКАЦИЯ И ПРИНЦИПЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Различными авторами было предложено несколько довольно удобных классификаций хроматографических методов; эти классификации основаны на характеристике сил, действующих между частицами разделяемых веществ и подвижной или неподвижной фазой. Весьма интересна, например, классификация Мейнхарда. Однако для облегчения ориентировки в литературе будем руководствоваться общепринятыми категориями, хотя они и не всегда последовательны. Классификация хроматографических методов проводится обычно или на основании способа образования и проявления хроматограмм, или на основании характера сил, действующих между растворенными веществами и приведенной в соприкосновение с ними жидкой или твердой фазой, т. е. на основании функции разделения, зависящей от характера этих сил.

## КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ НА ОСНОВАНИИ ФУНКЦИИ РАЗДЕЛЕНИЯ

Сами по себе процессы разделения независимо от того, проводятся ли они вдоль по потоку или противоточно, не приводят к достаточно высокой степени разделения. Для повышения эффективности процессов разделения, которые основываются на весьма различных принципах, были использованы разные хроматографические методы.

### Адсорбционная хроматография

Адсорбционная хроматография основывается на непрерывном установлении равновесия между молекулами, адсорбированными на поверхности твердой фазы (порошки или волокна), и молекулами, растворенными в протекающей жидкости, или молекулами проходящей газообразной смеси (рис. 10, А). Иногда в случае хроматографии на бумаге

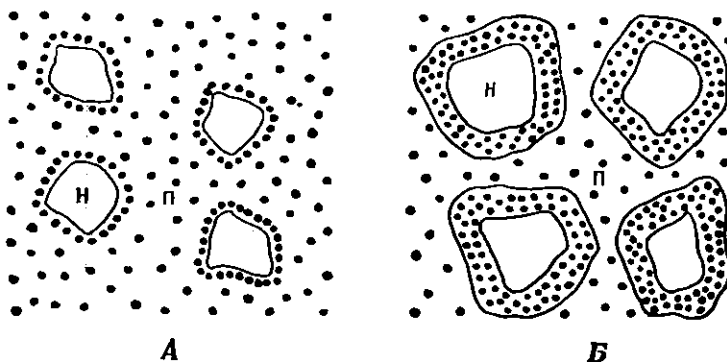


Рис. 10. Схематическое изображение адсорбции (А) и распределения между двумя жидкими фазами (Б).

П — подвижная фаза; Н слева — неподвижная фаза; Н справа — твердый носитель неподвижной жидкой фазы.

разделение, несомненно, осуществляется благодаря избирательной адсорбции. В качестве примера можно привести разделение стероидов на чистой фильтровальной бумаге или на бумаге, пропитанной гидроксидом алюминия, при использовании в качестве элюирующего агента сухого бензина. Часто имеет место сочетание адсорбционного принципа с распределительным. Функция разделения при адсорбционной хроматографии является изотермой адсорбции (см. стр. 70). Изотерма адсорбции в большинстве случаев нелинейна. Это, как правило, приводит к тому, что относительное положение пятен на таких адсорбционных хроматограммах сильно зависит от количества вещества в пятне, причем один край пятна (обычно передний) получается резким, а другой — размытым.

### Распределительная хроматография

Распределительная хроматография имеет дело с распределением вещества между двумя жидкими фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна. Вещество присутствует в обеих фазах в виде раствора. О системе жидкость — жидкость можно говорить, если твердый носитель жидкой фазы не вступает во взаимодействие с этой жидкостью, которое

может существенно изменить свойства жидкости. Применение твердого носителя обусловливается стремлением сделать одну из жидких фаз неподвижной (см. рис. 10, Б). В качестве неподвижной фазы чаще всего используют воду; органические растворители применяют реже. Если в качестве неподвижной фазы используются органические растворители, то они должны быть более полярными, чем жидкость подвижной фазы. При использовании же так называемых обращенных фаз они должны быть менее полярными, чем подвижная фаза. В системе жидкость—гель неподвижной фазой является гель, состоящий из образованной мицеллами коллоида пространственной сетки и жидкости, которая связана с этой сеткой.

Преимуществом распределительной хроматографии является линейность функции разделения, которая в данном случае соответствует закону распределения Нернста (см. стр. 73). Независимость коэффициента распределения от концентрации вещества в обеих несмешивающихся между собой жидкостях приводит к симметричной форме зон и к тому, что положение пятен почти не зависит от концентрации веществ.

Хотя не всегда ясно, какой из этих двух механизмов имеет место при хроматографировании на бумаге (см. стр. 74, 75), все-таки можно сказать, что большинство случаев хроматографирования на бумаге основывается на принципе распределительной хроматографии.

Приводимые далее подразделения этой классификации уже не являются такими же общепризнанными. Те случаи разделения, для которых функция разделения согласуется с законом Гульдберга и Вааге, можно было бы объединить в группу «химической хроматографии». В таком случае сюда было бы естественным отнести и ионный обмен. Однако в литературе нет единого мнения, к какому хроматографическому методу следует отнести ионный обмен. Так, например, раньше ионный обмен называли «обменной адсорбцией». Методика проведения ионного обмена отлична от других методик, применяющихся в хроматографии, поэтому ее часто рассматривают отдельно. Мы также будем рассматривать ионный обмен отдельно от других методов хроматографии.

### Химическая хроматография

Под химической хроматографией подразумевается случай, когда связь между разделяемыми веществами и неподвижной фазой особенно прочна, как, например, при разделении неорганических веществ на бумаге, пропитанной комплексообразователями. Зависимость положения зоны вещества от его концентрации четко выражена. Определенный интерес представляют «окислительно-восстановительные смолы», которые можно использовать для пропитки бумаги. Этот метод (так называемая электронообменная хроматография) был использован в работе Кассиди и сотр. [2].

Особым случаем химической хроматографии является осадочная хроматография (Гапон и Беленькая). При осадочной хроматографии разделяемую смесь солей пропускают через носитель, пропитанный раствором осадителя. Разделение происходит в соответствии со значениями величин произведений растворимости осадков, образующихся при взаимодействии ионов осадителя с ионами разделяемых солей. Так, например, если через столбик носителя, пропитанного раствором серноокислого серебра, пропускать смесь хлорида натрия и хромата калия, происходит образование верхней зоны, содержащей осадок хлорида серебра, и нижней зоны, содержащей осадок хромата серебра. При дальнейшем проявлении зоны передвинутся дальше по колонке.

## Ионный обмен

При применении этого метода разделения чаще всего используются колонки, заполненные ионообменными смолами. Эти смолы обладают способностью заменять свои катионы или анионы на соответствующие ионы из раствора. Эта способность объясняется тем, что при определенных условиях ионы, находящиеся в растворе, имеют большее сродство к иониту, чем ионы, принадлежавшие первоначально этому иониту. Твердый остов катионообменника или анионообменника является как бы большим анионом или катионом, связывающим с разной силой ионы обратного знака. При хроматографии на бумаге карбоксильные группы окисленной целлюлозы могут вести себя как катионообменники (см., например, Шуте). Если целлюлозу подвергнуть различной химической обработке, из нее можно приготовить более сильные катиониты или аниониты. Кроме того, бумагу можно непосредственно пропитывать ионообменными смолами. Во всех случаях разделения с использованием осаждения фактически мы имеем дело с обменом ионов между веществами, находящимися в растворе, и солями, закрепленными на носителе.

## Другие методы

Метод *высаливательной хроматографии*, предложенный Тизелиусом [1] для разделения белков, был испытан при разделении красителей, находящихся в коллоидном состоянии. По существу в этом методе не используется какой-либо новый принцип. Высаливательная хроматография основана на увеличении адсорбционной способности или повышении коэффициента распределения вещества за счет уменьшения его растворимости в подвижной фазе. Этот метод пригоден, например, для разделения веществ, которые в виде растворов в воде или в разбавленных растворах электролитов плохо адсорбируются или даже совсем не адсорбируются на поверхности твердого носителя, но растворимость которых соответствующим повышением концентрации электролита или органического компонента понижается таким образом, что адсорбция начинает преобладать над растворимостью. Вещества, которые легче высаливаются или лучше адсорбируются, образуют передние зоны. Поскольку этот метод применяют главным образом для разделения белков, он будет рассмотрен более подробно в специальной главе (стр. 498).

Название *электрохроматография* было предложено для случая разделения, при котором вещества, несущие электрический заряд, переносятся по колонке или листу бумаги не током растворителя, а действием электрического поля. Частицы будут разделяться в соответствии с их адсорбционной способностью и подвижностью в электрическом поле. Метод, в котором в качестве пористого носителя используется бумага, называется *электрофорезом* (ионофорезом) на бумаге. Метод электрофореза на бумаге уже не относится к обычным методам хроматографии на бумаге. Это объясняется тем, что основным фактором, обуславливающим разделение при электрофорезе на бумаге, является различие в подвижности частиц в электрическом поле.

*Электрокинетический ультрафильтрационный анализ.* Известно, что из химически родственных полимеров или поликонденсатов более сильно адсорбируются те вещества, которые имеют больший молекулярный вес. Однако вследствие того, что многие адсорбенты и носители имеют сетчатую структуру, это правило не выполняется. Если через

хроматографическую колонку, заполненную таким адсорбентом, пропускать вещества с большим молекулярным весом, то адсорбция этих веществ в колонке практически происходить не будет. По этой причине Моулд и Синг использовали пленку коллодия, поры которой имели нужные размеры. Движение жидкости вдоль пленки коллодия происходило за счет электроосмоса. При прохождении через поры коллодия растворов полисахаридов, имеющих разную длину цепи, полисахариды разделяются с образованием видимых зон. В этом случае молекулы больших размеров действительно адсорбируются лучше. В этом методе, как и при хроматографии на бумаге, используется носитель листовой формы. При приготовлении носителя из целлюлозы последняя должна быть в этом случае обработана соответствующим образом.

*Комбинирование различных принципов.* Мы уже отмечали, что различные процессы, приводящие к разделению, могут действовать одновременно. На бумаге иногда имеет место как распределение между двумя жидкими фазами, так и адсорбция. Здесь силы, определяющие разделение, действуют в одном направлении. Однако можно сделать так, чтобы направления действия этих сил были взаимно перпендикулярными. Такой случай можно, например, осуществить, если в направлении, перпендикулярном направлению движения раствора (направление процесса разделения, основанного на различном распределении веществ между двумя фазами), приложить электрическое поле (процесс разделения, основывающийся на различной подвижности заряженных частиц в электрическом поле). Различные возможности таких комбинаций были рассмотрены Стрейном и Мерфи [2].

В общем можно сказать, что рассмотренная классификация, как, впрочем, и всякая классификация, является весьма субъективной. Рачинский, например, объединяет в одну группу распределительную и адсорбционную хроматографии (для случая молекулярной адсорбции), так как в обоих случаях действуют силы молекулярного взаимодействия. Очень часто различные силы действуют одновременно. В этом случае общий характер процесса разделения несет на себе отпечаток действия обеих сил. В качестве примера можно привести хроматографию на бумаге. Иногда трудно решить, следует ли отнести какую-либо рабочую методику к определенной группе или же ее нужно выделить в самостоятельную группу. С таким случаем мы столкнулись на примере ионного обмена. Несмотря на это, приведенная классификация нашла широкое применение. Необходимо отметить, что эта классификация позволяет легко отнести различные рабочие методики к той или иной группе. Мы также будем придерживаться этой классификации.

#### КЛАССИФИКАЦИЯ<sup>1)</sup> ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ НА ОСНОВАНИИ СПОСОБА ОБРАЗОВАНИЯ ХРОМАТОГРАММ

Хроматография на бумаге использует в сущности только элюентное проявление<sup>1)</sup>, однако здесь также могут иметь место явления, которые легче понять, зная остальные способы образования хроматограмм.

<sup>1)</sup> В оригинале для обозначения процесса пропускания растворителя как по бумаге, так и через колонку с целлюлозным порошком или иным наполнителем используется термин «*uvviijene*», т. е. «проявление» (соответствующий английскому «*development*» и немецкому «*Entwicklung*»). «Проявление» приводит к разделению налагающихся друг на друга зон «первичной» хроматограммы и в случае колоночной

### Фронтальный анализ

При фильтровании раствора смеси веществ через адсорбционную колонку из нее в первую очередь вытекает растворитель, затем растворитель в смеси с наименее адсорбирующимся веществом, затем фракция, содержащая растворитель с первыми двумя наименее адсорбирующимися веществами, и т. д. (см. стр. 57 и рис. 19, а). Состав вытекающей жидкости можно анализировать непрерывно, определяя, например, показатель преломления, который увеличивается ступенчато по мере появления фронтов отдельных компонентов. Неудобство метода состоит в том, что в чистом виде можно получать только наименее адсорбирующиеся вещества. Достоинством метода можно считать незначительное потребление растворителя при выделении больших количеств веществ. Из методов хроматографирования на фильтровальной бумаге к этой категории можно также отнести капиллярный анализ в том первоначальном виде, который был предложен Шенбейном. Однако фронтальный анализ применяется и при обычной распределительной хроматографии, правда, не столько для разделяемых веществ, сколько для самой смеси растворителей. Вода и другие вещества, обладающие большим сродством к целлюлозе, задерживаются в тех частях хроматограммы, которые находятся ближе к источнику растворителя, в то время как по направлению к фронту смесь относительно обогащается менее полярным компонентом. Иногда можно наблюдать второй фронт (например, при комбинировании бутанола с соляной кислотой), в других же случаях переход является непрерывным.

### Элюентное проявление

При фронтальном анализе исследуемый раствор подают сверху, а затем пропускают его через адсорбент. В элюентном анализе образец сначала наносят на верхний конец столбика сорбента (или близко от верхнего конца), после чего через колонку пропускают чистый растворитель. При хроматографии на бумаге применяют, как правило, элюентный анализ. В этом случае первая стадия состоит в нанесении образца на бумагу в виде маленькой капли или поперечной черточки. На следующей стадии производится хроматографирование чистым растворителем или смесью растворителей. Цвет назвал эту стадию проявлением в связи с тем, что в процессе этой операции происходит разделение перекрывавшихся сначала (в стадии фронтального анализа) зон. Зоны, содержащие отдельные компоненты смеси, разделяются настолько, что между ними образуются пустые промежутки (см. стр. 58 и рис. 20). При хроматографии на бумаге редко применяют метод, при котором производят постепенную замену проявляющих агентов с целью последовательного увеличения полярности проявителя от наименьшей («слабый» проявитель) к большей («сильный» проявитель) (см. стр. 113—115 и табл. 9 и 10). Этот метод широко применяют в колоночной хроматографии. При его использовании можно добиться хорошего разделения не только более слабо адсорбированных веществ, но и веществ, адсорбированных более сильно. На этот метод в какой-то

хроматография—к их последовательной элюции из колонки. В отечественной литературе термин «проявление» используется также для обозначения процесса обработки хроматограммы на бумаге тем или иным реактивом («проявителем»), образующим с анализируемыми веществами окрашенные производные. В оригинале для этой цели применяется термин «detekcija» (в английской литературе — «spray», в немецкой — «Sprüher», т. е. опрыскивание). При переводе использована терминология, установившаяся в отечественной литературе.— *Прим. ред.*

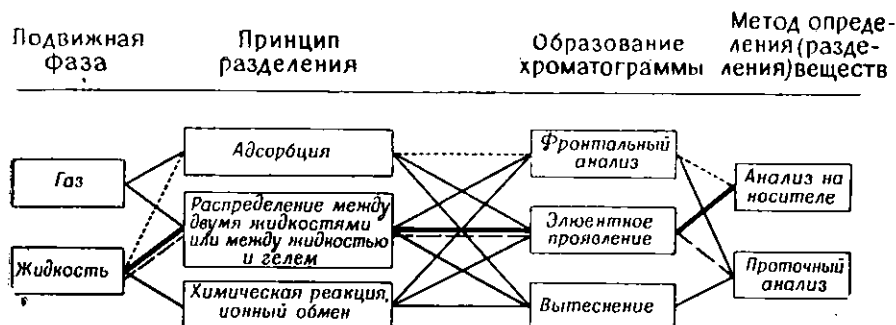
степени похож метод так называемого повторного пропускания растворителя, который применяют в хроматографии на бумаге (см. стр. 132).

Постепенным изменением состава подаваемого раствора можно создать непрерывный или ступенчатый градиент состава подвижной фазы.

В хроматографии на бумаге о градиентном хроматографировании мы говорим в том случае, если вдоль листа бумаги происходит непрерывное изменение состава элюирующего агента. Такой градиент может быть создан преднамеренно (см. стр. 139). Однако часто он возникает и без нашего вмешательства. Это происходит в том случае, если сам применяемый растворитель подвергается фронтальному анализу или если некоторые из растворителей, используемых в смеси, заметно испаряются.

### Вытеснительное проявление

Функции разделения для смесей веществ (особенно при высоких концентрациях последних) не являются независимыми величинами. Так, в процессе адсорбции смеси веществ может иметь место конкурентная



Р и с. 11. Схема классификации хроматографических методов.

— возможность комбинирования; — распределительная хроматография на бумаге; — — — распределительная хроматография на колонке; — — — капиллярный анализ в соответствии с обычными представлениями.

адсорбция, при которой вещества, адсорбирующиеся более сильно, будут вытеснять вещества, которые адсорбируются слабее (см. рис. 20 и 21). Это приводит к лучшему разделению. Зоны получаются менее размытыми. Однако при хроматографировании на бумаге вытеснение какого-либо вещества другим веществом, присутствующим в большом избытке, иногда совершенно изменяет положение и форму пятен и тем самым искажает хроматограмму.

Собственно вытеснительное проявление и вытеснительное проявление с носителем (стр. 57) являются удобными методами для препаративного выделения больших количеств веществ в колонках, так как применение этих методов позволяет ограничиться небольшим расходом растворителя.

Для наглядности можно привести схему, изображенную на рис. 11. Из этой схемы также видно, что обе приведенные классификации хроматографических методов взаимно независимы и совершенно не исключают друг друга. Тонкими сплошными линиями обозначены возможные комбинации различных принципов и методов; более жирными линиями — комбинации, чаще всего встречающиеся в хроматографии на бумаге; пунктирными линиями обозначен капиллярный анализ. Под проточным анализом

подразумевается способ, при котором анализируют смесь, вытекающую из носителя (аналогия см. рис. 8); под анализом на носителе — способ, при котором анализ веществ осуществляют непосредственно на носителе.

## ПРОБЛЕМЫ ТЕОРИИ ХРОМАТОГРАФИИ

С хроматографией на бумаге связано большое число разнообразных теоретических вопросов. В основном эти вопросы можно разделить на две группы. К одной группе относятся вопросы, связанные с образованием и изменениями концентрационного распределения веществ в бумаге при хроматографическом процессе. Вторая группа включает вопросы, связанные с сущностью функций разделения и влиянием структуры веществ (разделяемых веществ, растворителей, иногда и носителей, например целлюлозы) на эту функцию. Иными словами, к этой группе относятся вопросы, связанные с выяснением влияния строения на хроматографическое поведение веществ. В соответствии со сказанным будет разделена и настоящая глава.

К *первой группе вопросов* прежде всего относятся вопросы, касающиеся самого движения чистых растворителей. Хотя для другой среды (и изолированной системы) эти вопросы рассмотрены подробно, работ, относящихся к бумаге, совсем мало. Поэтому вопросы, связанные с движением растворителей, будут рассмотрены очень кратко — в виде дополнения ко второй части этой главы (стр. 62).

К этой же группе относятся вопросы, связанные со скоростью установления равновесия в системе. Эти вопросы также иногда рассматривают в общих монографиях по хроматографии. В нашей книге мы их рассматривать не будем. Это связано с тем, что в монографии трудно выйти за рамки элементарных рассуждений из области кинетики реакций, так как решение даже частных случаев требует использования сложного математического аппарата (см., например, работу Находа). С другой стороны, в случае хроматографии на бумаге можно допустить (в большинстве случаев так и делают), что равновесие устанавливается мгновенно.

Главной проблемой первой группы вопросов является решение уравнения так называемого условия сохранения количества вещества (стр. 45). Это решение приводит к уравнениям, позволяющим вычислить концентрации разделяемого вещества в обеих фазах в зависимости от количества протекшей жидкости и расстояния от начала колонки, а следовательно, и к уравнениям для значений  $R_f$ . Все выводы, которые будут получены для колонок, равным образом могут быть отнесены и к листу бумаги. Основные уравнения можно представить как в виде дифференциальных уравнений, так и в виде уравнений в конечных разностях. Таким образом, решение основного уравнения может быть осуществлено двумя способами<sup>1)</sup>. Эти решения будут приведены в кратком виде. Решения общих случаев приведены не будут. Для частных случаев, более сложных, чем те, которые приведены на стр. 50 и далее, даны только более или менее приближенные решения. Точные решения этих задач связаны с большими математическими трудностями, поэтому в таких случаях мы должны ограничиться только ссылками на оригинальные работы.

---

<sup>1)</sup> Подробное решение уравнения условия сохранения количества вещества дано в первом издании этой монографии.

Вторая группа вопросов будет обсуждена в третьей части этой главы. Здесь речь пойдет прежде всего о характере сил взаимодействия между частицами и окружающей их средой (раствором). Поскольку эти вопросы подробно рассматриваются в учебниках физической химии и специальных монографиях, мы остановимся на них лишь вкратце. По тем же причинам не приведены подробные выкладки при выводе уравнений функции разделения, применяющихся для описания процессов, которые имеют место при хроматографии на бумаге.

Основным вопросом этой группы является вопрос о влиянии химического строения веществ на их хроматографическое поведение. Для органических веществ этот вопрос рассмотрен в отдельном разделе третьей части этой главы, для неорганических веществ он рассмотрен на стр. 666.

Хотя в главе об основах и теории хроматографии мы и пытались рассмотреть в общих чертах большинство основных вопросов, с которыми приходится сталкиваться при хроматографии на бумаге, все-таки полностью исчерпать этот круг вопросов мы не смогли. Кроме того, по практическим соображениям часть этих вопросов будет рассмотрена в главе, посвященной общей технике хроматографии на бумаге, и в ряде глав специальной части книги.

## *Математическое описание хроматографического процесса*

### РЕШЕНИЕ ОСНОВНОГО УРАВНЕНИЯ ДЛЯ СИСТЕМЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ ОДИН КОМПОНЕНТ

Для того чтобы понять принципы различных видов хроматографии и их теорию, следует иметь представление о том, что общего у этих видов и чем они различаются. В основе хроматографии как метода разделения лежит принцип, который является общим для всех видов хроматографии. Этот принцип — условие сохранения количества вещества.

Количество вещества, которое перешло в процессе разделения (адсорбции, экстракции и т. п.) из одной фазы в другую, для первой фазы представляет собой убыль, а для второй, наоборот, прирост. Суммарное же изменение количества этого вещества равно нулю.

Впервые это основное условие хроматографии было сформулировано Вильсоном. В работах Мартина и Синга [4] этот принцип был принят безоговорочно. Затем формулировка Вильсона была уточнена Де-Вольфом, а позже Смитом.

Таким образом, условие сохранения количества вещества является общим принципом для всех видов хроматографии. Теперь отметим факторы, благодаря которым различные виды хроматографии отличаются друг от друга. Если отвлечься от различных экспериментальных условий, специфичных для различных методов хроматографии, то единственным существенным отличием одного вида хроматографии от другого будет характер процесса разделения. Последний может быть в свою очередь охарактеризован функцией разделения, вид которой и определяет харак-

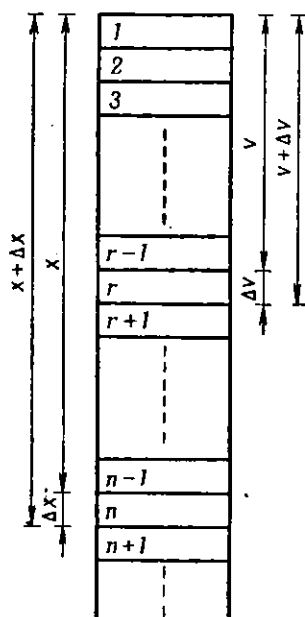
тер процесса разделения. Вид этих функций для различных процессов разделения будет, естественно, разным.

Теперь перейдем к количественному описанию общего процесса разделения, происходящего при хроматографировании. Для упрощения этого описания используем несколько допущений. Во-первых, будем считать, что вещество в подвижной фазе постоянно находится в равновесии с веществом в неподвижной фазе. Это условие говорит о том, что отношения концентраций веществ в обеих фазах, которые должны соответствовать данной функции разделения, устанавливаются практически мгновенно и что, следовательно, влияние скорости протекания раствора здесь не сказывается.

Во-вторых, будем считать, что диффузия не оказывает никакого действия на процесс разделения. Если в некоторых местах раствора концентрации вещества по каким-либо причинам отличаются друг от друга,

то диффузия всегда стремится выровнять это различие концентраций. То же происходит и в хроматографической колонке, если концентрации вещества в разных ее местах различаются. В дальнейшем это выравнивание концентраций, происходящее под влиянием диффузии, мы учитывать не будем.

Предположим, что мы имеем длинный цилиндр, заполненный порошкообразной неподвижной фазой (например,  $Al_2O_3$ ), и что через этот цилиндр протекает раствор какого-то вещества, выделяющегося из этого раствора и задерживающегося или на поверхности неподвижной фазы, или внутри нее. Вещество, попавшее таким образом на неподвижную фазу, снова растворяется в протекающем растворе, переносится им дальше и вновь задерживается в следующих слоях столбика неподвижной фазы.



Р и с. 12. Разделение столбика неподвижной фазы на элементарные слои высотой  $\Delta x$  и разделение потока протекающего растворителя на элементарные объемы  $\Delta v$ .

Разделим весь столбик по высоте на маленькие цилиндрики высотой  $\Delta x$  (рис. 12). Количество вещества, растворенное в объеме подвижной фазы, содержащейся в одном таком цилиндрике, обозначим через  $Q_{II}$ . Количество вещества, закрепленное в соответствующем объеме неподвижной фазы, обозначим через  $Q_{Н}$ . При описанном выше процессе величины  $Q_{II}$  и  $Q_{Н}$ , с одной стороны, зависят от положения элементарного цилиндрика  $i$ , следовательно, являются функциями расстояния  $x$  или  $r\Delta x$ , а с другой стороны, они зависят от общего объема раствора  $v$  (или объема чистого растворителя), прошедшего через колонку с момента начала эксперимента, фронт которого прошел расстояние  $r\Delta x$ . Таким образом, мы можем написать  $Q_{II}(x, v)$  и  $Q_{Н}(x, v)$  или  $Q_{Н}(c)$ , где  $c$  — концентрация вещества в подвижной фазе [так как  $c = c(x, v)$ ]. В этом случае уравнение условия сохранения количества вещества имеет следующий вид:

$$Q_{Н}(c) + Q_{II}(x - \Delta x, v) = Q_{Н}(c + \Delta c) + Q_{II}(x, v + \Delta v), \quad (1)$$

где объему  $\Delta v$  соответствует объем, который будет пройден жидкостью при перемещении ее фронта на расстояние  $\Delta x$ .

### ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ РЕШЕНИЕ

Для решения уравнения в дифференциальной форме преобразуем уравнение (1) так, чтобы выразить величины  $Q_{\Pi}$  и  $Q_N$  через концентрацию вещества в подвижной фазе. В этом случае имеем

$$Q_{\Pi}(x, v) = c(x, v) q_{\Pi} \Delta x = c(x, v) \Delta v, \quad (2a)$$

$$Q_N(c) = f^*(c) q_N \Delta x = f(c) M \Delta x, \quad (2b)$$

где  $q_{\Pi}$  — часть общего сечения цилиндра, приходящаяся на подвижную фазу;  $q_N$  — часть сечения, приходящаяся на неподвижную фазу;  $f^*(c)$  — функция разделения, показывающая, сколько вещества разделилось в единице объема носителя;  $f(c)$  — функция разделения, показывающая, сколько вещества разделилось на 1 г носителя;  $M$  — количество носителя в граммах, приходящееся на единицу длины колонки.

Уравнение (1) может быть преобразовано следующим образом (для  $\Delta x \rightarrow 0, \Delta v \rightarrow 0$ ):

$$\left( \frac{\partial c}{\partial x} \right)_v + [q_{\Pi} + M f'(c)] \left( \frac{\partial c}{\partial v} \right)_x = 0. \quad (3)$$

Уравнение (3) было выведено Де-Вольтом. Уравнение, первоначально данное Вильсоном, можно получить из уравнения (3), если пренебречь членом, в который входит величина  $q_{\Pi}$ . Уравнение (3) справедливо при любом виде функции разделения, однако только для систем, в которых имеется лишь одно растворенное вещество.

Общее решение уравнения (3) для концентрации вещества в подвижной фазе  $c(x, v)$  или также для  $x$  и  $v$  имеет вид

$$c(x, v) = \Phi \{v - [q_{\Pi} + M f'(c)]\}, \quad (4a)$$

или

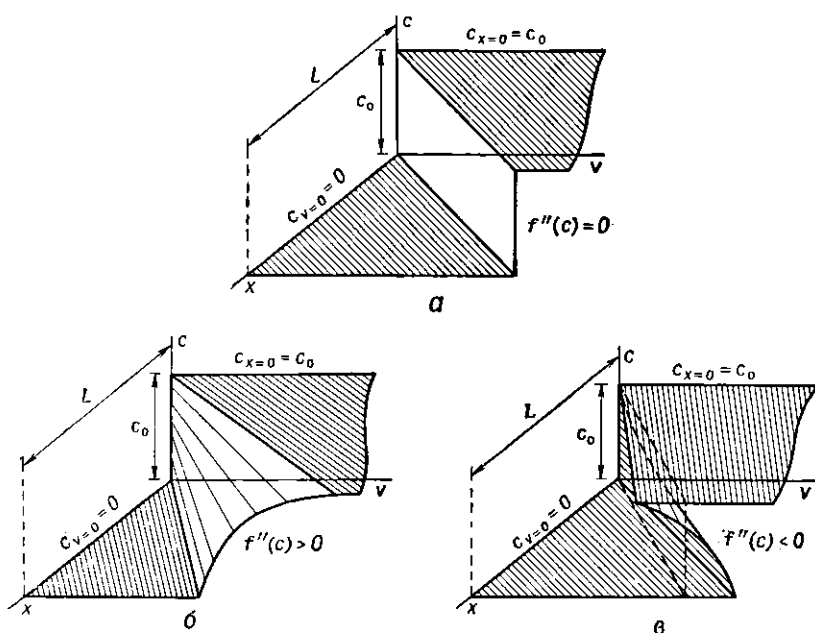
$$v = x [q_{\Pi} + M f'(c)] + S_v(c), \quad (4b)$$

или

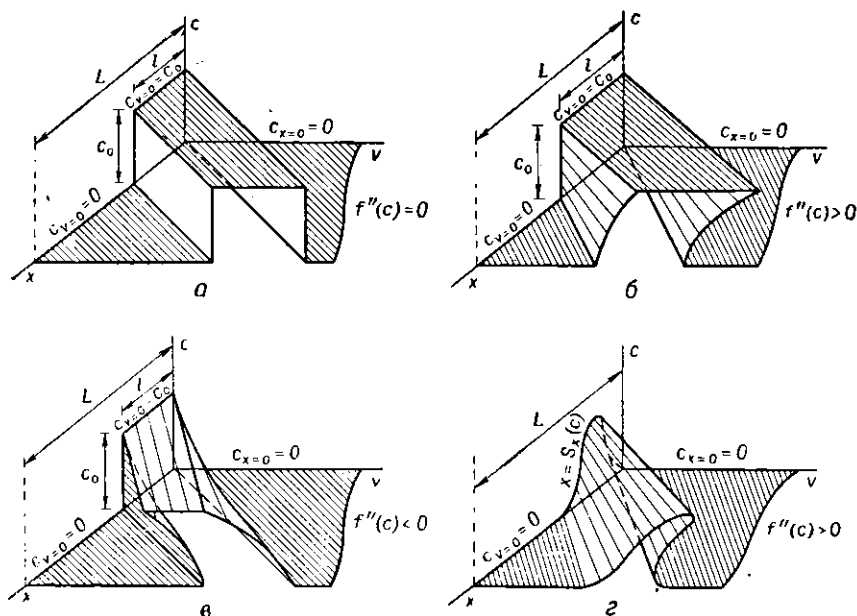
$$x = \frac{v}{q_{\Pi} + M f'(c)} + S_x(c), \quad (4в)$$

где  $\Phi$  — произвольная функция, вид которой определяется начальными и конечными условиями;  $S_x(c)$  и  $S_v(c)$  — произвольные функции концентрации  $c$ ; значения этих функций можно получить из уравнений (4б) и (4в), если взять  $x = 0$  (соответственно  $v = 0$ ):  $S_v(c) = v_{x=0}$ , соответственно  $S_x(c) = x_{v=0}$ . Аналогичные соотношения можно получить для  $f(c)$ , т. е. для количества вещества в неподвижной фазе.

В качестве наглядной иллюстрации уравнений (4а), (4б) и (4в) могут служить представленные на рис. 13 и 14 пространственные диаграммы, которые отражают взаимную зависимость переменных  $x$ ,  $v$ ,  $c$ . При фронтальном анализе в верхнюю часть колонки, заполненной чистым носителем ( $c_{v=0}$ ), наливают раствор постоянной концентрации  $c_0$  ( $c_{x=0} = c_0$ ). В зависимости от вида функции разделения возможно несколько различных случаев, которые изображены на рис. 13 и 15. При элюировании прямоугольной зоны шириной  $l$  чистым растворителем ( $c_{x=0} = 0$ ) вдоль колонки длиной  $L$  будем иметь дело со случаями, приведенными на рис. 14.

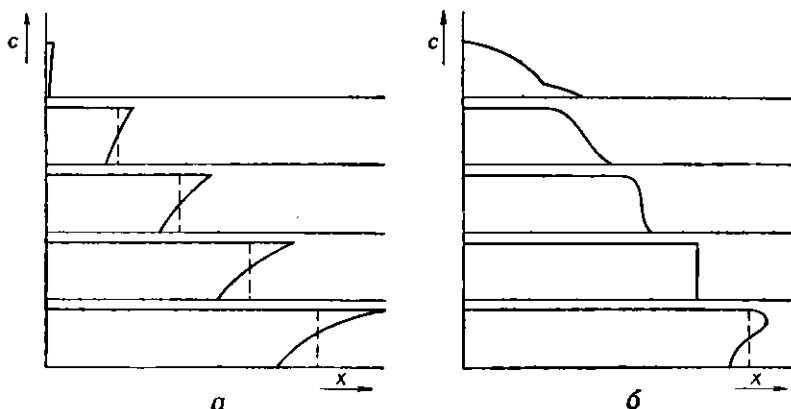


Р и с. 13. Графическое изображение фронтального анализа.  
*a* — при линейной функции разделения; *б* — при вогнутой функции разделения; *в* — при выпуклой функции разделения (прогиб, который по физическим причинам не может иметь места, заменен разрывом).



Р и с. 14. Графическое изображение элюирования зоны.  
*a* — при линейной функции разделения; *б* — при вогнутой функции разделения (задний край зоны резкий, передний край зоны размыт); *в* — при выпуклой функции разделения (задний край зоны размыт, передний край зоны резкий); *г* — при вогнутой функции разделения (первоначальное состояние размытой области).

Можно видеть, что при линейной функции разделения [ $f''(c) = 0$ ] граница между чистым растворителем и раствором перемещается без изме-



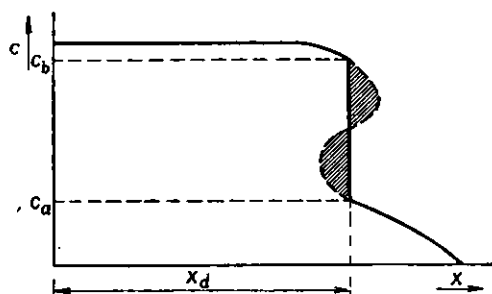
Р и с. 15. Образование разрывов на кривых  $c=c(x)$ .

Отдельным рядам соответствуют различные объемы  $v$  протекшего растворителя; величина этих объемов растет сверху вниз: *a* — разрывы, полученные в результате сечения плоскостью поверхности, изображенной на рис. 13, *в*; *б* — заострение зоны, распределение концентраций в которой имело сначала совершенно случайный характер.

нения. При нелинейной функции разделения получаем плоскости, имеющие прогиб, что с физической точки зрения является явным абсурдом. В действительности же образуется резкая граница, имеющая разрыв в точке, соответствующей расстоянию  $x_d$  (рис. 16). Для величины  $x_d$  можно вывести соотношение

$$x_d = \frac{vc_0}{q_{\Pi}c_0 + Mf(c_0)}. \quad (5a)$$

Р и с. 16. Образование разрыва на кривой  $c=c(x)$ .



При выпуклой функции разделения ( $f''(c) < 0$ ) заостряется передняя граница зоны, а при вогнутой функции разделения ( $f''(c) > 0$ ) — задняя граница<sup>1)</sup>. Если функция разделения является линейной [ $f(c_0) = a_1c_0$ ], то

<sup>1)</sup> Для того чтобы получить более конкретное представление о процессе заострения границы зоны, перепишем уравнение материального баланса (1) так, чтобы объем  $v$  заменить временем  $t$ :

$$\left(\frac{\partial c}{\partial x}\right)_v = [q_{\Pi} + Mf'(c)] \frac{1}{w} \left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_x = 0, \quad (6a)$$

где  $w$  — объемная скорость жидкости ( $dv = wdt$ ). Это уравнение можно также записать так:

$$\left(\frac{\partial x}{\partial t}\right)_c = \frac{w}{q_{\Pi} + Mf'(c)}. \quad (6б)$$

Если теперь меньшим значениям  $c$  будут соответствовать большие значения  $f'(c)$  (функция разделения является выпуклой), то, как это видно из уравнения (6б), веще-

для расстояния  $x_d$ , на которое перемещается зона, можно получить соотношение

$$x_d = \frac{v}{q_{II} + \alpha_1 M}, \quad (56)$$

которое близко к теории Мартина и Синга.

### РЕШЕНИЕ В КОНЕЧНЫХ РАЗНОСТЯХ

Уравнение (1) как уравнение в частных разностях можно также решить конечно-разностным методом.

Этот способ решения является основой теории Мартина и Синга. Для упрощения решения выведенного ими из уравнения (1) уравнения в конечных разностях Мартин и Синг сделали ряд допущений. Единственное различие между теорией Мартина и Синга, которую применяют специально для распределительной хроматографии, и теорией Де-Вольта, использующейся при адсорбционной хроматографии, заключается в способе решения уравнения, отражающего условие сохранения количества вещества. Если первые для решения этого уравнения использовали метод конечных разностей, то последний для этой же цели использовал дифференциальное исчисление. Следует отметить, что теория Мартина и Синга действительна лишь для частного случая, когда функция разделения линейна.

Введем для упрощения следующие обозначения:  $x = n\Delta x \equiv n$  и  $v = r\Delta v \equiv r$ . Величины  $\Delta x$  и  $\Delta v$  в отличие от предыдущего случая, когда уравнение (1) решали как дифференциальное, являются конечными величинами. Запишем уравнение (1) в следующем виде:

$$Q_{II}(n, r+1) = \frac{Q_{II}(n-1, r) + Q_{II}(n, r)G^*(n, r)}{1 + G^*(n, r)} \quad (7a)$$

или

$$Q_{II}(n, r+1) = \frac{Q_{II}(n-1, r) + Q_{II}(n, r)G^{-1}(n, r)}{1 + G^{-1}(n, r)}, \quad (76)$$

где

$$G(n, r) = \frac{Q_{II}(n-1, r) - Q_{II}(n, r+1)}{Q_{II}(n-1, r) - Q_{II}(n, r+1)}$$

ство в местах меньшей концентрации будет отставать. Если же какая-либо часть вещества, находящегося у передней границы зоны, опередит эту границу, то эта часть вещества попадет в места меньшей концентрации и скорость ее упадет, после чего она снова соединится с остальным веществом зоны. У задней границы то же явление будет, по-видимому, способствовать размыванию: отстающие частицы будут попадать в места еще меньшей концентрации и их скорость будет падать еще больше. При  $f''(c) > 0$  у обеих границ будут наблюдаться обратные картины.

Точно так же можно представить себе, почему при вытеснительном проявлении происходит сокращение размытых задних границ зон. Это связано с тем, что скорость перемещения различных веществ в неподвижной фазе зависит от присутствия других веществ. Когда частицы, находящиеся у размытой задней границы, догоняют фронт вытесняющего вещества, эти частицы попадают в такое положение, при котором они как бы находятся в большей концентрации. Это приводит к тому, что частицы начинают перемещаться быстрее.

и

$$G^*(n, r) = \frac{Q_H(n, r+1) - Q_H(n, r)}{Q_H(n, r+1) - Q_H(n, r)}$$

представляют собой определенные функции разделения, которые при переходе к бесконечно малым величинам приобретают следующий вид:

$$G(x, v) = \frac{1}{f'(c)} \cdot \frac{q_H}{M} \quad \text{и} \quad G^*(x, v) = f'(c) \frac{M}{q_H}.$$

Уравнения (7а) и (7б) являются для  $Q_H(n, r)$  и  $Q_H(n, r)$  рекуррентными формулами, которые при выборе соответствующих граничных условий позволяют вычислить общие члены  $Q_H(n, r)$  и  $Q_H(n, r)$ .

Решение общего уравнения является слишком сложным. Поэтому в дальнейшем мы возьмем упрощенное выражение, при выводе которого использованы те же допущения, что и у Мартина и Синга и у Консдена с сотрудниками. Общий член  $Q_H(n, r)$  будем приводить лишь для более простых случаев. Примем  $Q_H(0, r) = 0$ . Это условие означает, что над столбиком носителя находится чистый растворитель. Затем будем считать, что  $Q_H(1, 0) = Q$  и что для всех последующих  $n > r$   $Q_H(n, r) = 0$ , т. е. что все вещество содержится в первом элементарном слое столбика носителя, а все последующие слои пустые, поскольку в них еще не проник элюирующий раствор ( $n > r$ ). Функцию разделения выбираем линейной так, чтобы отношение  $Q_H(n, r)/Q_H(n, r) = G(n, r) = \delta$  не зависело от  $n$  и  $r$ . Кроме того, обозначим

$$\frac{1}{1 - G^{-1}(n, r)} = \gamma,$$

так что

$$\frac{G^{-1}(n, r)}{1 + G^{-1}(n, r)} = 1 - \gamma;$$

$$\delta = \frac{\gamma}{1 - \gamma} \quad \text{и} \quad \gamma = \frac{\delta}{1 + \delta}; \quad 1 - \gamma = \frac{1}{1 + \delta}. \quad (8)$$

После подстановки соотношений (8) в уравнение (7б) получаем

$$Q_H(n, r+1) = (1 - \gamma) Q_H(n, r) + \gamma Q_H(n-1, r). \quad (9)$$

Результаты, полученные для отдельных  $Q_H(n, r)$ , приведены в табл. 2.

Таблица 2

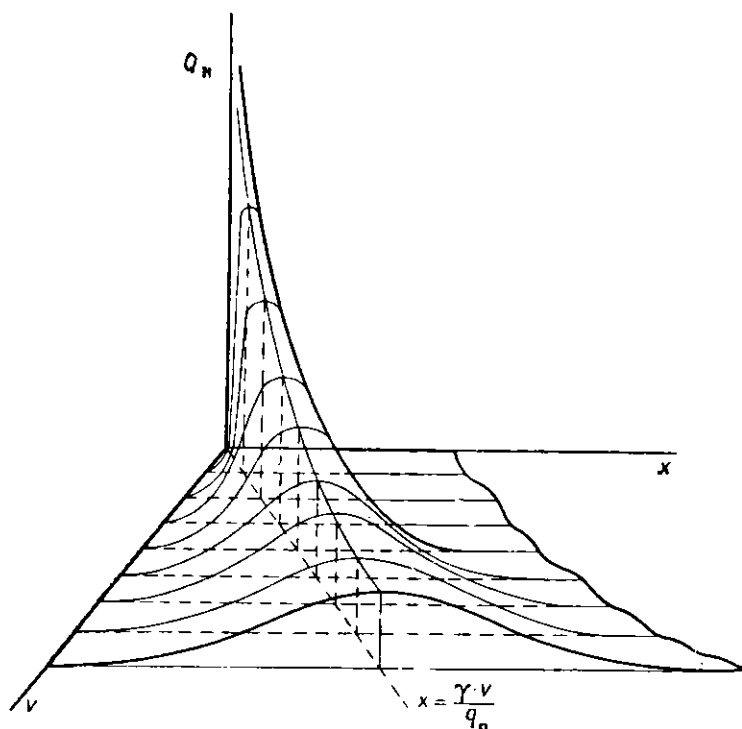
КОЛИЧЕСТВА ВЕЩЕСТВА В НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЕ,  
ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВАНИИ УРАВНЕНИЯ (9)

$n \backslash r$	1	2	3	4	5
1	$Q(1 - \gamma)$	0	0	0	0
2	$Q(1 - \gamma)^2$	$Q\gamma(1 - \gamma)$	0	0	0
3	$Q(1 - \gamma)^3$	$2Q\gamma(1 - \gamma)^2$	$Q\gamma^2(1 - \gamma)$	0	0
4	$Q(1 - \gamma)^4$	$3Q\gamma(1 - \gamma)^3$	$3Q\gamma^2(1 - \gamma)^2$	$Q\gamma^3(1 - \gamma)$	0
5	$Q(1 - \gamma)^5$	$4Q\gamma(1 - \gamma)^4$	$6Q\gamma^2(1 - \gamma)^3$	$4Q\gamma^3(1 - \gamma)^2$	$Q\gamma^4(1 - \gamma)$

Каждый горизонтальный ряд, соответствующий определенному  $r$ , состоит из членов, которые, будучи умноженными на выражение  $(1 - \gamma)^{-1}$ , дадут биномиальный ряд, общий член которого имеет вид

$$Q_H(n, r) = \gamma^{n-1} (1 - \gamma)^{r-n+1} \binom{r-1}{r-n} Q. \quad (10)$$

Вещество, присутствовавшее сначала в первом слое в количестве  $Q$ , распространилось теперь по всей колонке. Величины  $Q_H(n, r)$ , получившиеся в результате такого распространения вещества, будут различными



Р и с. 17. Поверхность  $Q_H(x, v)$ , изображающая элюирование зоны (получена на основании результатов решения основного уравнения в конечных разностях).

для разных мест колонки. Величина  $Q_H(n, r)$  приобретает при данном  $n$  максимальное значение в том случае, если

$$(n-1)/r \leq \gamma \leq (n-1)/(r-1),$$

а при данном  $r$  — в случае, если  $\gamma r \leq n \leq \gamma r + 1$ . Максимум зависимости  $Q_H(n, r)$  [соответственно  $Q_H(n, r)$ ] от  $x$  и  $v$  проходит, следовательно, через точки с координатами  $(x, v)$ . Связь между этими координатами выражается с помощью соотношения

$$x = \frac{\gamma}{q_H} v. \quad (11)$$

Значение максимума определяется по формуле

$$Q_H(n, r)_{\text{макс.}} = Q \sqrt{\frac{1-\gamma}{2\pi n}}. \quad (12)$$

Характер указанной зависимости показан на рис. 17.

ВЕЛИЧИНА  $R_f$ 

Уравнение (11) дает положение максимума  $Q_H(x, v)$  для данного объема  $v$ . Положение максимума определяется произведением  $q_{II}x_K$ , где  $x_K$  — расстояние, на которое проник в колонку элюирующий раствор. Отношение  $x_M/x_K$ , где  $x_M$  — положение максимума концентрации в пятне вещества, а  $x_K$  — соответствующее ему положение фронта жидкости, обозначают символом  $R_f$ . Это отношение мы можем выразить на основании уравнений (8) и (11) следующим образом:

$$R_f = \frac{x_M}{x_K} = \frac{\gamma v / q_{II}}{v / q_{II}} = \frac{\delta}{1 + \delta} = \frac{q_{II}}{q_{II} + \alpha q_H}, \quad (13)$$

где  $\alpha$  — так называемый коэффициент распределения, определяемый как отношение концентраций вещества в неподвижной и подвижной фазах<sup>1)</sup>. Следовательно,

$$\alpha = \frac{\frac{Q_H(n, r)}{q_H \Delta x}}{\frac{Q_{II}(n, r)}{q_{II} \Delta x}}. \quad (14)$$

Из уравнения (13) получаем также

$$\alpha = \frac{q_{II}}{q_H} \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right). \quad (15)^2$$

Уравнение (15) можно использовать для определения величин  $\alpha$  на основании известных значений  $R_f$ , и наоборот (см. стр. 73). Следует отметить, что коэффициент распределения  $\alpha$  в данном случае относится к таким системам, как лист бумаги или колонка, заполненная носителем. Его значения, естественно, могут отличаться от значений коэффициента распределения, полученных для систем растворителей без носителя. Это связано с тем, что носитель сам может принимать участие в распределении.

В соответствии с уравнением (15) константа  $R_f$  должна быть постоянной величиной, не зависящей от положения места нанесения разделяемой смеси (старта) и расстояния фронта растворителя от источника последнего. Если же величина  $R_f$  не является постоянной, то, по-видимому, не выполняются условия, принятые при выводе уравнения (15), особенно условие постоянства отношения  $q_{II}/q_H$ . Аномальное поведение, особенно если оно проявляется у всех веществ, подвергаемых разделению в процессе опыта, может свидетельствовать о наличии градиента состава или градиента поперечного сечения обеих фаз (см. стр. 59).

О выполнении условия линейности функции разделения можно, как мы видели, судить по форме зон или пятен, а также по независимости вели-

<sup>1)</sup> Иногда коэффициент распределения определяют величиной, обратной той, которая является правой частью уравнения (14). Это, конечно, совершенно безразлично, но мы для единообразия будем придерживаться определения, данного уравнением (14). Числитель этого уравнения представляет концентрацию в водной фазе или, что является более общим, в более гидрофильной фазе.

<sup>2)</sup> Между этим уравнением и уравнением (56), которое является результатом решения основного уравнения в дифференциальной форме, имеется следующая связь. Для уравнения (56) имеем  $x_d \equiv x_M$  и  $x_K = v/q_{II}$ . Кроме того,  $\alpha_1 = f(c)/c$  и  $\alpha = f^*(c)/c$ . Следовательно,  $\alpha_1 = \alpha q_H/M$ . Подставив эти соотношения в уравнение (56) и проведя соответствующие преобразования, получим уравнение (15).

чины  $R_f$  от концентрации. Коэффициент распределения вещества между двумя жидкими фазами в обычных условиях и при обычно применяемых концентрациях является постоянной величиной. В этом случае аномальное поведение какого-либо вещества можно приписать тому, что, кроме самого процесса распределения вещества между двумя фазами, имели место еще и другие процессы, например адсорбция или диссоциация. (Метод эмпирического определения вида функций разделения разработал Глюкауф с сотрудниками.)

Поскольку величину  $R_f$  легко определить опытным путем, уравнения (13) и (15) можно применять для экспериментального доказательства теории.

Теория распределительной хроматографии, основанная на решении основного уравнения методом исчисления конечных разностей, по своему характеру весьма близка к теории противоточного распределения, развитой Крейгом. В его теории элементарные слои заменены экстракционными сосудами, число которых по мере проведения процесса увеличивается, а емкость уменьшается. В предельном случае бесконечно большого числа экстракционных сосудов с бесконечно малыми объемами кривые зависимости концентрации разделяемого вещества от порядкового номера экстракционного сосуда переходят в идеальные прерывные кривые, т. е. кривые, которые дают решение основного уравнения в дифференциальной форме<sup>1)</sup>.

Стрейн и Мерфи [2], говоря о результатах, полученных при решении основного уравнения методом исчисления конечных разностей, проводят их сравнение с фракционной перегонкой. Для фракционной перегонки при обычных условиях опыта не характерно перемещение зоны разделяемого вещества, как это имеет место в хроматографии. В дистилляционной колонне за счет испарения и обратной конденсации жидкости сохраняется стационарное состояние, так что на каждой тарелке колонны устанавливается равновесие между паром и раствором. Благодаря протекающим на отдельных тарелках процессам непрерывного испарения и конденсации происходит как бы вытеснение более летучих компонентов компонентами менее летучими. Этот процесс, приводящий к разделению компонентов, соответствует процессу развития хроматограммы.

При математическом описании обеих указанных аналогий метода распределительной хроматографии также исходят из условия сохранения количества вещества, что приводит к сходным видам зависимости концентрации разделяемого вещества от положения его фронта (тарелка в колонне, экстракционный сосуд).

### ВЛИЯНИЕ ДИФФУЗИИ И НЕПОЛНОТЫ УСТАНОВЛЕНИЯ РАВНОВЕСИЯ

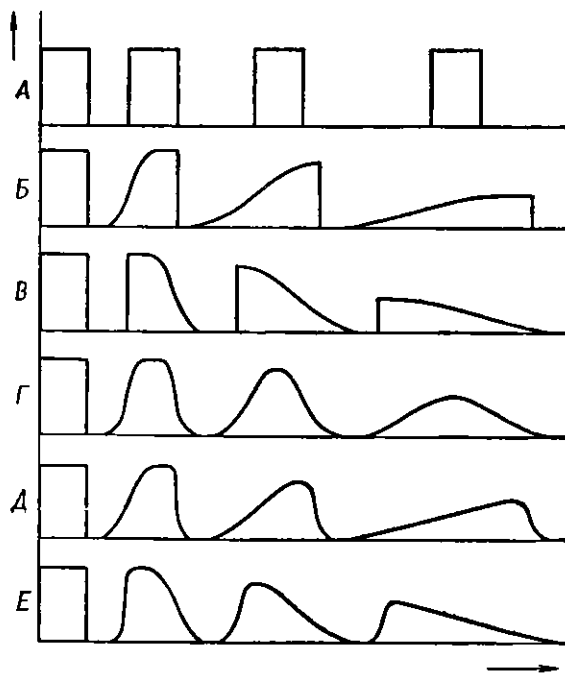
В приводившемся выше дифференциальном решении мы не принимали во внимание диффузию. В результате зона в зависимости от вида функции

<sup>1)</sup> На основании данных табл. 2 можно, например, рассчитать периодическую модель, показанную на рис. 6. Для этого случая мы имели  $Q=1$ ,  $q_{II}/q_{II}=1$ . Для вещества  $A \alpha_A=2$ . Тогда из уравнения (13) получаем  $R_f=1/3$  и  $\gamma=1/3$  и, следовательно,  $1-\gamma=2/3$ .  $Q$  относится к неподвижной фазе, т. е. к более тяжелому растворителю. В результате для третьей, например, делительной воронки ( $n=3$ ) после проведения четвертой операции встряхивания ( $r=4$ ) получаем

$$Q_n(3,4) = \gamma^2(1-\gamma)^2; \quad Q \cdot 3 = \frac{1}{3^2} \cdot \frac{2^2}{3^2} \cdot 3 = \frac{4}{27}.$$

разделения перемещалась при элюировании или без изменения (рис. 18, А), или таким образом, что происходило обострение одной границы зоны и размывание другой (рис. 18, Б, В). В действительности же диффузия приводит к размыванию острой границы (рис. 18, Г, Д, Е). Если функция разделения линейна, то узкая прямоугольная зона под влиянием диффузии становится похожей по форме на кривую Гаусса.

Затем мы исходили из условия мгновенного установления равновесия в процессе разделения (в случае решения основного уравнения методом



Р и с. 18. Схематическое изображение процесса перемещения зоны на хроматограмме.

Идеальные случаи: А — для  $f''(c)=0$ , Б — для  $f''(c) < 0$ , В — для  $f''(c) > 0$ .  
Реальные случаи: Г — для  $f''(c)=0$ , Д — для  $f''(c) < 0$ , Е — для  $f''(c) > 0$ .

исчисления конечных разностей этому условию соответствовало произвольное разделение столбика носителя на элементарные слои). Если для установления равновесия требуется некоторое время, за которое частица вещества переместится на расстояние  $\lambda$ , то можно представить, что при прохождении ею колонки длиной  $L$  переход из одной фазы в другую повторится  $L/\lambda = v$  раз. По аналогии с процессом дистилляции назовем это число  $v$  числом теоретических тарелок. Тогда высота, эквивалентная одной теоретической тарелке, будет равна  $\lambda$ . В теории, использующей математический аппарат исчисления конечных разностей, влияние неравновесности процесса и диффузии учитывается тем, что величина элементарного слоя  $\Delta x$  не берется бесконечно малой. В этой теории число теоретических тарелок соответствует общему числу элементарных слоев в колонке, которое равно  $N = L/\Delta x \equiv v$ . Поскольку концентрация вещества изменяется вдоль тарелки, имеющей конечную высоту, тарелку выбирают такой, чтобы концентрация вещества в растворе, покидающем тарелку, являлась равновесной по отношению к средней концентрации вещества, остающегося на этой тарелке.

Для определения высоты, эквивалентной одной теоретической тарелке, необходимо знать величину  $Q_H(n, r) \equiv Q_H(x, v, \Delta x)$  в определенном месте хроматограммы. Затем, зная эту величину, с помощью уравнения (10) можно определить точное значение  $\Delta x$ . Однако, как это сделали Мартин и Синг, определение величины  $Q_H(n, r)$  можно обойти. Мартин и Синг предположили, что визуально наблюдаемая величина хроматографического пятна соответствует области, простирающейся вокруг максимума концентрации или цвета на расстояние, равное  $n_{\text{макс.}} \pm (n_0 + 2\sqrt{n_{\text{макс.}}})$ , где  $2n_0$  — число тарелок, через которые прошло вещество, прежде чем началось проявление<sup>1)</sup>. Мартин и Синг нашли, что для колонки, заполненной гелем кремневой кислоты, обычная высота, эквивалентная теоретической тарелке, составляла 0,002 см, в то время как для лучших колонок Подбильняка высота, эквивалентная теоретической тарелке, обычно равнялась 1 см. При опытным определении высоты, эквивалентной теоретической тарелке, определяется лишь суммарное влияние диффузии и замедленной скорости установления равновесия.

Понятие высоты, эквивалентной теоретической тарелке, является, конечно, формальным отображением действительности. Точное общее решение является очень сложным даже для упрощенных случаев (см., например, работы Бреслера, Силлена или Бойда с сотрудниками).

### СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ХРОМАТОГРАММ ДЛЯ СИСТЕМ, СОСТОЯЩИХ ИЗ НЕСКОЛЬКИХ РАЗДЕЛЯЕМЫХ КОМПОНЕНТОВ

До сих пор мы рассматривали такие случаи, когда в растворе находилось только одно растворенное вещество. Хроматографические же методы используются для разделения сложных смесей. Выводы, полученные для хроматографического поведения одного вещества, можно переносить на системы, состоящие из нескольких веществ, только в том случае, если присутствие остальных веществ не изменяет или почти не изменяет функции разделения данного вещества. Очень похожий случай мы имеем при распределительной хроматографии, при которой величина  $R_f$  (для одного компонента) не изменяется существенным образом в присутствии меньших количеств других компонентов. Но, например, при адсорбции функция разделения вещества  $i$ , как правило, сильно изменяется с изменением

<sup>1)</sup> Это приближенное соотношение может иметь значение для практической хроматографии. Так, с его помощью на основании наблюдаемой ширины зоны можно для данного конкретного случая определить высоту, эквивалентную теоретической тарелке. И, наоборот, зная высоту, эквивалентную теоретической тарелке, можно определить, до какой величины ( $l^*$ ) изменилась первоначальная ширина зоны ( $l$ ) при прохождении ею пути, равного  $L$ .  $n_{\text{макс.}} = L/\lambda$ , а  $n = l/2\lambda$ . В результате получаем

$$\lambda = \frac{1}{16L} (l^* - l)^2 \quad (16a)$$

и

$$l^* = l + 4\sqrt{\lambda L}. \quad (16b)$$

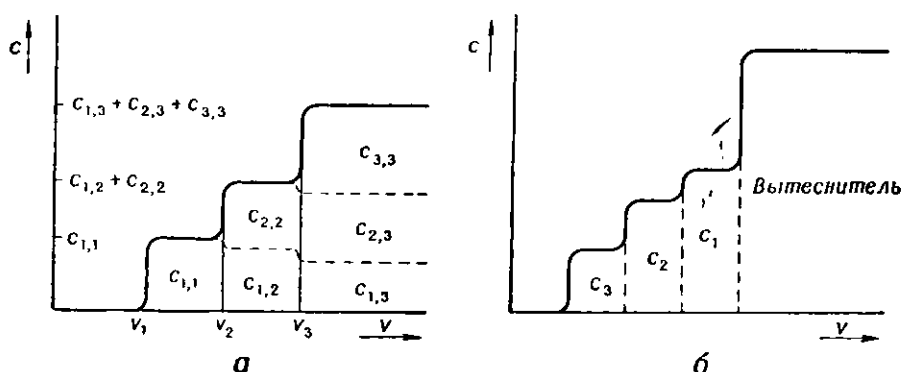
Например, если зона, имевшая первоначальную ширину  $l = 0,4$  см, после прохождения участка длиной  $L = 5$  см стала иметь ширину  $l^* = 1$  см, то в соответствии с уравнением (16a)  $\lambda = 4,5 \cdot 10^{-3}$  см.

И, наоборот, если для бумаги  $\lambda = 4 \cdot 10^{-3}$  см, то зона, имевшая первоначальную ширину  $l = 0,3$  см, после прохождения участка длиной  $L = 10$  см в соответствии с уравнением (16b) будет иметь ширину  $l^* = 1,1$  см.

концентрации остальных растворенных веществ (вытеснение, вторичная адсорбция). Функция разделения вещества  $i$  зависит от концентраций всех остальных компонентов раствора:  $f_i = f_i(c_1, c_2, \dots, c_n)$ . Математическое решение в этих случаях является очень сложным (см., например, работы Де-Вольта или Глюкауфа), даже если ограничиться рассмотрением системы, содержащей только два растворенных вещества.

### ФРОНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ И ЭЛЮЕНТНОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ

Идеальный случай фронтального анализа (равновесное состояние без учета влияния диффузии) для смеси трех растворенных веществ приведен на рис. 19,а. Концентрация вещества на каждой последующей ступени меньше, чем на предыдущей. Это происходит в результате конкурентной



Р и с. 19. Зависимость состава раствора, вытекающего из колонки, от величины объема прошедшего раствора.

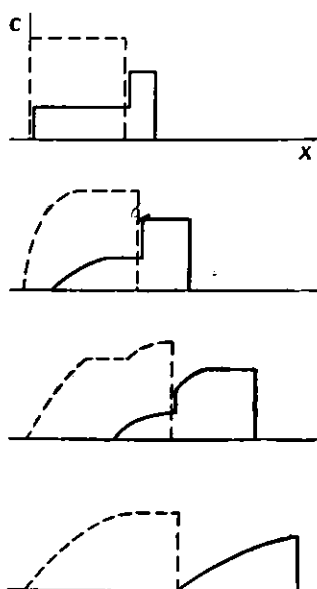
а — при фронтальном анализе; б — при вытеснительном проявлении.

адсорбции веществ. Реальный случай отличается от идеального тем, что отдельные ступени (фронты) не являются здесь такими резкими.

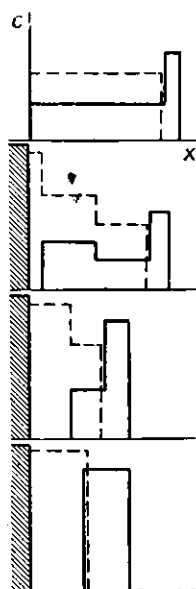
В хроматографии на бумаге метод элюентного проявления применяют наиболее часто. Схематическое изображение процесса элюентного проявления представлено на рис. 18 и 20.

### ВЫТЕСНИТЕЛЬНОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ

Вытеснительное проявление (особенно при адсорбции) основано на использовании взаимозависимости функций разделения. На рис. 21 изображен идеализированный случай. К элюирующему агенту добавляют в нужном количестве вытеснитель, который, адсорбируясь сильнее разделяемых веществ, перемещает перед собой их зоны. Это приводит к сужению зон. В отсутствие же процесса вытеснения эти зоны перемещались бы (в данном идеализированном случае) без изменения своей первоначальной ширины. В процессе, изображенном на рис. 20, также имеет место вытеснение одного вещества другим. Вещество, зона которого отмечена пунктирной линией, по отношению к веществу, зона которого отмечена сплошной линией, является вытеснителем. Состав вытекающего из колонки раствора представлен на рис. 19,б.

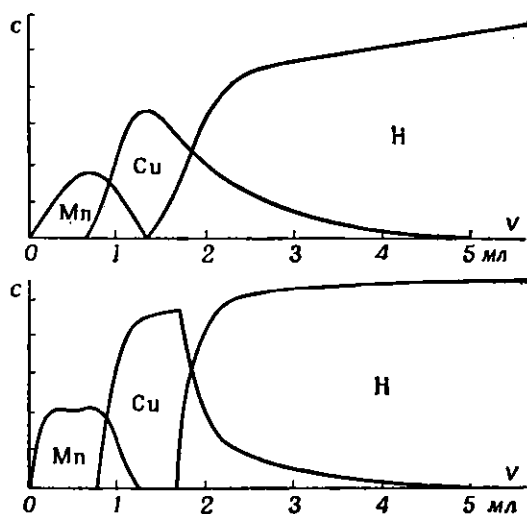


Р и с. 20. Схематическое изображение перемещения зон двух веществ при элюентном проявлении.



Р и с. 21. Схематическое изображение перемещения зон двух веществ при вытеснительном проявлении.

В реальном случае зоны перекрываются. Такой случай представлен на рис. 22. Здесь хорошо видно влияние конечной скорости установления



Р и с. 22. Влияние скорости тока растворителя на установление равновесия при вытеснительном проявлении.

Диаметр зерен неподвижной фазы  $Al_2O_3$ : верхний рисунок — 0,08 мм, нижний рисунок — 0,01 мм. Скорость тока растворителя: верхний рисунок — 0,027 см/сек, нижний рисунок — 0,0014 см/сек.

равновесия, которое проявляется при изменении скорости тока растворителя и пористости носителя. Все же, однако, процесс вытеснения приводит

к сужению зон и уменьшению размывания задних границ. Те частицы вещества, которые отстают настолько, что их догоняет фронт вытеснителя, как бы попадают в место с большей концентрацией (см. уравнение 6б) и начинают поэтому перемещаться быстрее.

При так называемом вытеснительном проявлении с носителем вместо одного вытеснителя используют несколько веществ, адсорбционная способность которых лежит между адсорбционными способностями отдельных разделяемых веществ. Эти вытеснители образуют зоны, расположенные между зонами разделяемых веществ, и таким образом отделяют их друг от друга («интеркаляция»).

### ГРАДИЕНТНОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ

Во всех приводившихся выше случаях мы исходили из того, что состав элюирующего агента остается постоянным по всей длине листа бумаги. При так называемом градиентном проявлении имеют дело с таким элюирующим агентом, состав которого непрерывно изменяется. Используемый в этом методе градиент концентрации соответствует изменению состава элюирующего агента от какого-то начального, для которого адсорбционное равновесие сдвинуто в сторону неподвижной фазы, до какого-то конечного состава, для которого это равновесие сдвинуто в сторону подвижной фазы. По сравнению с методом, при котором состав проявителя изменяют периодически (скачками), этот метод имеет ряд преимуществ. Приведем лишь некоторые из них. Так, при скачкообразном изменении состава проявителя в том месте, где элюирующая способность подвижной фазы претерпевает резкое изменение, образуется общая зона вытесняемых веществ. В случае же непрерывного изменения состава проявителя эти вещества могут быть разделены полностью. Задняя граница зоны при градиентном проявлении находится в той области, где равновесие сдвинуто в сторону подвижной фазы. В этом случае задняя граница при условии постоянства концентрации вещества в зоне должна двигаться быстрее передней границы. Размывание задней границы, характерное для случая выпуклой функции разделения (изотермы распределения), будет благодаря этому частично уменьшаться. В то же время происходит уменьшение расстояния между отдельными зонами, однако сами зоны получают более резкими.

Градиент концентрации вдоль листа бумаги можно получить различными путями:

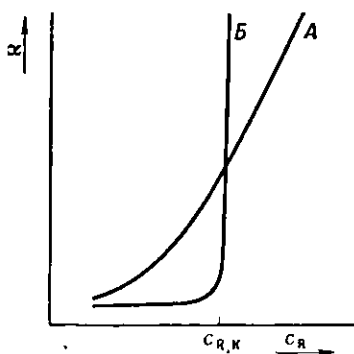
1. Градиент концентрации возникнет, если непрерывно изменять состав растворителя, который всасывается бумагой, опущенной в сосуд с этим растворителем.

2. Если в распределительной хроматографии в качестве неподвижной фазы используют воду, то подвижная фаза, перемещаясь по бумаге все дальше от источника растворителя, будет постепенно обедняться водой за счет ее сорбции целлюлозой. В этом случае, как мы видим, также происходит возникновение градиента концентрации.

3. Градиент концентрации возникает при испарении растворителя из бумаги, поскольку в первую очередь испаряется более летучий растворитель. Процесс испарения растворителя из бумаги в той или иной степени происходит всегда. Для увеличения эффекта атмосферу, в которой проводят хроматографирование, можно специально насытить другим растворителем.

4. Если при использовании метода восходящей хроматографии верхний конец полосы бумаги поместить в сосуд с одним растворителем, а нижний конец — в сосуд с другим растворителем, то верхний растворитель будет опускаться по бумаге, а нижний растворитель — подниматься по ней. В результате в бумаге образуется смесь двух растворителей с непрерывно изменяющимся составом.

В бумаге может иметь место возникновение и других градиентов, способных привести к изменению поперечного сечения обеих фаз, а тем самым к изменению значения  $R_f$ <sup>1)</sup>. В качестве таких факторов, приводящих к возникновению градиентов, можно назвать следующие:



1) Увеличение объема неподвижной фазы в областях, расположенных ближе к источнику растворителя. Это увеличение объема происходит за счет адсорбции из подвижной фазы более полярного компонента.

Р и с. 23. Зависимость коэффициента распределения  $\alpha$  от концентрации компонента растворителя ( $c_R$ ), в котором разделяемое вещество растворяется хуже.

Кривая А соответствует обычному случаю; кривая Б — принципу «все или ничего».

2) Увеличение объема подвижной фазы по направлению сверху вниз за счет действия силы земного притяжения.

3) При перемещении по капиллярам бумаги протекающая жидкость не заполняет сразу все имеющееся в распоряжении пространство, а только его часть. Остальное пространство жидкость занимает постепенно (см., например, Шуте [2] или Мацека [4]).

В термохроматографическом методе разделения газов, предложенном Жуховицким и Туркельтаубом, используют температурный градиент. Однако в хроматографии на бумаге идея использования температурного градиента до сих пор не нашла своего воплощения.

Конкретные примеры разделения веществ с помощью различных градиентов даны в специальной части этой книги.

В хроматографии обычно рассматривают условия, способствующие образованию зон возможно большего числа компонентов смеси по всей длине колонки, а не только в ее начале или на участке фронта протекающего растворителя. Если бы смесь содержала лишь вещества с коэффициентами распределения, близкими к 0, и вещества с особенно большими значениями этих коэффициентов, то использование простого элюентного проявления привело бы к разделению смеси только на две группы веществ: на группу веществ, захваченных неподвижной фазой, и на группу веществ, оставшихся в подвижной фазе. В этом случае, конечно, не было бы никакой необходимости в использовании хроматографии. И, действительно, для некоторых веществ этот случай имеет место на практике. Такими веществами являются, например, белки. Из некоторых растворов белки ад-

<sup>1)</sup> Все эти факторы ведут к изменению так называемой разделяющей способности (емкости), представляющей отношение общих количеств вещества в обеих фазах. Следовательно, можно говорить вообще о градиенте емкости.

сорбируются нацело, из других же растворов они почти совершенно не адсорбируются.

На рис. 23 схематически изображен ход изменения коэффициента распределения  $\alpha$  некоторого вещества в зависимости от изменения концентрации  $c_R$  такого компонента растворителя, в котором это вещество нерастворимо (значение  $\alpha$  велико). В этом случае можно различить два основных типа указанной зависимости. В одном случае (кривая *A*) величина  $\alpha$  возрастает с изменением концентрации постепенно во всем исследуемом интервале изменения концентрации. В другом случае (кривая *B*) коэффициент  $\alpha$  практически не изменяется вплоть до значения концентрации  $c_{R,K}$ , а затем он резко увеличивается до весьма больших значений<sup>1)</sup>.

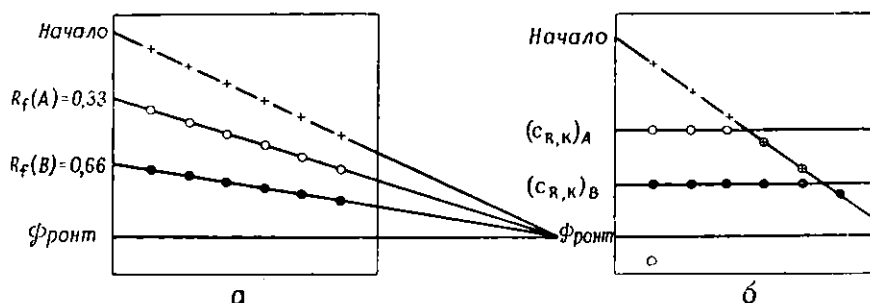
Возьмем вещество, дающее кривую типа *A*, и будем элюировать его растворителем, имеющим градиент концентрации. Концентрацию растворителя будем изменять постепенно от величины  $c_R$ , при которой вещество почти целиком находится в неподвижной фазе, до такой величины, чтобы это вещество перешло в подвижную фазу. В этом случае, как уже указывалось выше (см. стр. 60), мы будем иметь или улучшение эффекта разделения, или по крайней мере ускорение процесса элюирования. Разделение в случае *A* можно, конечно, осуществить и не прибегая к методу градиентного проявления. В противоположность этому успешное хроматографическое разделение веществ, дающих кривые типа *B*, возможно лишь при использовании градиентного проявления. Проявление следует проводить в этом случае начиная с концентрации  $c_R > c_{R,K}$  и кончая его при концентрации  $c_R < c_{R,K}$ . Вещество будет переноситься в том месте концентрационного градиента элюирующей системы, где  $c_R = c_{R,K}$ . Поскольку различным веществам соответствуют различные величины  $c_{R,K}$ , будет происходить разделение (примеры см. на стр. 498, рис. 194, 195; Мацек [1]).

Иногда желательно знать, происходит ли разделение на бумаге в результате простого элюентного проявления или в результате осуществления принципа «все или ничего». Кроме того, может иметь место и промежуточный случай. С этой целью проводят опыт, при котором разделяемую смесь наносят на бумагу на различных расстояниях от источника растворителя. На рис. 24 точки, соответствующие месту нанесения разделяемой смеси, отмечены крестиками. На рис. 24,а показано положение пятен веществ на распределительной хроматограмме. Хроматограмма была получена при тех же условиях, которые приняты при выводе уравнения (15). Было найдено, что величины  $R_f$  для этих веществ равны 0,33 и 0,66. Пятна располагаются после разделения на прямых, проходящих через точку пересечения линии фронта жидкости с прямой, на которой лежат точки, соответствующие местам нанесения смеси. Случай *б* (рис. 24,б) соответствует градиентному проявлению, при котором разделяемые вещества перемещаются в области критической концентрации элюирующего агента. В тех случаях, когда разделение уже произошло, пятна находятся на прямых, параллельных линии фронта элюирующего агента. Поскольку в этом случае величина  $R_f$  зависит от положения места нанесения разделяемой смеси, она утрачивает свое значение. Для характеристики вещества в данной системе растворителей более целесообразно было бы приводить

<sup>1)</sup> Такое явление называют поэтому принципом «все или ничего». Это название было предложено Тизелиусом [3] в статье, где он обратил внимание на практическое значение этих явлений в хроматографии белков. Хотя это название и не вполне точно передает суть дела, мы будем придерживаться его, поскольку других терминов для определения этого явления пока нет.

значение отношения расстояния пятна от линии погружения к расстоянию фронта растворителя от линии погружения.

В практике часто встречаются случаи, промежуточные между теми, которые представлены на рис. 24, а, б. Для этих переходных случаев ли-



Р и с. 24. Относительное положение пятен.

а — идеальный случай; б — применение градиента емкости и принципа «все или ничего».

нии, проходящие через середины пятен, получившихся после элюирования, искривлены. В этих случаях мы имеем дело с градиентным проявлением, но не с осуществлением четко выраженного принципа «все или ничего».

## ПРОТЕКАНИЕ ЖИДКОСТИ ЧЕРЕЗ БУМАГУ

Вопросы, связанные с перемещением жидкости вдоль бумаги, относятся к двум типам движения. Первый тип — это подъем жидкости по капиллярам бумаги, второй тип — протекание жидкости вдоль бумаги под действием гравитационных сил.

### ПОДЪЕМ ЖИДКОСТИ ПО КАПИЛЛЯРАМ

Вопросы первой группы разработаны для бумаги достаточно подробно, поскольку они имеют значение не только для хроматографии, но и для бумажной промышленности. Явление подъема жидкостей по капиллярам используют для характеристики бумаги. Если лист бумаги погрузить одним концом в жидкость, последняя будет всасываться бумагой, причем поток жидкости в первый момент будет турбулентным. Однако вскоре, когда фронт движущейся жидкости удалится от линии погружения на некоторое расстояние, поток станет ламинарным. Ввиду этого разделяемую смесь лучше наносить дальше от линии погружения. В противном случае при быстром протекании жидкости неравновесность процесса будет увеличиваться, что приведет к более сильному размыванию пятен. Все уравнения, характеризующие протекание жидкостей через бумагу, относятся к ламинарному потоку.

Данные, характеризующие процесс подъема жидкостей по капиллярам с качественной стороны, получены еще в старых работах. Первым уравнением, описывающим этот процесс, явилось так называемое уравнение Лукаса. Это уравнение, имеющее полуколичественный характер, используется до настоящего времени. Оно показывает связь между высотой  $h$

и временем  $t$ , за которое жидкость поднимется на эту высоту по листу бумаги, находящемуся в вертикальном положении. Эта высота зависит от поверхностного натяжения жидкости  $\sigma$ , ее вязкости  $\eta$  и среднего радиуса капилляров в бумаге  $\bar{r}$ :

$$h^2 = \frac{\sigma \bar{r}}{2\eta} t. \quad (17a)$$

Позднее уравнение было видоизменено Мюллером и Клеггом:

$$h^2 = Dt - b, \text{ где } D = \frac{a\sigma}{\eta d} + c,$$

где  $a$ ,  $b$  и  $c$  — постоянные,  $d$  — плотность жидкости. Аналогичные уравнения были получены, например, в работах Пика и Мак-Лина, Вуда и Стрейна, а также Фудзита.

### ПОТОК

Процесс протекания жидкостей и газов через пористые материалы исследован очень хорошо. Это связано с тем, что этот вопрос имеет большое практическое значение для самых различных областей техники. Для ряда определенных случаев были получены уравнения, хорошо подтверждающиеся на опыте. Однако протекание жидкостей через бумагу было исследовано сравнительно мало, причем большей частью для процесса фильтрации. Характером же протекания жидкости вдоль листа бумаги при этом не интересовались. В качестве примера уравнения, описывающего протекание жидкости через пористый материал, приведем так называемое уравнение Козени. Это уравнение определяет скорость потока  $w$ , показывающую, сколько миллилитров жидкости протекает в единицу времени через цилиндр сечением  $q$  и длиной  $L$ , который заполнен пористым материалом:

$$w = \frac{1}{k} \frac{\delta \varepsilon^3}{s^2 L (1-\varepsilon)^2} \frac{dgh}{\eta}, \quad (176)$$

где  $s$  — удельная поверхность пористого материала;  $\varepsilon$  — пористость материала;  $h$  — высота столба жидкости;  $g$  — ускорение силы тяжести;  $d$  — плотность жидкости;  $k$  — эмпирическая константа; произведение  $dgh$  выражает гидростатическое давление жидкости. Оказалось, что это уравнение справедливо и для потока жидкости через бумагу. (Более подробные сведения по этому вопросу можно найти, например, в монографии Кармана.)

Однако уравнение Козени — Кармана (176), а также все остальные уравнения выведены для случая, когда свойства пористого материала (пористость, удельная поверхность, сечение) и протекающей жидкости (вязкость, плотность, состав) остаются вдоль всего столбца постоянными. В хроматографии на бумаге дело обстоит гораздо сложнее, и указанные условия обычно не выполняются. Так, например, в разделе, посвященном градиентному проявлению, мы упоминали, что различные свойства изменяются вдоль листа бумаги. Удовлетворительной теории процесса протекания жидкостей в условиях, имеющих место в хроматографии на бумаге, до настоящего времени не создано.

Кроме того, некоторые авторы обращают внимание на тот факт, что при протекании жидкостей через бумагу на ней возникает небольшой градиент электрического потенциала, так называемого потенциала течения.

## *Связь между строением и хроматографическим поведением веществ. Типы хроматографии*

### СИЛЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ АТОМАМИ И МОЛЕКУЛАМИ

Решающее влияние на характер протекания хроматографического процесса оказывает взаимодействие между отдельными частицами разделяемых веществ и фазами, с которыми эти частицы входят в соприкосновение. Силы, которые действуют между частицами (атомы, молекулы, ионы), можно разделить на две группы. Действие сил, принадлежащих к первой группе, приводит обычно к образованию химической связи. Энергия химической связи велика и достигает десятков килограмм-калорий на моль. В отличие от химического физическое взаимодействие обусловлено действием слабых сил. Энергия связи, образующейся в результате действия таких сил, имеет порядок десятых килограмм-калорий на моль. Эти силы называются силами Ван-дер-Ваальса. Промежуточным типом связи является водородная связь, энергия которой сравнительно велика (порядка нескольких килограмм-калорий на моль). Поведение молекул при физическом взаимодействии определяется их строением, т. е. характером химических связей между отдельными атомами и группами. Поскольку подробное рассмотрение сущности взаимодействия между частицами не является целью этой книги, мы остановимся лишь на основных моментах этого вопроса.

#### ТИПЫ ХИМИЧЕСКОЙ СВЯЗИ

Если у двух взаимодействующих атомов происходит обобществление их неспаренных электронов, то в результате образуется ковалентная (гомеополярная) связь. Для этой связи не характерно асимметричное расположение общего электрического заряда. Чисто ковалентная связь существует лишь между одинаковыми атомами двухатомных молекул. Кроме того, ковалентный характер имеют также связи C — C или C — H в молекулах насыщенных алифатических углеводородов.

Если пара электронов образует связь между двумя различными атомами или между двумя одинаковыми атомами, окруженными различными заместителями, то в этом случае распределение электрического заряда окажется несимметричным. Такая связь является полярной. Электронное облако расположено не посередине между обоими связанными атомами. Оно смещается в сторону того атома, который имеет большее сродство к электрону. Сродство элемента к электрону определяется местоположением этого элемента в периодической системе элементов. Так, например, оно падает в рядах:  $F > O > N > C$ ;  $F > Cl > Br > J$ ;  $C > H$ . Несимметричное распределение заряда объясняет наличие у молекул постоянного дипольного момента. Формально это несимметричное распределение заряда можно выразить в формуле молекулы АВ индексами  $\delta^+$  и  $\delta^-$ , например:



Связь, возникающая за счет электронной пары только одного из реагирующих атомов, называется координационной связью. У атома, обра-

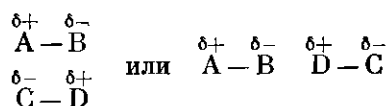
зующего такую связь за счет чужой электронной пары, имеется избыток отрицательного заряда. Для координационной связи характерна значительная величина постоянного дипольного момента.

Ионная связь возникает между ионами, т. е. между заряженными атомами или группами, заряд которых возникает в результате образования стабильной электронной конфигурации. Эта конфигурация характерна тем, что заряд электронного облака отличается от заряда ядра. Чаще всего ионная связь возникает в результате образования октета электронов в последней оболочке атома. Образование стабильной электронной конфигурации связано с тем, что она энергетически более выгодна, чем электронная конфигурация электронейтрального атома.

### ФИЗИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

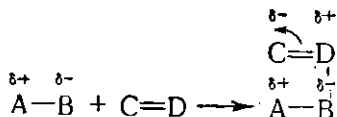
Физическое взаимодействие между молекулами имеет электростатический характер. Оно обусловлено полярностью или поляризуемостью частиц и может иметь различный характер.

Если молекулы имеют постоянный дипольный момент, это приводит к их ориентации. В результате возникают пространственные образования с упорядоченной структурой:



Аналогично ведут себя частицы с постоянным дипольным моментом в присутствии ионов (сольватация ионов в растворе).

Если к частице с постоянным дипольным моментом приближается неполярная частица, способная поляризоваться (например, частица, имеющая двойную связь, особенно сопряженную), то между ними возникнет так называемое индукционное взаимодействие. Это взаимодействие вызвано тем, что у поляризуемой частицы под действием электростатического поля частицы с постоянным дипольным моментом возникает наведенный дипольный момент:

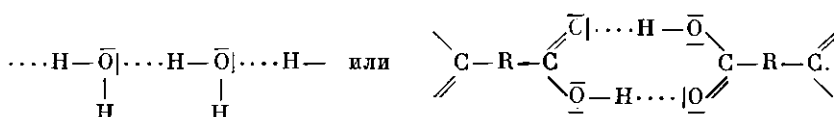


Силы взаимодействия между двумя неполярными частицами невелики. Это так называемые дисперсионные или лондоновские силы, зависящие от нулевой энергии частиц. Происхождение этих сил может быть объяснено с помощью квантовой механики. Для того чтобы получить наглядное представление о характере таких сил, можно рассмотреть объяснение, данное Кассиди [1]. Симметричное распределение заряда в ковалентной связи нужно рассматривать как результирующую различных несимметричных распределений, изменяющихся во времени. Если рассматривать молекулу за какой-то конечный промежуток времени, то можно видеть, что молекула неполярна. Это объясняется тем, что за рассматриваемый промежуток времени отдельные отклонения от симметричного распределения заряда,

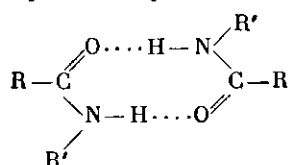
приводящие к возникновению временных диполей, будут взаимно уничтожаться. Однако образование этих временных диполей вызывает взаимодействие между частицами, содержащими ковалентные связи. Этим взаимодействием можно, например, объяснить явление адгезии между неполярными молекулами углеводов.

### Водородная связь

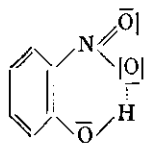
Водородная связь образуется в тех случаях, когда водород связан ковалентно с сильно электроотрицательным атомом. Такой атом водорода способен связывать электростатически свободную электронную пару другого сильно электроотрицательного атома. Такая связь называется водородным мостиком. Водородная связь может иметь место как внутри одной молекулы (внутримолекулярная связь), так и между двумя молекулами (межмолекулярная связь). Благодаря водородной связи может происходить образование длинных цепей, например



или связывание только двух молекул:



или образование клешневидных циклов в самой молекуле



Следовательно, участвуя в такой связи, атом водорода с одним атомом связан ковалентно, а с другим — электростатически. Индивидуальность связей в этом случае сохраняется.

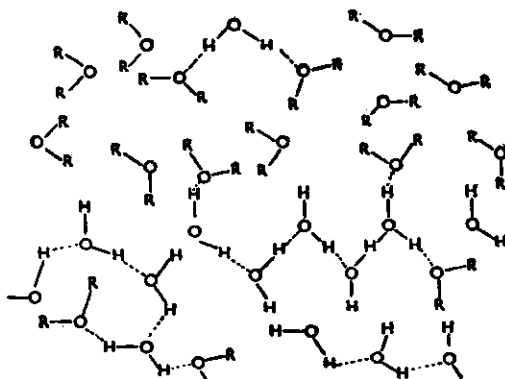
Водородные мостики могут также образовываться между молекулами различных веществ. Этот случай имеет для распределительной хроматографии наибольшее значение. С точки зрения характера образования водородных мостиков вещества можно разделить на пять групп (по Геккеру) (рис. 25).

1. К первой группе относятся вещества, способные отдавать и принимать атом водорода с образованием связи между собственными молекулами этих веществ. В этом случае образуется особенно прочная пространственная сетчатая структура. К таким веществам принадлежат вода, многоатомные спирты, аминокислоты, оксикислоты, полифенолы, дикарбоновые и трикарбоновые кислоты.

2. Ко второй группе относятся вещества, способные принимать и отдавать атом водорода и образовывать водородные мостики с молекулами других веществ. К этим веществам относятся спирты, фенолы, кислоты,

первичные и вторичные амины, оксимы, нитросоединения и нитрилы с атомом водорода в  $\alpha$ -положении, амиды.

3. К третьей группе относятся вещества, способные принимать атом водорода. Эти вещества содержат электроотрицательные атомы с неподеленной парой электронов (чаще всего N или O). К ним относятся простые эфиры, альдегиды, кетоны, сложные эфиры, третичные амины, нитросоединения и нитрилы, не имеющие атома водорода в  $\alpha$ -положении.



Р и с. 25. Образование водородных мостиков между молекулами в эфирной (наверху) и водной (внизу) фазах (по Геккеру).

Молекулы простого эфира ROR не образуют между собой водородных мостиков. Молекулы воды, являясь донорами и акцепторами протонов, образуют трехмерную сетчатую структуру. Кроме того, они образуют водородные мостики с молекулами эфира, который в этом случае является акцептором протонов. На рисунке видно, что молекулы углеводорода, не способные к образованию водородных мостиков, с трудом проникают в водную фазу, так как они не могут раздвинуть связанные друг с другом молекулы воды.

4. К четвертой группе относятся вещества, являющиеся донорами активных атомов водорода:  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{ClCH}=\text{CCl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_4$ .

5. К пятой группе относятся вещества, которые не образуют водородных мостиков:  $\text{CS}_2$ ,  $\text{CCl}_4$ , углеводороды.

Группы, способные диссоциировать (например, сульфогруппа, сульфатная, фосфатная и др.), после ионизации могут присоединять атом водорода. Наличие двойной связи обычно способствует усилению донорной способности, так как двойная связь увеличивает подвижность водорода.

## ПОЛЯРНОСТЬ И ВЗАИМНАЯ РАСТВОРИМОСТЬ ВЕЩЕСТВ

Полярность соединений обычно выражают с помощью дипольного момента. Если центры положительного и отрицательного зарядов  $q$  (оба заряда имеют одинаковую величину, поскольку в целом молекула электронейтральна) находятся в молекуле на расстоянии  $d$ , то дипольный момент молекулы ( $\mu$ ) будет равен произведению  $dq$ . Дипольные моменты молекул определяют на основании измерений диэлектрических постоянных веществ (диэлектрическая постоянная вещества зависит от величины дипольного момента его молекул). Измерения проводят при условии отсутствия взаимодействия между компонентами исследуемой системы. Если измерения проведены в других условиях, то полученные результаты экстраполируют к вышеуказанным условиям. Таким образом, мы видим, что условия, в которых проводят определение дипольных моментов, противоположны тем, которые имеют место в хроматографии.

Обычно вещества делят на полярные и неполярные, причем полярные вещества растворимы в полярных растворителях, а неполярные вещества — в неполярных растворителях. Однако понятие полярности веществ требует определенных оговорок. Взаимодействие частиц зависит не только от постоянных, но и от наведенных диполей, т. е. от поляризуемости молекул. Кроме того, молекулы сложных веществ могут иметь также местные диполи. Наличие этих диполей не сказывается, правда, на величине общего дипольного момента молекулы (результатирующая их действия равна 0), однако эти местные диполи определенным образом влияют на взаимодействие частиц. Возможны и противоположные случаи, когда вещества, обладающие определенным дипольным моментом, ведут себя как неполярные вещества. Последнее явление связано с малой доступностью этого диполя со стороны других молекул (см. раздел, в котором рассматривается вопрос о пространственных факторах, стр. 79). Гильдебранд и Ротариу приводят ряд примеров, когда порядок растворимости веществ отличается от порядка величин постоянного дипольного момента. Один из этих примеров приведен в табл. 3.

Таблица 3

РАСТВОРИМОСТЬ В ВОДЕ (20°) И ДИПОЛЬНЫЙ МОМЕНТ ХЛОРИСТОГО ПРОПИЛА И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ВЕЩЕСТВ  
(по Гильдебранду и Ротариу)

Вещество	Дипольный момент	Давление пара	Растворимость, моли/1000 г воды	
			при давлении насыщенного пара	при 10 мм рт. ст.
Пропил хлористый	2,0	280	0,255	0,009
Пропил йодистый	1,6	35	0,054	0,015
Пропиловый спирт	1,7	15	∞	∞
Нитробензол . . . . .	4,2	0,28	0,16	
Фенол . . . . .	1,7	0,22	0,93	

Таким образом, наличие постоянного дипольного момента еще не говорит о полярности вещества. Кассиди [1] считал полярными такие молекулы, которые вступают в полярное взаимодействие независимо от того, происходит ли оно вследствие общей асимметрии их электрического заряда (молекула имеет постоянный дипольный момент) или из-за наличия локализованной полярной связи (молекула не имеет постоянного дипольного момента). Если рассматривать понятие полярности с такой точки зрения, то приведенное выше правило о растворимости будет хорошо соответствовать действительности.

Данные о полярности ряда растворителей, которая выражена через их дипольные моменты (соответственно диэлектрические постоянные), приведены в табл. 9 на стр. 113, 114.

Взаимодействие частиц чистых полярных веществ сопровождается их ассоциацией, в результате которой образуется сравнительно устойчивая структура. Образование такой структуры в жидкостях подтверждается данными рентгеновского анализа. Структура жидкостей изменяется со временем. Это изменение нужно понимать в том смысле, что молекулы жидкостей (например, воды) не имеют постоянного окружения. Молекулы, окружающие каждую молекулу воды, все время заменяются другими моле-

кулами. У льда же, наоборот, каждая молекула всегда окружена одними и теми же четырьмя молекулами. В жидких кристаллах имеется большое количество нарушений. Фазы, имеющие такую структуру, неохотно принимают в свою среду посторонние инертные частицы, т. е. частицы неполярных веществ. Присутствие этих частиц будет препятствовать проявлению взаимодействия в полярной фазе. Ввиду этого смещение неполярных веществ с полярными происходит лишь в ограниченном масштабе. Если добавляемое вещество способно вступать во взаимодействие с частицами полярного вещества, т. е. если оба вещества полярны, то они будут смешиваться. Смешение происходит тем легче, чем больше разница между энергией взаимодействия частиц растворяемого вещества с частицами растворителя и энергией взаимодействия частиц растворителя. Поэтому полярные вещества хорошо смешиваются. Аналогичное явление наблюдается и для неполярных веществ, так как между их частицами в какой-то мере также происходит физическое взаимодействие. Возникновение растворов в этом случае всегда связано с образованием более или менее устойчивых агрегатов частиц растворяемого вещества и частиц растворителя.

В системах, состоящих более чем из двух компонентов, при образовании растворов взаимодействуют все компоненты. При определенной концентрации растворенные вещества оказывают друг на друга «высаливающее» действие. Растворяемое вещество, обладающее большим сродством к растворителю (иногда вещество, находящееся в избытке), при взаимодействии с растворителем успешно конкурирует с теми растворяемыми веществами, которые имеют меньшее сродство к этому растворителю, и вытесняет их из раствора. То же самое явление может вызвать и другой растворитель, если вещества растворяют в смеси растворителей. Так, например, растворенное в спирте вещество можно высадить из спиртового раствора водой, так как энергия взаимодействия между молекулами воды и спирта сравнительно велика.

На растворимость вещества оказывают влияние все полярные и неполярные группы, находящиеся в молекуле данного вещества. Так, например, у алифатических кислот низшие члены гомологических рядов лучше растворяются в полярных растворителях (например, в водно-спиртовых растворах), в то время как с увеличением числа атомов углерода в цепи увеличивается их растворимость в неполярных растворителях.

## АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

### ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ

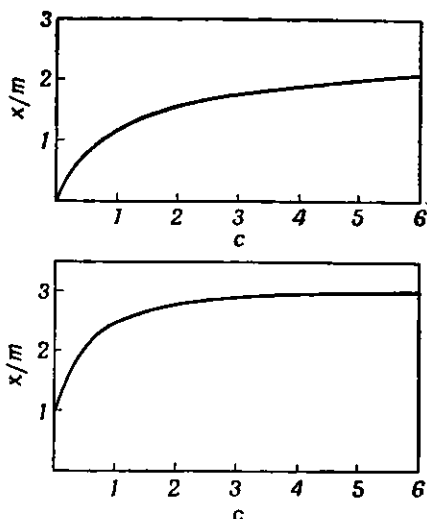
Концентрирование веществ у поверхности твердой фазы мы называем адсорбцией. С этим явлением встречаются очень часто, однако в заметной степени оно проявляется только для фаз с большой поверхностью.

Общая скорость адсорбции складывается из скорости собственно адсорбции и скорости десорбции. При равновесии, когда в макроскопическом масштабе не протекает никакого процесса, скорость адсорбции равна скорости десорбции. В этом случае число частиц, адсорбирующихся на поверхности в единицу времени, равно числу частиц, покидающих поверхность за то же время. Таким образом, общая концентрация вещества ни на поверхности, ни в растворе не изменяется. Исходя из того, что скорость адсорбции пропорциональна величине незанятой поверхности.

и концентрации вещества в растворе, а скорость десорбции — концентрации адсорбированного вещества, Лэнгмюр вывел следующее уравнение изотермы адсорбции:

$$n_a = \frac{z\omega c}{1 + \omega c}, \quad (18)$$

где  $n_a$  — количество вещества, адсорбированное единицей поверхности;  $z$  — максимальное количество вещества, способное адсорбироваться на единице поверхности;  $\omega$  — адсорбционный коэффициент. Такой вид изотермы адсорбции (рис. 26) является наиболее



обычным, однако не единственно возможным. На практике встречаются различные виды изотерм адсорбции, которые можно описать соответствующими уравнениями. Эти уравнения применяют лишь в специальных случаях, они не имеют общего значения. Кроме уравнения Лэнгмюра, имеется еще одно уравнение изотермы адсорбции общего значения (особенно большую роль оно

Р и с. 26. Изотермы адсорбции.

По оси ординат отложено адсорбированное количество вещества ( $n_a$ ).

Верхняя кривая — пример изотермы Фрейндлиха. Нижняя кривая — пример изотермы Лэнгмюра.

играет для разбавленных растворов). В случае адсорбции из раствора это уравнение изотермы адсорбции можно написать в следующем виде:

$$n_a = ac^b, \quad (19)$$

где  $a$  и  $b$  — величины, постоянные для данной системы адсорбирующегося вещества — адсорбент. Это уравнение называют уравнением адсорбционной изотермы Фрейндлиха.

Функция разделения для адсорбции сильно зависит от температуры. Это явление использовано при так называемом термохроматографическом методе разделения (Жуховицкий и Туркельтауб).

#### АДСОРБЦИОННЫЙ МЕХАНИЗМ ПРИ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИИ НА БУМАГЕ

Вопрос о том, какие причины обуславливают разделение в процессе хроматографирования на бумаге — адсорбция, распределение между двумя жидкостями или какой-либо другой механизм, — обсуждается очень давно. Уже в 1901 г. Гоппельсредер полагал, что разделение, происходящее при капиллярном анализе, объясняется в основном адсорбцией. Цвет подчеркивал роль осаждения после испарения одного из компонентов системы. Другие исследователи обращали внимание на значение отрицательного заряда целлюлозы, т. е., следовательно, на возможность ионообменного механизма.

В настоящее время этот вопрос в большинстве случаев решают в пользу механизма, основанного на распределении веществ между двумя жидкостями (см. стр. 73, 74). Однако в некоторых случаях разделение при хроматографировании на бумаге объясняется, несомненно, адсорбцией. Механизм, основанный на адсорбции, имеет место, например, при разделении липофильных веществ на бумаге, пропитанной  $Al(OH)_3$ , или при их разделении на непропитанной бумаге с использованием в качестве подвижной фазы сухого углеводорода.

При использовании в качестве подвижной фазы водных растворов или растворов в растворителях, смешивающихся с водой, в зависимости от содержания воды в смеси может иметь место или механизм, основанный на адсорбции, или механизм, основанный на распределении. Синг и Тизеллус, исследовавшие в качестве подвижных фаз водно-спиртовые смеси, пришли к следующим выводам. При избытке воды механизм разделения основан на адсорбции. Так, триптофан, адсорбируясь сильнее, чем, например, валин или лейцин, будет отставать от последних (величина  $R_f$  равна 0,6—0,7). Триптофанилтриптофан адсорбируется еще сильнее и имеет  $R_f$  в пределах от 0,25 до 0,45. При избытке спирта (начиная с 60%) имеет место механизм, основанный на распределении. В этом случае коэффициент распределения триптофана больше (соответственно растворимость в спирте меньше), чем у триптофанилтриптофана, который теперь движется быстрее. Большинство примеров разделения, при которых в качестве подвижной фазы используют воду, объясняют на основе адсорбционного механизма. Однако в некоторых случаях разделение можно также объяснить на основе распределения вещества между двумя водными фазами — закрепленной и подвижной. Последняя интерпретация, по нашему мнению, более правильна.

#### ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ ВЕЩЕСТВ НА ИХ ПОВЕДЕНИЕ ПРИ АДсорбЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

При применении адсорбционной хроматографии на колонках было найдено много эмпирических правил, причем некоторые из них имеют значение и для хроматографии на бумаге.

Кислородсодержащие адсорбенты можно расположить по их адсорбционной способности в следующий ряд:  $Al_2O_3$ ,  $MgO > Al(OH)_3$ , кремневая кислота, синтетический магневоалюминиевый силикат  $> CaO$ ,  $Ca(OH)_2 > BaCO_3$ ,  $MgCO_3$ ,  $CaCO_3 > CaSO_4$ ,  $C_2O_4Ca > тальк > инулин$ , сахароза, лактоза, крахмал. Некоторые из этих адсорбентов были также использованы для пропитки бумаги. Сахара являются слабыми адсорбентами. Необходимо, конечно, иметь в виду, что адсорбционная способность отдельных членов этого ряда под влиянием примесей или гидратации может измениться так сильно, что порядок их расположения изменится.

Мозли с сотрудниками исследовали связь элюирующей способности растворителей при адсорбционной хроматографии на кислородсодержащих адсорбентах с их полярностью, дипольным моментом, диэлектрической постоянной, способностью к образованию водородных мостиков и т. д. При этом, конечно, следует учитывать, что элюирующая способность растворителя изменяется при переходе от одного адсорбента к другому. Такое изменение элюирующей способности одного и того же растворителя наблюдается, например, при переходе от карбоната кальция к окиси алюминия. Это связано с тем, что карбонат кальция не может быть донором

протонов, в то время как окись алюминия, которая всегда хотя бы частично гидратирована, может отдавать протон для образования водородного мостика (аналогично кремневой кислоте). Так, например, ацетон, который является акцептором протона, на карбонате кальция обладает слабой, а на окиси алюминия сильной элюирующей способностью (Ле-Розен).

Функциональные группы, содержащиеся в органических соединениях, влияют на адсорбционную способность этих веществ при их адсорбции из растворов кислородсодержащими адсорбентами. Адсорбционная способность функциональных групп уменьшается в следующем порядке:  $\text{COOH}$ ,  $\text{CONH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{COOCH}_3$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{H}$ ,  $\text{Cl}$ . Здесь наблюдается близкая аналогия с поведением веществ при распределительной хроматографии, когда неподвижная фаза более полярна. В обоих случаях речь прежде всего идет об образовании межмолекулярных водородных мостиков.

При адсорбционной хроматографии имеет значение, конечно, не только характер и число функциональных групп, но и общая форма молекулы. Можно также приготовить специальные адсорбенты, которые будут адсорбировать только определенные молекулы (Курти и сотрудники). Так, если силикагель осадить в присутствии органического красителя, который затем вымывают, то силикагель будет обладать постоянной специфической активностью по отношению к этому красителю.

Естественно, что при использовании различных адсорбентов и растворителей адсорбционная способность веществ не будет оставаться постоянной.

## РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

### ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ

Если в систему, состоящую из двух жидких не смешивающихся между собой фаз, внести вещество, растворимое в обеих фазах, то это вещество так распределится между ними, что отношение концентраций вещества в обеих фазах будет всегда постоянной величиной.

Если одну из фаз, содержащую растворенное вещество, привести в соприкосновение с другой фазой, в которой этого вещества еще нет, то оно начнет переходить из первой фазы во вторую. Концентрация растворенного вещества в первой фазе будет уменьшаться, а во второй фазе увеличиваться. Этот процесс перехода вещества из одной фазы в другую будет продолжаться до тех пор, пока отношение концентраций вещества в обеих фазах не достигнет строго определенного значения, величина которого зависит от выбора обоих растворителей и самого вещества. Величину этого отношения называют коэффициентом распределения и обозначают  $\alpha$ .

Работа переноса моля вещества из фазы, в которой его концентрация равна  $c_1$ , в другую фазу, где его концентрация равна  $c_2$ , определяется следующим соотношением:

$$A = RT \ln \frac{c_2}{c_1} . \quad (20)$$

При состоянии равновесия эта работа определяется лишь разностью химических потенциалов вещества в обеих фазах (химический потенциал вещества берут для стандартного состояния). В этом случае величина  $A$  будет

функцией только температуры. Тогда при постоянной температуре будем иметь

$$\frac{c_2}{c_1} = \text{const} = \alpha. \quad (21)$$

Это соотношение является так называемым законом распределения Нернста. Этот закон выполняется для любых допустимых пар концентраций, конечно, в тех условиях, для которых он был выведен (для разбавленных растворов). В концентрированных растворах имеют место отклонения от этого закона.

#### РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ В ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Мы уже отмечали, что в некоторых случаях нельзя точно решить, какой механизм лежит в основе хроматографического разделения на бумаге. Это может быть адсорбционный механизм или механизм, основанный на распределении веществ между двумя жидкими фазами, т. е. в первом случае разделяемые вещества связываются с поверхностью, а во втором случае они проникают в глубь неподвижной фазы (рис. 10, стр. 38).

Теория, рассмотренная в предыдущей части этой главы, разработана без учета характера механизма, лежащего в основе разделительного действия. Для линейной функции разделения оба решения приводят к одному и тому же уравнению (15), характеризующему связь между величиной  $R_f$  и коэффициентом распределения  $\alpha$ . Следовательно, прямым доказательством того, что при хроматографировании на бумаге имеет место механизм, основанный на явлении распределения вещества между двумя фазами, было бы соответствие между измеренными величинами  $R_f$  и вычисленными с помощью уравнения (15). Для вычисления величин  $R_f$  используют значения коэффициента распределения  $\alpha$ , специально полученные в делительной воронке для той же системы. Такой метод определения механизма разделения был, например, с успехом использован Консденом с сотрудниками при разделении аминомонокислот. Однако величина отношения  $q_{II}/q_I$  была получена на основании значений  $\alpha$  и  $R_f$  для гликокола в системе *n*-бутанол — вода. Полученные величины имели довольно правдоподобные значения, находящиеся в интервале от 2,9 до 4,6. Аналогичным образом поступал Бурма. В табл. 136 представлены значения коэффициентов распределения и величин  $R_f$ , полученные для некоторых неорганических веществ как экспериментально, так и на основании расчета. Как видно из таблицы, между экспериментальными и расчетными данными имеется хорошее соответствие. (Табл. 136 составлена на основании данных, полученных Елисейевой.)

В некоторых случаях бумагу перед хроматографированием пропитывают растворителями, используемыми в качестве неподвижной фазы. Применяемые в этих случаях растворители могут быть более полярными (формамид, пропиленгликоль, вода) или менее полярными (керосин, парафиновое масло), но независимо от их полярности результаты хроматографического разделения зависят от растворяющей способности подвижной и неподвижной фаз и количества неподвижной фазы, присутствующей в бумаге. Эта зависимость говорит, несомненно, в пользу механизма, основанного на явлении распределения. Кроме того, в большинстве случаев порядок величин коэффициентов распределения для определенного ряда веществ совпадает с порядком величин  $R_f$  для этих же веществ.

Хотя по виду пятен (симметрия, размытость границ) и можно судить о том, имеем ли мы дело с адсорбционным или распределительным меха-

низмом, однако это нельзя считать доказательством. Образование симметричных пятен, которые мы получаем обычно на бумаге, свидетельствует лишь о линейности функции разделения. При этом в определенной области концентраций изотерму адсорбции также можно считать прямой линией, и, наоборот, даже коэффициент распределения при высоких концентрациях не является постоянной величиной.

Иногда против механизма, основанного на представлении о распределении веществ между двумя фазами, имеются возражения. Возражения принципиального характера состоят в следующем: а) порядок величин  $R$ , для некоторых аминокислот не соответствует порядку величин коэффициентов распределения (если только речь не идет о членах одного гомологического ряда); б) в некоторых случаях наблюдается разделение оптических изомеров; в) разделение с использованием однофазных смесей дает в основном те же результаты, что и использование органической фазы из двухфазной смеси близкого состава.

Эти возражения существенны в тех случаях, когда неподвижная полярная фаза образуется благодаря сорбции веществ из атмосферы или их выделению из протекающей смеси. О некоторых из этих возражений нужно сказать следующее.

а) Основываясь на различии порядка величин  $R$ , и  $\alpha$ , можно сделать вывод о существовании какого-то другого механизма, отличного от распределительного. Однако как совпадение порядка обеих этих величин не является еще доказательством существования распределительного механизма, так и различие в их порядке не может служить подтверждением адсорбционного механизма (см. также стр. 75). Так, при адсорбции на гидрофильных адсорбентах (в данном случае на глюкозных остатках целлюлозы) имеет место межмолекулярное взаимодействие, главным образом взаимодействие, приводящее к образованию водородной связи. Следовательно, при адсорбции на гидрофильных адсорбентах происходит образование связей, аналогичных тем, которые имеются в растворах веществ в воде и других полярных растворителях. В этом случае поведение веществ одного гомологического ряда при обоих механизмах может быть одинаковым.

Против адсорбционного механизма говорит также тот факт, что полярная фаза (особенно вода) весьма прочно связывается с поверхностью целлюлозы. Поскольку полярная фаза находится в большом избытке по сравнению с разделяемыми веществами, то она будет сильно затруднять адсорбцию этих веществ на поверхности целлюлозы. Адсорбция разделяемых веществ будет происходить лишь в исключительных случаях.

б) Осуществление разделения оптических изомеров в системах, содержащих оптически неактивные растворители, свидетельствует о том, что в этих случаях за процесс разделения ответствен оптически активный носитель — целлюлоза. Однако без подробного изучения механизма этого разделения нельзя решить, связано ли влияние носителя с явлением адсорбции в обычном смысле, или же нет.

в) Консен с сотрудниками обратили внимание на то, что при разделении аминокислот с помощью хроматографии на бумаге в однофазных системах можно достигнуть приблизительно такого же разделения, как и при использовании двухфазных систем, если указанные однофазные системы содержат соответствующее количество воды. Это явление Консен с сотрудниками объяснили «высаливающим» действием целлюлозы, присутствие которой способствует выделению части воды из первоначальной однофазной системы и приводит тем самым к образованию второй фазы.

Таким образом, в хроматографии на бумаге в одних случаях мы встречаем признаки распределительного механизма (Хорнер с сотрудниками, Шуте [2]), в других случаях — адсорбционного механизма. Это не кажется удивительным, если учесть, в каком состоянии находится закрепленная фаза. Мартин [2] развил это представление. Неподвижная фаза по своим свойствам похожа на раствор сахара в воде. Полисахаридная цепочка аморфных частей, прикрепленная одним концом к твердой фазе, образует с водой систему, которая напоминает их раствор. Мур и Стейн сообщают, что этот «раствор» по своему характеру похож на гель и что в тех случаях, когда носитель набухает под действием жидкости, образующей неподвижную фазу, разделяемые вещества распределяются между жидкостью и гелем.

В этом случае возникает вопрос, что считать при хроматографировании на бумаге гелеобразной неподвижной фазой. Вода, вызвавшая набухание и прочно удерживаемая в аморфных областях целлюлозы, вряд ли представляет всю неподвижную фазу. Это объясняется тем, что ее количество (около 7% от веса целлюлозы) мало по сравнению с общим количеством воды, образующей неподвижную фазу. По-видимому, эта вода вообще не участвует в процессе распределения вещества. Гелеобразную неподвижную фазу, очевидно, представляют несколько слоев воды, пропитывающей и окружающей целлюлозные волокна. Структура воды в слоях, расположенных ближе к целлюлозе и связанных с ней водородными мостиками, больше похожа на структуру твердого вещества. В слоях же, расположенных дальше от целлюлозы, вода является «свободной».

Свойства неподвижной жидкости в чистом виде отличаются от свойств той же жидкости, закрепленной на носителе. Это связано с тем, что в последнем случае сказывается влияние носителя. Это различие проявляется в большинстве случаев количественно лишь в величине коэффициента распределения. Однако в некоторых случаях носитель оказывает более сильное влияние, которое приводит к качественным изменениям (например, искривление функции разделения). В этом случае механизм разделения в большей или меньшей степени приближается к адсорбционному механизму.

#### ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП НА ВЕЛИЧИНУ $R_f$

Прежде чем говорить о влиянии структуры веществ на их поведение при распределительной хроматографии на бумаге, нужно напомнить, что, как бы ни были точны соотношения, лежащие в основе количественной теории, они все-таки не являются достоверными. Это связано с тем, что уравнения, с помощью которых выражены отдельные закономерности, найденные на опыте, имеют чисто эмпирический характер, и лишь некоторые из этих уравнений являются полуэмпирическими.

Из самой сущности распределительной хроматографии вытекает, что в тех случаях, когда неподвижная фаза более полярна, чем подвижная, более полярные вещества будут иметь более низкие значения  $R_f$ . Присоединение к молекуле функциональной группы, увеличивающей дипольный момент этой молекулы, приводит к уменьшению величины  $R_f$  (см. табл. 6, стр. 83). Последовательность, в которой функциональная группа понижает величины  $R_f$ , естественно, не остается постоянной для всех систем. Именно благодаря этому метод хроматографии обладает повышенной разделяющей способностью. При использовании различных систем происходит

изменение как относительного положения, так и последовательности зон (пятен) разделяемых веществ. Таким образом, проводя последовательное хроматографирование с использованием различных систем (например, использование двумерной хроматографии или предварительного элюирования); можно разделить сложные смеси, которые при однократном проведении процесса хроматографирования разделить бы не удалось (см. рис. 59). Наглядным примером является проведенное Мартином [1] сопоставление фенола, который преимущественно бывает донором протонов, и коллидина, являющегося преимущественно акцептором протонов, или бутанола (бутанол — более слабый донор протонов, чем фенол). Поскольку имино-группа пролина является более сильным акцептором протонов, чем первичная аминогруппа валина, следует ожидать, что пролин будет иметь большее сродство к фенолу. Действительно, в феноле пролин движется быстрее, чем валин, в то время как в коллидине или бутаноле наблюдается обратное явление. В качестве неподвижной фазы в обоих случаях служит вода, которая является сильным акцептором и донором протонов.

Гомологический инкремент группы  $\text{CH}_2$  в системах, в которых неподвижная фаза более полярна, способствует изменению коэффициента распределения в пользу подвижной фазы и увеличению значения  $R_f$  (см. табл. 9 на стр. 113, 114).

Наличие в молекулах бензольного кольца, а также других колец, имеющих плоскую форму (например, пиридиновое или имидазольное кольцо), способствует более тесному соприкосновению этих молекул с другими плоскими структурами. Так, например, из адсорбционной хроматографии хорошо известен факт преимущественной адсорбции соединений ароматического ряда на активированном угле. В хроматографии на бумаге это явление иногда проявляется в изменении порядка расположения пятен разделяемых веществ, если подвижную фазу, состоящую из алифатического вещества, заменяют подвижной фазой, состоящей из ароматического вещества. Так, например, в системах, содержащих в качестве подвижной фазы бутанола, величина  $R_f$  для фенилаланина меньше, чем для лейцина. В системах же, содержащих в качестве подвижной фазы бензиловый спирт или фенолы, величина  $R_f$  для фенилаланина, наоборот, выше, чем для лейцина. Подобным же образом изменяется последовательность величин  $R_f$  для алифатических и ароматических веществ при замене циклогексана бензолом в качестве подвижной фазы (Мартин [1]).

#### АДДИТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП НА ВЕЛИЧИНУ $R_M$

Еще в самом начале развития хроматографии на бумаге было установлено, что величины  $R_f$  химически подобных веществ имеют близкие значения. Кроме того, была обнаружена связь между числом одинаковых заместителей в молекулах веществ, отличающихся лишь числом таких заместителей, и величиной  $R_f$  этих веществ. Некоторые исследователи (Мартин [1], Бейт-Смит и Уэстолл, Райхль, Шауэр и Булирш) пытались (в какой-то степени независимо друг от друга) выразить эту связь с помощью эмпирического уравнения. Подобно тому как часто поступают в термодинамике при оценке теплот сгорания, эти исследователи пытались разложить общую величину  $R_f$  на составляющие так, как будто бы эта величина состоит из отдельных величин  $R_f$  всех групп в молекуле. Величины, характеризующие влияние отдельных функциональных групп, были приняты

в первом приближении за аддитивные. Приведем пример такого разложения общей величины  $R_f$  молекулы.

Принимая во внимание уравнение (15), можно представить уравнение (20) в следующем виде:

$$A = RT \ln \frac{c_1}{c_2} = RT \ln a = 2,303 \cdot RT \lg \frac{q_{II}}{q_{II}} \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right). \quad (22)$$

Введем следующие обозначения (по Бейт-Смиту и Уэстоллу)<sup>1)</sup>:

$$\lg \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right) = R_M. \quad (23)$$

Позже мы увидим, что величина  $R_M$  имеет для хроматографии достаточно большое значение. С помощью данных, приведенных в табл. 4,

Таблица 4

 ЗНАЧЕНИЯ  $R_M$ 

$R_f$	+0,000	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009
0,00	$+\infty$	+3,000	+2,698	+2,522	+2,396	+2,299	+2,219	+2,152	+2,093	+2,042
0,01	+1,996	+1,954	+1,916	+1,880	+1,848	+1,817	+1,789	+1,762	+1,737	+1,713
$R_f$	+0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	$+\infty$	+1,996	+1,690	+1,510	+1,380	+1,279	+1,195	+1,123	+1,061	+1,005
0,1	+0,954	+0,908	+0,865	+0,825	+0,788	+0,753	+0,720	+0,689	+0,659	+0,630
0,2	+0,602	+0,575	+0,545	+0,525	+0,501	+0,477	+0,454	+0,432	+0,410	+0,389
0,3	+0,368	+0,347	+0,327	+0,308	+0,288	+0,269	+0,250	+0,231	+0,213	+0,194
0,4	+0,176	+0,158	+0,140	+0,122	+0,105	+0,087	+0,070	+0,052	+0,035	+0,017
0,5	-0,000	-0,017	-0,035	-0,052	-0,070	-0,087	-0,105	-0,122	-0,140	-0,158
0,6	-0,176	-0,194	-0,213	-0,231	-0,250	-0,269	-0,288	-0,308	-0,327	-0,347
0,7	-0,368	-0,389	-0,410	-0,432	-0,454	-0,477	-0,501	-0,525	-0,545	-0,575
0,8	-0,602	-0,630	-0,659	-0,689	-0,720	-0,753	-0,788	-0,826	-0,865	-0,908
0,9	-0,954	-1,005	-1,061	-1,123	-1,195	-1,279	-1,380	-1,510	-1,690	-1,996
1,0	$-\infty$									

и графика, изображенного на рис. 27, может быть осуществлен переход от величины  $R_M$  к величине  $R_f$ , и наоборот. Уравнение (22) представим в виде уравнения

$$A = kR_M - kP, \quad (24)$$

где  $k = 2,303 \cdot RT$ , а  $P = 2,303 \cdot RT \lg \frac{q_{II}}{q_{II}}$  — так называемая постоянная бумаги.

<sup>1)</sup> Разные авторы используют в этом случае различные выражения. Так, например, Райхль, а также Френч и Уайлд используют выражение  $-\lg(1/R_f - 1)$ . Мы будем применять обозначение, соответствующее уравнению (23), так как оно наиболее общепринято.

Разложим общую величину работы переноса вещества, выраженную с помощью уравнения (22), на составляющие, соответствующие отдельным группам, т. е. представим дело так, как будто бы молекулу переносят из одного растворителя в другой по частям. Если работа переноса основной молекулы, не содержащей заместителей,  $A_0$ , работа переноса  $m$  одинаковых заместителей типа М равна  $mA_M$ , работа переноса  $n$  одинаковых заместителей типа N составляет  $nA_N$  и т. д., то общая работа переноса составит

$$A = A_0 + mA_M + nA_N + \dots \quad (26)$$

Величина  $A_0$  для данного ряда соединений является постоянной. Подстановка этого уравнения в уравнение (24) дает

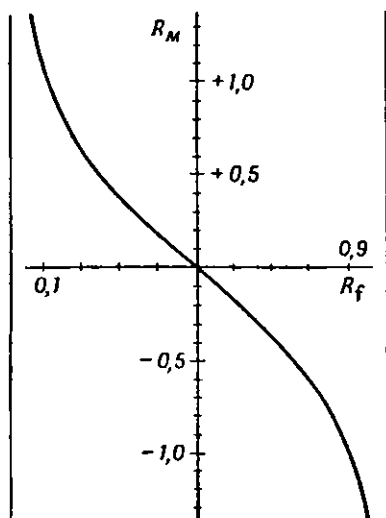
$$R_M = \frac{1}{k} A_0 + \frac{m}{k} A_M + \frac{n}{k} A_N + \dots + P. \quad (26a)$$

Введем еще следующие обозначения:

$$A_0/k = G_0, \quad A_M/k = G_M, \dots,$$

тогда

$$R_M = G_0 + mG_M + nG_N + \dots + P. \quad (26b)$$



Р и с. 27. Графическое изображение связи между величинами  $R_M$  и  $R_f$  (Франц и Йокл).

Величины  $G_M, G_N, \dots$  называют иногда групповыми константами, величину  $G_0$  — константой основной группы; коэффициенты  $m, n, \dots$  указывают количество соответствующих групп.

Если в распоряжении нет достаточно удобных веществ для сравнения, то иногда бывает затруднительно разделить молекулу без остатка на отдельные группы, выраженные в уравнении (26b) через их константы и коэффициенты. Поэтому величину  $R_M$  разделяют лишь на те группы, для которых известны величины групповых констант и коэффициентов. Остаток вместе с постоянной бумаги включают в так называемую основную константу Z. В этом случае уравнение (26b) приобретает следующий вид:

$$R_M = mG_M + nG_N + \dots + Z. \quad (26в)$$

В соответствии с уравнениями (26b) и (26в) величина  $R_M$  является линейной функцией числа одинаковых групп в молекуле (при условии постоянства количества остальных групп). Это было подтверждено на опыте как в работах уже цитировавшихся авторов, так и в работах ряда других исследователей (Парди; для гомологического ряда — Хайс и Моравек, см. рис. 142 на стр. 328; Кальбе, Ишервуд и Хейнс, см. рис. 126 на стр. 231).

Измерение величин  $R_M$  для различных веществ, содержащих одинаковые группы и отличающихся лишь количеством этих групп, дает систему линейных уравнений. Эти уравнения содержат экспериментально найденные значения  $R_M$ , а также групповые константы и коэффициенты. Предлагаемое здесь обобщение было дано Шауэрмом и Булришем [1]. Если мы имеем  $n$  различных веществ, каждое из которых содержит самое большее  $n - 1$  различных функциональных групп, мы должны будем измерить величины  $R_M$  для всех  $n$  веществ в  $n$  различных системах растворителей. В результате

число экспериментально найденных величин  $R_M$  составит  $n^2$ , что дает  $n^2$  линейных уравнений. Из этих уравнений можно найти  $n^2$  неизвестных величин. Неизвестными величинами могут быть групповые константы, коэффициенты и постоянные бумаги. Имеются следующие три различные возможности:

1) Измеряем величины  $R_M$  для всех веществ с известной структурой, т. е. определяем, какие группы и в каком количестве входят в молекулы этих веществ. После этого можно определить остальные величины, т. е.  $n - 1$  групповых констант в  $n$  растворителях [всего  $n(n-1)$  величин] и  $n$  постоянных бумаги (для каждого растворителя одно значение).

2) Измеряем величины  $R_M$  для всех веществ. Из анализа узнаем, какие группы содержатся в молекулах этих веществ. Количество этих групп, однако, остается при этом неизвестным. Групповые константы этих веществ для отдельных растворителей известны из данных предыдущих измерений. Если эти данные имеются для всех растворителей, то можно вычислить  $n(n-1)$  коэффициентов и  $n$  постоянных бумаги. Коэффициенты для одного и того же вещества могут быть неодинаковыми в различных растворителях, так как вещество может находиться в различной молекулярной форме. Так ли это, определяют по совпадению или расхождению значений этих коэффициентов.

3) Если из предварительных измерений известны групповые константы и если известно строение веществ, то для них можно заранее вычислить величины  $R_M$ .

При большом количестве веществ получается, естественно, система из большого числа уравнений. Вычисление детерминантов, с помощью которых наиболее удобно решать такую систему уравнений, в этом случае является весьма трудоемкой работой. Электронных же вычислительных машин, которые можно использовать для решения систем линейных уравнений, очень часто не бывает под рукой.

Неудобство описанного метода состоит в том, что измерение величин  $R_M$  не является точным, и, когда число уравнений, имеющихся в распоряжении, равно числу неизвестных, результат расчета ненадежен. Ввиду этого лучше провести большее число измерений величин  $R_M$  и взять соответственно число уравнений большее, чем число неизвестных, а результаты обработать статистически.

В действительности, однако, влияние отдельных функциональных групп в молекуле не является аддитивным.

Прежде всего необходимо ввести поправки в виде специальных членов  $G$  (которые также аддитивны), учитывающих присутствие кратных связей, различных циклов и т. п. (табл. 5).

Кроме того, групповые константы не являются постоянными для одних и тех же групп, если эти группы находятся в различных положениях. Поэтому групповую константу разлагают на фактор группы в истинном смысле слова и фактор положения этой группы. Иногда оба эти фактора лучше выражают действительность в виде произведения (Мацек с сотрудниками [2]), а иногда (что наблюдается чаще) — в виде суммы (см. стр. 527).

Наконец, групповая константа зависит от общего строения молекулы, содержащей эту группу. На этот факт раньше не обращали внимания. Лишь Шауэр и Булрш [2] весьма кратко остановились на возможности выражения этой зависимости для любого члена  $G$  с помощью степенных рядов. Однако в опубликованных работах мы не встречали развития этой идеи, которое, несомненно, связано с большими трудностями.

## ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ВЕЛИЧИНУ $R_f$

### Пространственные затруднения.

#### Конформация производных циклогексана

Если доступ молекул растворителя к функциональной группе какого-либо изомера затруднен в большей степени, чем доступ к аналогичной группе другого изомера, то в этом случае ухудшается возможность взаимо-

Таблица 5

РАЗЛОЖЕНИЕ ВЕЛИЧИН  $R_M$  НА ГРУППОВЫЕ КОНСТАНТЫ

Система растворителей	Бумага	Автор расчета
Амиловый спирт (1 ч.) НСООН 5 н. (1 ч.)	Ватман 1	Райхль а)
Этанол (80 ч.) NH <sub>3</sub> ( $d=0,88$ ) (4 ч.) H <sub>2</sub> O (16 ч.)	Ватман 54	Райхль б)
Фенол, насыщенный водой Купрон 0,1%	Ватман 1	Шауэр и Булирш [1] в)

КОНСТАНТЫ, ВЫРАЖЕННЫЕ ЧЕРЕЗ ВЕЛИЧИНЫ  $R_M$

Постоянная бумаги и системы (P)	-0,97	-0,43	-0,57 г)
Групповые константы (G)			
атом С . . . . .	-0,12	-0,08	-0,27
разветвление цепи . . . . .	-0,25	-0,05	+0,07
замыкание бензольного кольца . . . . .			+0,61
бензольное кольцо . . . . .			-1,01
первичная группа OH спирта . . . . .	+0,73	+0,20	+0,36
вторичная группа OH спирта . . . . .	+0,50	+0,13	+0,38
третичная группа OH спирта . . . . .	+0,58		
группа OH фенола . . . . .			+0,91
$\alpha$ -CO (кетон) . . . . .	+0,39		
COOH . . . . .	+0,63	+0,56	+1,07
$\alpha$ -NH <sub>2</sub> . . . . .	+1,65	+0,24	+0,20
$\delta$ -NH <sub>2</sub> . . . . .			+0,89
$\epsilon$ -NH <sub>2</sub> . . . . .			+0,96
группа имидазола . . . . .			-0,25
--S-- . . . . .			+0,02
--S--S-- . . . . .			+0,04

НЕСКОЛЬКО ПРИМЕРОВ (ВЕЛИЧИНЫ  $R_p$ ) а)

Вещество	Найдено	Вычислено	Найдено	Вычислено	Найдено	Вычислено
Пропионовая кислота . . . . .			0,56	0,56		
Молочная кислота . . . . .	0,62	0,61	0,49	0,49		
Пировиноградная кислота . . . . .	0,65	0,67				
Малоновая кислота . . . . .	0,53	0,54	0,26	0,26		
Масляная кислота . . . . .			0,64	0,61		
$\alpha$ , $\beta$ -Диксимасляная кислота . . . . .	0,40	0,40				
$\alpha$ , $\gamma$ -Диксимасляная кислота . . . . .	0,29	0,28				

Продолжение табл. 5

Вещество	Найдено	Вычислено	Найдено	Вычислено	Найдено	Вычислено
Янтарная кислота	0,61	0,61	0,29	0,30		
Яблочная кислота	0,32	0,33	0,25	0,24		
Винная кислота	0,14	0,13	0,19	0,19		
Аспарагиновая кислота	0,03	0,03	0,18	0,20	0,17	0,17
Алаанин . . . .			0,43	0,43	0,59	0,56
Серин . . . . .			0,32	0,32	0,36	0,36
Лизин . . . . .					0,48	0,48
Цистин . . . . .					0,29	0,29 <sup>д)</sup>
Метионин . . . .					0,81	0,81
Тирозин . . . . .					0,62	0,62
Гистидин . . . .					0,69	0,70

Примечание. Все величины были получены при использовании нисходящего проявления, которое проводили при комнатной температуре.

Экспериментальные значения  $R_f$  получены следующими авторами:

а) Buch M. L., Montgomery R., Porter W. L., Anal. Chem., 24, 489 (1952).

б) Long A. G., Quayle J. R., Stedman R. J., J. Chem. Soc., 1951, 2197.

в) Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Biochem. J., 38, 224 (1944).

г) Величина  $P$  вычислена с помощью уравнения:

$$2R_M(\text{метионин}) - R_M(\text{цистин}) = P + G \quad (\text{атом C}); \quad P = 2 \cdot (-0,63) - 0,39 - 4 \cdot (-0,27) = -0,57.$$

д) Образец расчета для цистина:

1P	-0,57
6C	-1,62
2COOH	+2,14
2NH <sub>2</sub>	+0,40
-S-S-	+0,04

Итого:  $R_M$  +0,39  $R_f$  0,29

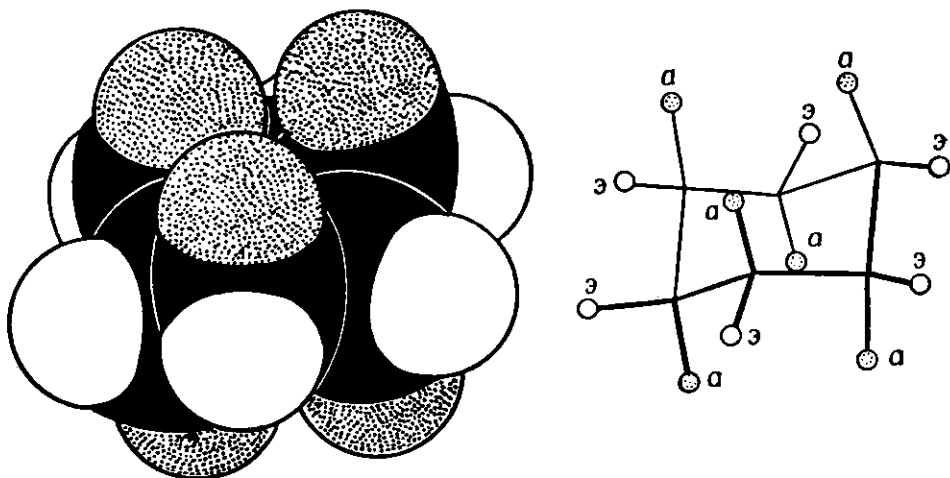
действия функциональной группы первого изомера с растворителем. Это в свою очередь приводит к изменению коэффициента распределения в ущерб этой фазе. В том случае, если неподвижная фаза более полярна, трудность повышения величины  $R_f$  будет объясняться пространственным фактором.

В качестве примера такого пространственного эффекта можно привести хорошо известный *орто*-эффект, наблюдаемый для крезолов: величина  $R_f$  для *о*-крезола больше, чем для *м*- и *п*-крезолов. Влиянию пространственных факторов можно также приписать большое различие между коэффициентами распределения для 5- и 6-окси-1,2,3,4-тетрагидронафталина (Орчин и Голумбик).

Особенно наглядно пространственное влияние можно показать на примере конденсированных циклогексановых колец стероидов. Пространственная модель циклогексанового ядра в предпочтительной «креслообразной» форме (по Бартону) представлена на рис. 28. Из двенадцати атомов водорода циклогексанового кольца три атома, расположенные близко друг к другу, находятся выше плоскости молекулы, другие три атома — ниже (аксиальные), а шесть остальных расположены в плоскости молекулы (экваториальные). Таким образом, аксиальные атомы водорода или заместители, которые заменяют эти атомы водорода, будут в извест-

ной степени находиться внутри молекулы, и, следовательно, они будут менее доступны для окружающих молекул растворителя, чем заместители, находящиеся в экваториальных положениях. Если молекулы каким-либо образом зафиксированы в указанной форме, то расположенный аксиально полярный заместитель (или, точнее, аксиальный заместитель, способный к образованию водородного мостика) будет приводить к меньшему повышению гидрофильности молекулы, чем эти же заместители, расположенные экваториально.

Влияние вида заместителей проявляется, конечно, еще сильнее, если форма кольца зафиксирована путем его конденсации с другим кольцом, как это, например, имеет место у стероидов. Как и следовало ожидать,



Р и с. 28. Креслообразная конформация циклогексана.

Слева показана модель, предложенная Стюартом. Справа представлены связи между центрами атомов. Черные кружки — атомы углерода, белые — шесть экваториальных атомов водорода (а), кружки с точками (3+3) — аксиальные атомы водорода (а).

у стероидных веществ с гидроксильными группами в аксиальных положениях (в системах с более полярной неподвижной фазой) величина  $R_f$  имеет большее значение, чем у их стереоизомеров с гидроксильными группами, расположенными в экваториальных положениях. Все это, конечно, имеет значение лишь в том случае, если не сказываются какие-либо побочные влияния.

### Дипольный момент

Если неподвижная фаза более полярна, то увеличение дипольного момента приводит к снижению значения  $R_f$ . Франц и Латинак [2] пытались эмпирически найти для изомеров положения ароматического ряда связь между изменением дипольного момента и величиной  $R_f$ . Ими было предложено следующее уравнение:

$$R_f = K \pm 0,1\mu, \quad (27a)$$

где  $K$  — константа, зависящая от вида растворителя и типа изомеров. Знак плюс соответствует случаю, когда неподвижная фаза более полярна, чем подвижная; знак минус соответствует обратному случаю. Дипольный момент выражен в дебаях. Исходя из определенных предпосылок, авторы

рассчитали дипольные моменты различных веществ, для которых были затем определены величины  $R_f$ . Соответствие с уравнением (27а) было найдено в пределах величин  $R_f$  от 0,16 до 0,84.

Некоторые отклонения и аномалии (например, необходимость для ряда веществ вводить в формулу значение дипольного момента с обратным знаком), встречавшиеся в более ранних работах, вызваны прежде всего тем, что предпосылки, положенные в основу расчета дипольного момента, не всегда выполнялись в действительности. Значение дипольного момента  $\mu$  определялось в виде векторной суммы слагаемых, соответствовавших отдельным группам (табл. 6).

Таблица 6  
ДИПОЛЬНЫЕ МОМЕНТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП (В ДЕБАЯХ)  
(Таблица составлена Францем и Латинаком [2] на основании литературных данных)

Группа	Фенил	Метил	Этил	$\alpha$ -Нафтил	$\beta$ -Нафтил
CH <sub>3</sub>	0,4				
OCH <sub>3</sub>	1,25				
SCH <sub>3</sub>	1,27	1,40			
NH <sub>3</sub>	1,53		1,38	1,53	1,77
J	1,30	1,50	1,8		
Br	1,52		1,8		
Cl	1,55	1,7	1,8	1,59	
F	1,43				
OH	1,6	1,66	1,7	1,0	1,3
COOH	1,7	1,6	1,7		
COOCH <sub>3</sub>	1,9	1,75	1,9		
CHO	2,8	2,5	2,5		
COCH <sub>3</sub>	2,9	2,74			
CN	4,0	3,4	3,57		
NO <sub>2</sub>	3,98	3,1	3,3	3,98	4,36
NO	3,14				
COCl	3,32				
COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,92				
N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,58				
CH <sub>2</sub> Cl	1,69				
CHCl <sub>2</sub>	1,95				
CCl <sub>3</sub>	2,11	1,57			
CH <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	3,30	3,29			
SO <sub>2</sub>	5,1	4,4			

Франц и Йокл [1] предложили ввести в уравнение (26в) член, учитывающий влияние дипольного момента. В том случае, если неподвижная фаза более полярна, такое уравнение будет иметь следующий вид:

$$R_M = Z + mG_M + nG_N + \dots + 2,3 \lg \frac{1+0,1\mu}{1-0,1\mu} \quad (276)$$

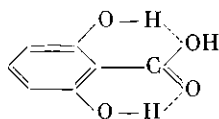
#### Влияние внутримолекулярных водородных мостиков

Образование внутримолекулярного водородного мостика приводит к ограничению возможности для соответствующей группы образовывать водородную связь с молекулами растворителя. Благодаря этому происходит понижение растворимости таких веществ в воде и полярных раствори-

телях, а также увеличение значения  $R_f$  в системах, где такой растворитель образует неподвижную фазу.

Так, например, для салициловой кислоты (*о*-оксибензойной) величина  $R_f$  намного больше, чем для *м*- и *п*-оксибензойных кислот. Аналогичный *орто*-эффект можно наблюдать и для многих других соединений.

Поведение 2,6-диоксибензойной ( $\gamma$ -резорциловой) кислоты свидетельствует об образовании двойного хелатного комплекса (Вагнер):

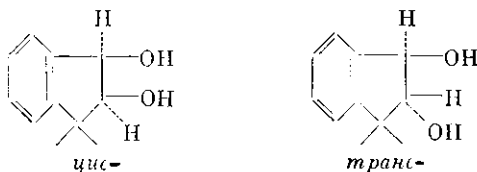


В щелочной среде величина  $R_f$  этой кислоты больше, чем салициловой кислоты.

Особенно богатый материал был собран при изучении производных флавона и некоторых других фенолов. Полученные данные и попытки их интерпретации были опубликованы Симпсоном и Гарденом, а также Шоу и Симпсоном (см. стр. 312).

#### *цис-транс*- и *трео-эритро*-изомерия

Пространственные затруднения, внутримолекулярные водородные мостики, различие в дипольных моментах и константах диссоциации могут служить причиной различного поведения *цис-транс*-изомеров при их хроматографическом разделении (см. также стр. 257). Из литературных данных в качестве такого примера приведем разделение *dl-цис*- и *dl-транс*-хризантемовых кислот (Акри и Бейберс), а также *цис*-1,2-индандиола (большее значение  $R_f$ ) и *транс*-1,2-индандиола (значительно меньшее значение  $R_f$ ) (Брукс и Юнг).



В противоположность этому для таких пар кислот, как малеиновая и фумаровая, цитраконовая и мезаконовая, *цис*- и *транс*-коричная, величина  $R_f$  меньше для *цис*-изомеров (Еленков).

#### Оптические изомеры

В большинстве случаев разделение оптически активных изомеров не удается осуществить на бумаге даже при использовании оптически активных растворителей. Иногда их разделение становится возможным в присутствии оптически активного компонента системы растворителей. В других случаях разделение удается осуществить, и не прибегая к использованию оптически активных растворителей или пропитки. В этом случае следует предположить, что разделяемые вещества приближаются к поверхности неподвижной фазы и связываются на ней с асимметричными макромолекулами целлюлозы, причем легкость приближения к поверхности для обоих разделяемых оптических изомеров разная и сила их связи

с этими макромолекулами неодинакова. В этом случае обычно говорят об адсорбции на целлюлозе.

В большинстве работ, посвященных разделению оптических изомеров, речь идет об ароматических веществах, имеющих не менее двух полярных функциональных групп. Плоские жесткие кольца необходимы, по-видимому, для того, чтобы молекула могла плотно прилегать к длинным плоским молекулам целлюлозы, состоящим из звеньев пиранозы. Эти пиранозные звенья содержат большое количество гидроксильных групп, способных образовывать водородные мостики. Давно известен пример кинуренина (антрацилаланина; Фудзисава, Сенси, Далглиш, Мейсон и Берг), *d*-форма которого имеет меньшее значение  $R_f$ , чем *l*-форма. В случае 2,5-диоксифенилаланина, наоборот,  $R_f$  меньше для *l*-формы.

Результаты опытов по разделению кинуренина, его производных, а также некоторых оксипроизводных фенилаланина позволили Далглишу сделать некоторые ориентировочные выводы. Так, он предположил, что для разделения изомеров этого типа последние должны содержать по крайней мере две полярные группы (карбоксильную группу и аминогруппу) в боковой цепи и плоское ароматическое кольцо. Обеспечение этого условия делает возможным закрепление молекул разделяемых веществ на целлюлозе в трех точках. Кроме того, должно быть соответствующее расстояние между отдельными группами и заместителями в ядре.

Интересно отметить, что вещества, отличающиеся от кинуренина тем, что у них кетогруппа заменена группой  $\text{CH}_2$  или  $\text{CNOH}$ , утрачивают способность к разделению (Вейхерт). Автор считает, что условием разделения таких веществ является наличие водородного мостика между группой  $\text{NH}_2$  в ядре и карбонильной группой. Однако интересно, что *d* и *l*-дезокскинуренины можно разделить благодаря различной растворимости молекулярных соединений, образованных этими изомерами с сахарозой.

В большинстве приводившихся до сих пор примеров разделения мы имели дело с ароматическими аминокислотами и аминами. Однако разделение удавалось осуществить и в случае алифатических веществ, например разделение глутаминовой и  $\alpha, \epsilon$ -диаминопимелиновой кислот.

### Связь между температурой плавления и величиной $R_f$

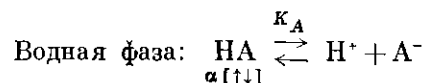
Эта интересная взаимосвязь объясняется следующим образом. Возникновение межмолекулярных водородных мостиков приводит, с одной стороны, к увеличению температуры плавления вещества, а с другой — к увеличению его растворимости в воде, следовательно, к уменьшению значения  $R_f$ . Косвенная связь между температурой плавления и величиной  $R_f$  была обнаружена для некоторых групп сахаров (Джермин и Ишервуд, Ишервуд и Джермин).

### ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХСЯ ВЕЩЕСТВ

Электролитическая диссоциация и способность веществ к образованию комплексных соединений имеет большое значение в хроматографии на бумаге. Этими свойствами веществ объясняется в некоторых случаях неправильная форма пятен. Изменяя эти свойства, можно избежать возникновения пятен неправильной формы, выбрать рациональный вариант системы растворителей и сделать количественный вывод о характере и числе некоторых функциональных групп.

### Влияние pH на коэффициент распределения и значение $R_f$

Если вещества диссоциируют в водной фазе системы растворителей и не диссоциируют в органической фазе, то в процессе распределения этих веществ будут устанавливаться два равновесия. Представим схематически этот случай на примере слабой одноосновной кислоты HA:

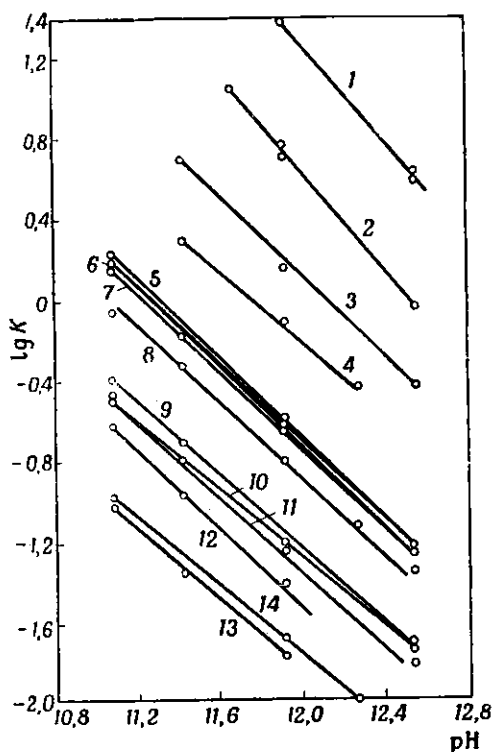


Органическая фаза: HA

Кажущийся коэффициент распределения  $\alpha^*$  будет выражаться следующим образом:

$$\alpha^* = \frac{[\text{HA}]_в + [\text{A}^-]_в}{[\text{HA}]_о} \quad (28a)$$

Квадратными скобками обозначены концентрации, индексами «в»



Р и с. 29. Зависимость коэффициентов распределения ( $K=1/\alpha^*$ ) некоторых фенолов от pH в системе циклогексан — 0,5M фосфатный буферный раствор (Голумбик с сотрудниками).

Ассоциация фенолов в циклогексане не наблюдалась. 1—o-циклогексилфенол; 2 — n-циклогексилфенол; 3 — o-фенилфенол; 4—2,6-ксиленол; 5—2,4-ксиленол; 6—3-метил-5-этилфенол; 7—o-этилфенол; 8—2,5-ксиленол; 9—n-этилфенол; 10—m-этилфенол; 11—3,5-ксиленол; 12—o-крезол; 13 — m-крезол; 14 — n-крезол.

и «о» — соответственно водная и органическая фазы. Введем в уравнение (28a) коэффициент распределения  $\alpha = [\text{HA}]_в / [\text{HA}]_о$  и константу диссоциации кислоты в воде  $K_A = [\text{H}^+] [\text{A}^-] / [\text{HA}]_в$ . В этом случае получаем

$$\alpha^* = \alpha \left( 1 + \frac{K_A}{[\text{H}^+]} \right) \quad (28b)$$

Если  $[\text{H}^+] \ll K_A$ , то

$$\alpha^* = \alpha \frac{K_A}{[\text{H}^+]} \quad (29)$$

или

$$\lg \alpha^* = \lg \alpha - pK_A + \text{pH}.$$

Для однокислотного слабого основания с константой диссоциации  $K_B$  при  $[\text{H}^+] \gg K_B \cdot 10^{-14}$  будем иметь

$$\alpha^* = \alpha K_B [\text{H}^+] \cdot 10^{14} \quad (30)$$

или

$$\lg \alpha^* = \lg \alpha + 14 - pK_B - \text{pH}.$$

Голумбик установил линейную зависимость между  $\lg \alpha^*$  и величиной pH (рис. 29). Если принять во внимание уравнения (15) и (23), то можно

заметить, что между значениями  $R_M$  и  $pH$  также должна существовать линейная зависимость. Благодаря этому создается возможность разделения веществ, отличающихся значениями  $pK$ : вещества, которые не разделяются при одном значении  $pH$  (одинаковые значения  $R_f$ ), удастся разделить путем повторения хроматографического процесса при другом значении  $pH$ . Этот принцип был использован независимо друг от друга Леви с Терьесеном и Хайсом с сотрудниками [1] при колоночной распределительной хроматографии пенициллина.

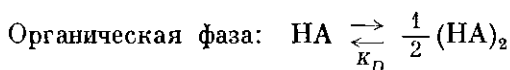
### Влияние диссоциации и ассоциации на форму пятен

Если система растворителей не является хорошим буфером, то присутствие слабых кислот и оснований в различных участках бумаги будет оказывать влияние на величину  $pH$ , а тем самым и на коэффициент  $\alpha^*$ , который зависит от  $pH$ .

В том случае, если неподвижной фазой является вода, повышение концентрации слабых кислот будет приводить к уменьшению величины  $pH$ . Коэффициент  $\alpha^*$  также будет обладать в месте повышенной концентрации слабой кислоты меньшим значением, т. е. распределительное равновесие в этом случае будет сдвинуто в сторону подвижной фазы. В тех местах, где концентрация кислоты повышена, скорость ее перемещения будет больше. Таким образом, результат получается таким, как если бы функция разделения была выпуклой. Пятна слабых кислот в незабуференной среде имеют резкий передний и размытый задний край. Для слабых оснований наблюдается обратное явление.

Если растворители неспособны образовывать межмолекулярные водородные мостики или если они образуют лишь очень слабые мостики (например, углеводороды, хлорированные углеводороды), то в таких растворителях может произойти ассоциация растворенных молекул веществ, способных функционировать в качестве доноров и акцепторов протона.

Нередки случаи, когда вещества, подвергающиеся ассоциации в органической фазе, в водной фазе диссоциируют. Например, для одноосновной слабой кислоты, димеризующейся в органической фазе, имеем:



где  $K_D = [(HA)_2]_o / [HA]_o^2$ . В этом случае  $\alpha^*$  будет выражаться следующим образом:

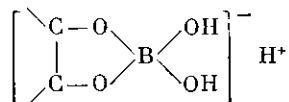
$$\alpha^* = \frac{[HA]_v + [A^-]_v}{[HA]_o + 2[(HA)_2]_o} = \alpha^2 \frac{1 + \frac{K_A}{[H^+]}}{\alpha + 2[HA]_v K_D} = \alpha \frac{1 + \frac{K_A}{[H^+]}}{1 + 2[HA]_o K_D}. \quad (31)$$

Пятна опять будут иметь асимметричный вид.

### Образование комплексов с компонентами системы растворителей

Явление образования комплексов с компонентами системы растворителей лежит в основе большого числа случаев разделения неорганических веществ, а также некоторых органических веществ. Например, при хрома-

тографическом разделении *o*-дифенолов и  $\alpha$ -гликолей большое значение имеет образование комплексов с борной кислотой. По Бозекену комплексы с борной кислотой имеют следующее строение:



Эти комплексы обладают значительной полярностью, а, следовательно, величины  $R_f$  этих комплексов в системах с неподвижной полярной фазой будут иметь меньшее значение, чем величины  $R_f$  исходных веществ (Мазек с сотрудниками [2], Вахтмейстер). У ациклических веществ, когда ничто не препятствует свободному вращению вокруг оси, соединяющей оба связанных с гидроксильными группами атома углерода, образование комплексов с борной кислотой так же, как и у ароматических колец плоской формы, будет происходить в том случае, если по соседству не будет находиться заместитель, занимающий большой объем и способный благодаря этому вызывать пространственные затруднения. В случае остальных циклических соединений (например, сахаров и стероидов), а иногда и ациклических соединений, у которых возможность свободного вращения понижена, образование комплексов, которое выражается в изменении значения  $R_f$ , может дать ценные сведения о взаимном пространственном расположении обеих гидроксильных групп. Это объясняется тем, что такие комплексы не могут образоваться, если величины валентных углов не благоприятствуют этому, т. е. если мы имеем дело с *транс*-формой (см. стр. 258 и 547).

## ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

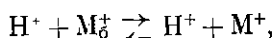
При обычной адсорбционной и распределительной хроматографии разделение осуществляется в результате взаимодействия между всей молекулой вещества и молекулами растворителя или адсорбента (молекулярная хроматография). При ионообменной хроматографии разделение основывается прежде всего на электростатическом взаимодействии между ионами, находящимися в растворе, и поверхностью твердого остова ионообменника, содержащего группы, способные ионизироваться. Если эти группы отщепляют в водном растворе протон, который может быть замещен катионом, то мы имеем дело с катионообменником. Если же они отщепляют гидроксил, то речь идет об анионообменнике. Ионообменники, кроме того, могут отличаться друг от друга способностью к набуханию, емкостью (количеством способных к обмену групп), а также степенью ионизации групп. Степень ионизации указывает на силу кислот и оснований, содержащихся в ионообменнике.

В настоящее время в подавляющем большинстве случаев используют синтетические органические ионообменники и искусственные смолы, которые содержат способные к ионизации группы кислого (главным образом  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{COOH}$ , фенольный гидроксил) или основного (вторичные, третичные и четвертичные аминогруппы) характера.

В качестве ионообменников могут быть также использованы целлюлоза и ее производные (Шуте). Сама целлюлоза содержит небольшое количество карбоксильных групп. Эти группы появляются в процессе омыления эфиров, присутствующих в исходной целлюлозе, а также в результате происходящего при технологической обработке целлюлозы окисле-

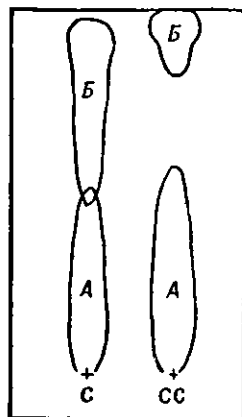
ния первичных спиртовых групп, находящихся в глюкозных остатках в положении 6 (см. стр. 102). Емкость целлюлозы как катионообменника, по данным Брода и Шёнфельда, составляет около  $5 \cdot 10^{-5}$  экв/г, что приблизительно соответствует одной карбоксильной группе на 90—130 глюкозных остатков (Брейнигер). Ионизация карбоксильных групп целлюлозы объясняет ее отрицательный заряд, роль которого учитывалась уже первыми исследователями в области капиллярного анализа. Ионообменники большой емкости можно приготовить из целлюлозы, используя различные способы ее химической обработки (см. стр. 108).

Хроматографическое разделение веществ, находящихся в водном растворе, с использованием чистой бумаги или бумаги, пропитанной неорганическими адсорбентами, во многих случаях основано на принципах ионообменной хроматографии (Шуте [1]) (рис. 30). Если на бумагу нанести кислоту (например, салициловую) и проводить хроматографирование водой, то водородные ионы этой кислоты будут обмениваться с неорганическими ионами  $M^+$ , которые были первоначально связаны с карбоксильными группами целлюлозы:

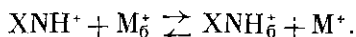


Р и с. 30. Доказательство существования обмена ионов при хроматографировании на бумаге (Шуте).

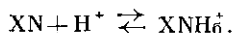
На край полосы бумаги нанесено 20 мкг салициловой (С) и сульфосалициловой (СС) кислот. Для хроматографирования была использована вода. Опрыскивание метилротом дает пятна в тех местах, где среда имеет кислую реакцию (А). Опрыскивание хлорным железом дает пятна солей соответствующих фенолов (Б).



где индекс «б» означает ионы, связанные с бумагой. Вблизи от старта останется вытянутое пятно, показывающее кислую реакцию. Соль нанесенной на бумагу кислоты и ионов (например, ионов кальция) перемещается вместе с возможным избытком кислоты быстрее (с большим значением  $R_f$ ). Если бумагу предварительно промыть соляной кислотой, то обмен с водородными ионами нанесенной на бумагу кислоты происходить не будет. В этом случае мы будем иметь дело с распределительной хроматографией, при которой вещество будет распределяться между водой неподвижной фазы и водой подвижной фазы. Если при разделении алкалоидов вести хроматографирование водой, катион алкалоида ( $XNH^+$ ) будет обмениваться на катион бумаги:



Если бумага находится в  $H^+$ -форме, будет протекать следующая реакция:



Алкалоид, связанный с бумагой в виде  $XNH_0^+$ , можно обменивать на другой катион, который способен образовать с бумагой более прочную связь. Это позволяет осуществить разделение смеси катионов, используя вытеснительный принцип.

Шуте [2] обращает внимание на то, что при разделении диссоциирующих веществ методом распределительной хроматографии может происходить обмен ионов между органическим растворителем и неподвижной

водной фазой. Это явление могло бы объяснить некоторые аномалии, наблюдающиеся при разделении алкалоидов с помощью хроматографирования на бумаге. Так, пропитка бумаги нейтральными солями (например, KCl), которая никак не должна влиять на pH среды, улучшает разделение (Мюнье с сотрудниками). Другими словами, избыток соли препятствует протеканию обмена катионов алкалоидов на карбоксильных группах целлюлозы (см. рис. 211).

## ЛИТЕРАТУРА

- Ackerman B. J., Cassidy H. G., *Anal. Chem.*, **26**, 1874 (1954).  
 Acree F., Babers F. H., *Science*, **120**, 948 (1954).  
 Barton D. H. R., *J. Chem. Soc.*, **1953**, 1927.  
 Bate-Smith E. C., Westall R. G., *Biochim. biophys. Acta*, **4**, 427 (1950).  
 Böeseken J., *Advances in Carbohydr. Chem.*, **4**, 189 (1949).  
 Boyd G. E., Myers Jr. L. S., Adamson A. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2849 (1947).  
 Bräuniger H., *Grundlagen und allgemeine Fragen der Papierchromatographie. Volk und Gesundheit*, Berlin (1955).  
 Brdička R., *Základy fyzikální chemie. Přírodovědecké vyd.*, Praha (1952).  
 Бреслер С. Е., *ДАН СССР*, **90**, 205 (1953).  
 Broda E., Schönfeld T., *Monatsh. Chem.*, **81**, 459 (1950).  
 Brooks C. J., Young L., *Biochem. J.*, **63**, 264 (1956).  
 Burma D. P., *Anal. Chem.*, **25**, 549 (1953).  
 Волькенштейн М. В., *Строение и физические свойства молекул*, Изд. АН СССР, Москва (1955).  
 Carman P. C., *Flow of Gases through Porous Bodies*. Butterworths, New York (1955).  
 Cassidy H. G., *Fundamentals of Chromatography (Technique of Organic Chemistry, Vol. X)*. Interscience, New York (1957). [1]  
 Cassidy H. G., Ezrin M., Updegraff J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1615 (1953). [2]  
 Claesson S., *Discussion Faraday Soc.*, **7**, 34 (1949).  
 Collander R., *Acta chem. Scand.*, **3**, 717 (1949).  
 Condesen R., Gordon A. H., Martin A. J. P., *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944).  
 Curti R., Colombo U., Clerici F., *Gazz. chim. Ital.*, **82**, 491 (1952); *C. A.*, **1953**, 4092.  
 Dalglish C. E., *Biochem. J.*, **52**, 3 (1952); *J. Chem. Soc.*, **1952**, 3940.  
 de Vault D., *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 532 (1943).  
 Еленков Д., *Izv. chim. In-t B'lg. Akad. Nauk*, **2**, 177 (1953). *РЖХ*, № 32204 (1954).  
 Елисеева Г. Д., *Труды Комиссии анал. хим.*, **6** (9), 439 (1955).  
 Franc J., Jokl J., *Chem. Listy*, **50**, 373 (1956).  
 Franc J., Latinák J., *Chem. Listy*, **49**, 317 (1955).  
 French D., Wild G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2612 (1953).  
 Fujisawa Y., *J. Osaka City med. Center.*, **1**, 7 (1951); *C. A.*, **48**, 13550e (1954).  
 Fujita H., *J. phys. Chem.*, **56**, 625 (1952).  
 Гапон Е. Н., Беленькая И. М., *Коллоидный журнал*, **14**, 323 (1952).  
 Glückauf E., *Disc. Faraday Soc.*, **7**, 12 (1939).  
 Golumbic C., Orchin M., Weller S., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2624 (1949).  
 Goppegröder F., *Capillaranalyse*, E. Birkhäuser, Basel (1901).  
 Жуховицкий А. А., Туркельтауб И. М., Соколов В. А., *ДАН СССР*, **88**, 859 (1953); Жуховицкий А. А., *Труды Комиссии аналитической химии*, **6** (9), 33 (1955).  
 Hais I. M., Košťál J. V., Vondráček M., Wiesner K., *Čas. čes. Lékařnictva, věd. Příl.*, **58**, 29 (1945). [1]  
 Hais I. M., Morávek L., *Biol. Listy*, **31**, 144 (1950). [2]  
 Hecker E., *Chimia*, **8**, 233 (1954).  
 Herout V., в книге «Chromatografie. Přírodovědecké nakl», Praha, 1952, Str. 26, 32. [1]  
 Hildebrand J. H., Rotariu G. J., *Anal. Chem.*, **24**, 770 (1952). [1]  
 Hildebrand J. H., Scott R. L., *Solubility of Nonelectrolytes*, New York (1950). [2]  
 Horner L., Emrich W., Kirschner A., *Z. Electrochem.*, **56**, 987 (1952).  
 Ильин Б. В., *Природа адсорбционных сил*, Изд. АН СССР, Москва (1952).  
 Isherwood F. A., Hanes C. S., *Biochem. J.*, **55**, 824 (1953). [1]  
 Isherwood F. A., Jermy M. A., *Biochem. J.*, **48**, 515 (1951). [2]  
 Jermy M. A., Isherwood F. A., *Biochem. J.*, **44**, 402 (1949).

- Kalbe H., *Z. physiol. Chem.*, **297**, 19 (1954).
- Kozeny J., *Sitzber. Akad. Wiss., Wien., Abt. IIa*, **136**, 271 (1927).
- Le Rosen A. L., *ref. Chem. & eng. News.*, **30**, 4244 (1954).
- Levi A. A., Terjesen S. G., *англ. пат.* 569844 (1945); *C. A.*, **41**, 6026i (1947).
- Lucas R., *Kolloid Z.*, **23**, 15 (1918).
- Lugg J. W. H., *Brit. med. Bull.*, **10**, 192 (1954).
- Macek K., *Chem. Listy*, **48**, 1181 (1954). [1]
- Macek K., Vejdělek Z. J., *Nature*, **176**, 1173 (1955); Macek K., Vaněček S., Vejdělek Z. J., *Chem. Listy*, **50**, 961 (1956). [2]
- Martin A. J. P., *Biochem. Soc. Symposia*, **3**, 4 (1948). [1]
- Martin A. J. P., *Ann. Review Biochem.*, **19**, 517 (1950). [2]
- Martin A. J. P., Syngge R. L. M., *Biochem. J.*, **35**, 91 (1941). [3]
- Martin A. J. P., Syngge R. L. M., *Biochem. J.*, **35**, 1358 (1941). [4]
- Mason M., Berg C. P., *J. biol. Chem.*, **195**, 515 (1952).
- Meinhard J. E., *Science*, **110**, 387 (1949).
- Moore S., Stein W. H., *Ann. Review Biochem.*, **21**, 521 (1952).
- Moseley P. B., Le Rosen A. L., Carlton J. K., *Anal. Chem.*, **26**, 1563 (1954).
- Mould D. L., Syngge R. L. M., *Analyst*, **77**, 964 (1952); *Biochem. J.*, **58**, 571 (1954).
- Müller R. H., Clegg D. L., *Anal. Chem.*, **23**, 396 (1951).
- Munier R., Macheboeuf M., Cherrier N., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **34**, 204 (1952).
- Nachod F. C., *Ion Exchange*. Academic Press, New York (1949).
- Orchin M., Golumbic C., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 4151 (1949).
- Pardee A. B., *J. biol. Chem.*, **190**, 757 (1951).
- Peck R. L., McLean D. A., *Ind. eng. Chem. anal. Ed.*, **6**, 85 (1934).
- Рачинский В. В., *Труды комиссии аналитической химии*, **6** (9), 21 (1955).
- Reichl E. R., *Monatsh. Chem.*, **86**, 69 (1955).
- Sensi F., *Acta vitaminol.*, **5**, 105 (1954).
- Shaw B. L., Simpson T. H., *J. Chem. Soc.*, **1952**, 5027.
- Schauer H. K., Bulirsch R., *Z. Naturf.*, **10b**, 638 (1955). [1]
- Schauer H. K., Bulirsch R., *Naturwissenschaften*, **43**, 34 (1956). [2]
- Schute J. B., *Nature*, **171**, 839 (1953); *Mededel. Vlaamse chem. Veren.*, **15**, 1 (1953). [1]
- Schute J. B., *Proefschrift, Rijksuniversiteit, Leiden* (1953). [2]
- Sillén J. G., *Nature*, **166**, 722 (1950).
- Simpson T. H., Garden L., *J. Chem. Soc.*, **1952**, 4638.
- Smit W. M., *Discussions Faraday Soc.*, **7**, 38 (1949).
- Strain H. H., *Anal. Chem.*, **26** (1956). [1]
- Strain H. H., Murphy H. W., *Anal. Chem.*, **24**, 423 (1952). [2]
- Syngge R. L. M., Tiselius A., *Acta chem. Scand.*, **3**, 231 (1949).
- Tipson R. S., *Crystallization-Recrystallization*. В книге «Technique of Organic Chemistry», Vol. III (red. A. Weissberger). Interscience Publ., New York, str. 471 (1950).
- Tiselius A., *Ark. Kemi, Mineral. Geol.*, **26B**, № 1 (1948). [1]
- Tiselius A., *Chem. eng. News*, **27**, 1041 (1949). [2]
- Tiselius A., *Angew. Chem.*, **67**, 245 (1955). [3]
- Wagner G., *Pharmazie*, **8**, 1021 (1953).
- Wachtmeister C. A., *Acta chem. Scand.*, **5**, 976 (1951).
- Weichert R., *Acta chem. Scand.*, **8**, 1542 (1954).
- Williams T. I., Weil H., *Nature*, **170**, 503 (1952).
- Wilson J. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 1583 (1940).
- Wood S. E., Strain H. N., *Anal. Chem.*, **26**, 260 (1954).
- Zechmeister L., *Progress in Chromatography 1938—1947*. Chapman & Hall Ltd., London (1950).
- Цвет М. С., *Хромофиллы в растительном и животном мире*. Типография варшавского учебного округа, Варшава (1910).

# ПОДГОТОВКА И НАНЕСЕНИЕ ПРОБ. БУМАГА

---

## Подготовка проб

И. М. Хайс

Пробы, в которых анализируемые вещества количественно преобладают, или пробы, содержащие вещества, которые благодаря высокой чувствительности метода обнаружения можно наносить в минимальных количествах, обычно не требуют специальной подготовки перед хроматографированием на бумаге. Однако биологические материалы обычно включают примеси, оказывающие при хроматографировании различные неблагоприятные воздействия; примеси могут связывать анализируемые вещества, обуславливать местные изменения поперечного сечения и состава фаз системы растворителей, благодаря своей вязкости или несмачиваемости могут препятствовать движению растворителей вдоль хроматограммы, вытеснять анализируемые вещества и этим изменять величину  $R_f$ , способствовать сливанию пятен и образованию потеков, могут ингибировать реакции проявления и т. д.

Для подготовки проб перед хроматографированием пользуются различными способами извлечения и очистки, которые мы здесь рассматривать не будем. Большинство из них должно быть знакомо работающим в соответствующих областях. Некоторые указания по подготовке проб приведены в качестве примеров в специальной части книги и в разделе рецептур. Удобнее, если возможно, извлечь нужные вещества органическим растворителем; вместе с водой отделяется и большая часть неорганических солей. Были предложены также различные методики, в которых экстракция объединена непосредственно с нанесением.

Из веществ, чаще всего являющихся помехой при хроматографировании, упомянем лишь некоторые: белковые вещества, соли, липоиды, сахара и мочевины. Для удаления белков пользуются ультрафильтрацией (Дент и Шиллинг; Шпарманн и Шнайдер) и диализом (Гордон), с одной стороны, и различными способами осаждения — с другой. Белки осаждают либо кипячением после доведения pH до значения, близкого к изоэлектрической точке, либо при помощи различных реагентов, из которых наиболее широкое распространение получили этанол и ацетон. Разумеется, при разработке новых методов необходимо предварительно определить потери

при проведении этой операции, прибавляя известное количество анализируемого вещества к пробе материала до удаления белков и к фильтрату после удаления и сравнивая полученные результаты.

Удаление сахаров из проб диссоциирующих веществ (кислот, оснований, амфолитов) можно осуществить, например, адсорбируя последние при помощи ионообменных смол и затем элюируя. Сахара при этом не будут задерживаться смолой.

Обезжиривание проводят либо в качестве первичной операции (особенно для сухих материалов), либо после удаления белков. Липоидные вещества извлекают или из раствора соответствующими растворителями (см., например, II 69), или из сухого остатка после выпаривания раствора. Удаление липоидов можно осуществить также непосредственно на бумаге: после нанесения проб на бумагу пропускают растворитель, оставляющий анализируемые вещества вблизи начальной точки и увлекающий липоиды со своим фронтом. Лишь после этого проводят собственно хроматографирование.

Для удаления мочевины иногда применяют уреазу (Далглиш; Буассона и Ло Бьянко).

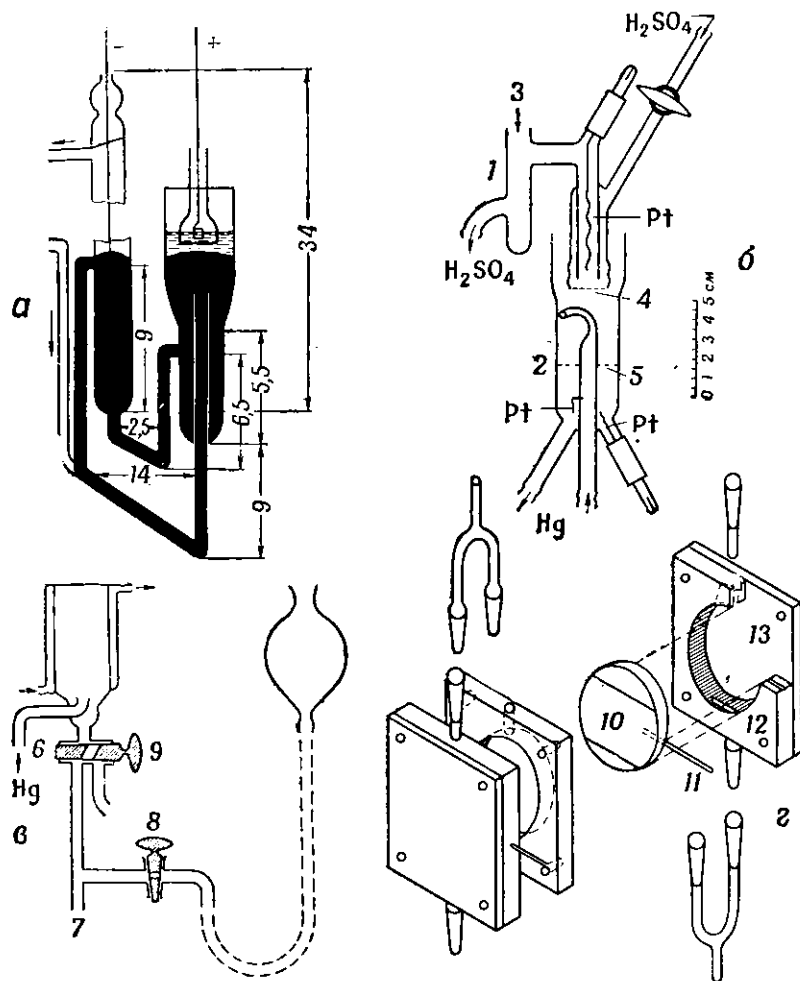
### Удаление неорганических солей

Иногда препятствующее разделению влияние соли можно устранить, предварительно пропитывая бумагу раствором соли (Консен и сотрудники [1]). Иногда для удаления солей можно воспользоваться осаждением (например, сульфат-ион осаждают гидратом окиси бария); здесь, однако, налицо риск того, что образующийся очень мелкодисперсный осадок может адсорбировать составные части смеси. Для обессоливания образцов сахаров применяли пиридин (II 31), для понижения содержания солей в образцах аминокислот — подкисленный ацетон (II 70) или этанол (Балига с сотрудниками). Наиболее употребительны два пути — применение ионообменных смол и электродиализ.

Принцип электродиализатора Консена и сотрудников [2] заключается в следующем. Неорганические катионы разряжаются на ртутном катоде; металл, растворяясь в ртути, образует амальгаму, которая циркулирующей ртутью переносится в другую часть прибора и там разлагается водой. Анионы через целлофановую мембрану переносятся в анодное пространство, где выделяются на аноде. Диссоциацию карбоксильных групп амфолитов и слабых кислот подавляют, вводя кислоту в анодное пространство. Ртуть при циркуляции охлаждается; помимо этого, некоторые новейшие типы диализаторов снабжают охлаждающей рубашкой (рис. 31, в, Ашз с сотрудниками; Йиргл, Смит [1]) или охлаждают серную кислоту, протекающую через анодное пространство (Дент [1]).

Прибор Консена и сотрудников [2] схематически показан на рис. 31, а (по Копольдовой). Вместо угольного анода чаще пользуются платиновым. Некоторые авторы (например, Йиргл) применяют две целлофановые мембраны; Смит [1] рекомендует вязкие колпачки (вискап) для сосудов. Направление циркуляции ртути следует выбирать так, как показано на рис. 31, б, в, ввиду того что может происходить всасывание обессоливаемой жидкости. Смену пробы можно облегчить, применяя двухходовой кран рис. 31, в. К трубке, по которой стекает вода, приводящая в движение ртуть и разлагающая амальгаму, следует присоединить ловушку для ртути (например, промывалку), чтобы не подвергать водосточные трубы опасности повреждения.

Неудобство обычного типа прибора для обессоливания заключается в большом объеме обессоливаемой пробы (5—10 мл), так как необходимо,



Р и с. 31. Прибор для обессоливания.

**а** — электролитический прибор для обессоливания по Кондену и сотрудникам (схема Копольдовой).

**б** — модификация Аструпа и сотрудников. Слив ртути находится внизу, так что предотвращается насыщение обессоливаемого раствора. Через анодное пространство протекает 0,1 М  $H_2SO_4$ .

**в** — модификация Аша и сотрудников. Пространство для обессоливания снабжено охлаждающей рубашкой. Циркуляцию ртути можно прекращать при помощи зажимов 6 и 7. Открывая кран 8 и опуская уравнительный сосуд, можно понизить уровень ртути до крана 9, через который затем можно выпустить обессоленный раствор.

**г** — прибор для электродиализа и обессоливания по Вуду; 10 — угольный электрод 0,9×5 см; 11 — медный стержень для подвода тока; 12 — электродная камера из прозрачной пластмассы толщиной 1,1 см; 13 — пластинка толщиной 0,5 см, прикрепленная к 12 с помощью замазки. Через обе электродные части снизу подается вода — водопроводная при обессоливании, дистиллированная при электродиализе. Между электродными частями и средней камерой, содержащей очищаемый раствор, находятся мембраны из коллодия (для диализа) или из ионообменника, например пермаплена (для обессоливания). Анионит обращен к аноду, катионит — к катоду. Начальное напряжение 20 в, затем около 300 в. Для электродиализа необходимы дополнительные детали.

чтобы целлофановая мембрана была погружена полностью, но не соприкасалась с ртутью, уровень которой колеблется в зависимости от скорости циркуляции. Мюллер и Лейтгардт предложили поэтому прибор для мень-

ших объемов, снабженный двумя целлофановыми мембранами. Аналогичное устройство предложено Вудом (рис. 31, з). Смит [1] использует сосуды меньшего размера в приборе обычного типа.

Верхний предел напряжения, при котором следует проводить обессоливание, определяется тем, что система должна достаточно охлаждаться. Удобнее начинать с низкого напряжения, так чтобы сила тока составляла 0,5—1,5 а. Затем в процессе обессоливания повышают напряжение. Обессоливание закончено, когда напряжение перестает снижаться; величину его можно определить в предварительном опыте (например, при 0,1 а). К источнику тока не предъявляют специальных требований в отношении постоянства. Немедленно по выключении тока отключают анодное пространство во избежание диффузии сульфат-иона в обессоленный образец



Р и с. 32. Обессоливание проб ионофорезом на бумаге (Буланже и сотрудники [3]). Обессоливаемый образец наносят на середину бумажной полоски, служащей мостиком между листами бумаги, увлажненными 0,1 М раствором  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . Ток включают лишь на 10—20 мин, чтобы аминокислоты не успели переместиться с мостика. Охлаждают сверху льдом, помещенным в чашку из пластмассы, снизу — льдом, находящимся в чашке, накрытой силиконизированным стеклом.

или анализируемых веществ в анодное пространство. Вспенивание некоторых жидкостей можно предотвратить добавкой нескольких капель этилового или октилового спирта.

При помощи электродиализа можно отделить ионы щелочных металлов и сильных кислот; если присутствует слабая кислота, то по способу Консдена и сотрудников соли не удается отделить полностью. Из органических кислот можно удалить лишь более сильные, например неполные эфиры серной кислоты (Смит и сотрудники [2]) или трихлоруксусную кислоту (Акленд). Аструп с сотрудниками указывают, что частично можно удалить ацетаты и фосфаты. Растворы с высоким содержанием аммонийных солей непригодны для обессоливания, так как вязкая амальгама аммония будет засорять трубки, по которым циркулирует ртуть. Плохо удаляются ионы бария.

Потери обуславливаются, с одной стороны, механическими причинами (увлечением обессоливаемого раствора циркулирующей ртутью, несовершенным ополаскиванием сосуда после обессоливания, провонкованием в анодное пространство), а с другой стороны, химическим разложением при действии повышенной температуры и процессами на электродах. Наблюдалось разложение аргинина; кроме того, было отмечено восстановление замещенных акриловых кислот, например урокановой (Женишек и Край; Хайс с сотрудниками [2]), восстановление пиридинкарбоновых кислот (Смит с сотрудниками [2]), дегалоидирование галоидированных тирозинов и тиронинов (Джепсон и Смит), превращение сульфата индоксила в индиго, обесцвечивание некоторых красителей (Смит [1]). Вещества, плохо растворимые в отсутствие электролитов (например, тирозин) выделяются из раствора (Смит с сотрудниками [2]).

Буланже с сотрудниками обессоливал небольшие пробы при помощи ионофореза на бумаге (рис. 32), используя карбонат аммония в качестве летучего электролита для увлажнения бумаги. Пробы наносили в сере-

дине небольших полосок бумаги, помещаемых затем в виде мостиков между двумя листами бумаги. После удаления быстро движущихся ионов средние зоны вымывали для хроматографирования. Подобных же результатов можно достичь при помощи двумерной методики: 1) ионофорез, 2) хроматографирование (Колоушек [1]).

### Превращение компонентов пробы в их производные

Получение производных перед хроматографированием осложняет ход анализа и может привести к потерям, а в некоторых случаях — к стиранию различия в хроматографическом поведении. Иногда, однако, получение производных более удобно или может оказаться необходимым, а именно: а) для большей легкости обнаружения (например, если производные окрашены), б) для уменьшения летучести, в) для более легкого отделения от мешающих примесей, г) с целью улучшения хроматографических свойств. Можно указать, например, на сложные эфиры и ксантаты спиртов, гидроксамовые кислоты, динитрофенилгидразоны, азокрасители, продукты окисления серусодержащих аминокислот, N-бензилглюкозиламины сахаров.

Иногда производные хроматографируют, чтобы добиться надежной идентификации; например, у стероидных спиртов значения  $R_f$  должны совпадать с значениями  $R_f$  их ацетатов. После устранения влияния карбоксильных групп в порфиринах (этерификацией) на процесс хроматографии начинают оказывать влияние другие структурные особенности молекулы. К наибольшим успехам в области химии белков принадлежит разработка метода структурного анализа, в котором концевые аминокислоты превращаются в характерные производные, которые и подвергают хроматографированию (см. стр. 469—490).

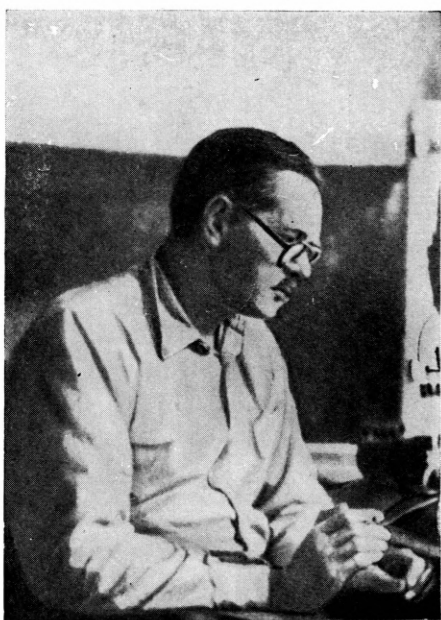
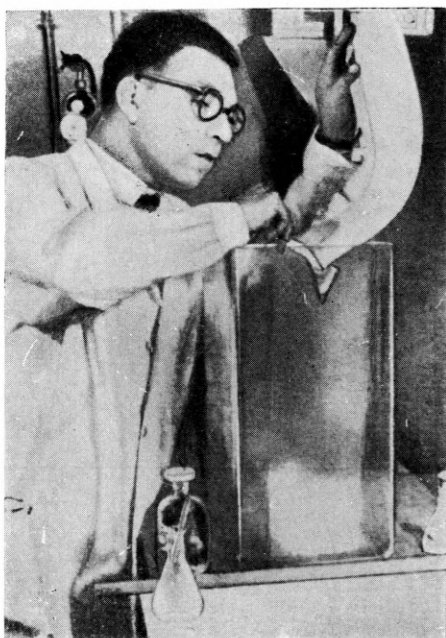
## Нанесение проб

И. М. Хайс

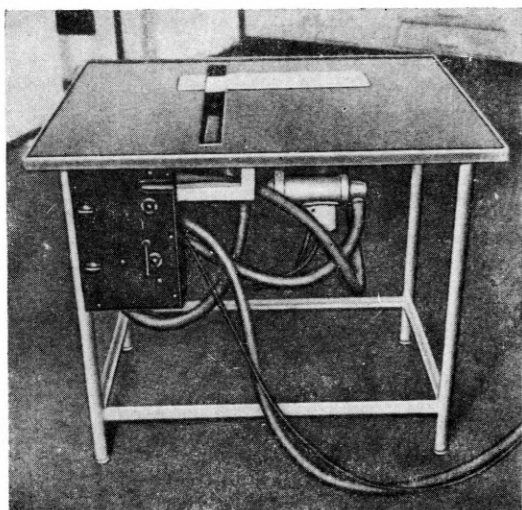
Обычно предварительно дают пробе высохнуть в начальной точке хроматограммы. В некоторых случаях при круговой хроматографии сразу же после впитывания пробы в бумагу, не дожидаясь высыхания, начинают хроматографировать. Для некоторых веществ, особенно для белков, высушивание недопустимо.

### Обозначение, форма и величина начального пятна

Место, на которое наносят пробу, предварительно помечают простым карандашом. Размещение проб на листе определяется размерами прибора и способом разделения (восходящая, нисходящая или круговая хроматография). При нисходящей хроматографии положение стартовой линии выбирают обычно на расстоянии 6 см от верхнего края бумаги, по возможности так, чтобы при вкладывании верхнего края в лодочку опорная планочка находилась ближе к лодочке, нежели стартовая линия. Рас-



Р и с. 5. Основоволожники метода распределительной хроматографии на бумаге  
Р. Конден, А. Г. Гордон, А. Дж. П. Мартин, Р. Л. М. Синг.



Р и с. 36. Столик для нанесения проб на хроматограммы.

Воздух подводят из воздуходувки через два нагревателя под стартовую линию хроматограммы. Можно регулировать как расход воздуха, так и его температуру.



Р и с. 37. Волокна целлюлозы под электронным микроскопом (Кинзигер и Хок).

Хлопковая целлюлоза (увеличение в 17 000 раз).

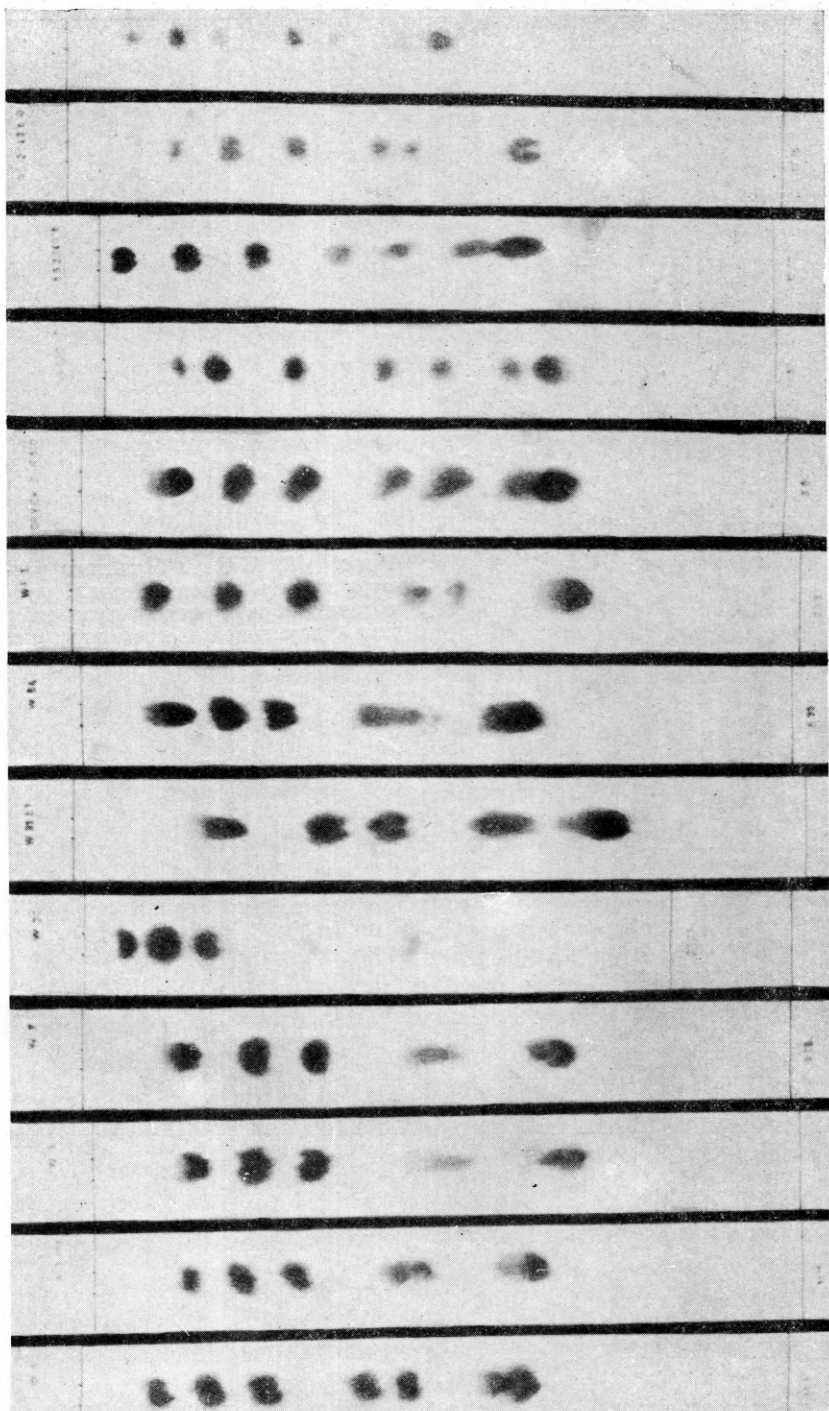


Р и с. 38. Схематическое изображение набухшего волокна целлюлозы по Германсу. «Кристаллические» и «аморфные» участки целлюлозы. Аморфные участки набухают, поглощая воду (молекулы воды изображены в виде кружочков). Волокнообразующие макромолекулы изображены в виде прямоугольников (K ü r s c h n e r, Chemie d'èva, Bratislava, 1952).

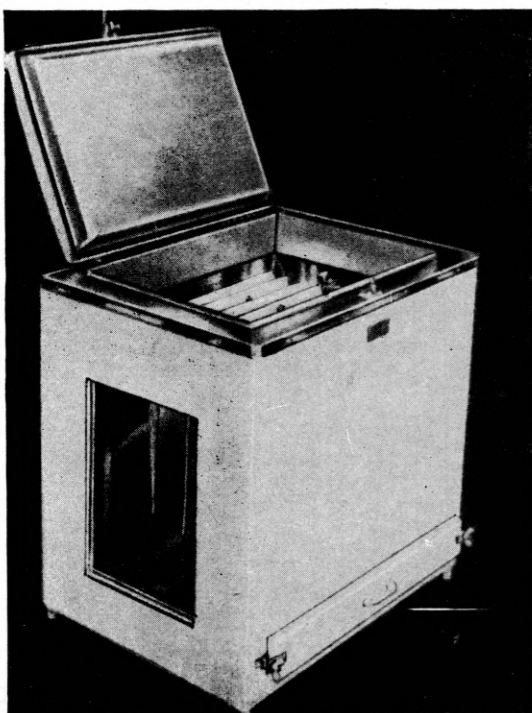


Р и с. 40. Емкость бумаги Шлейхер — Шюльц 2071 (Мацек и Гацаперкова).

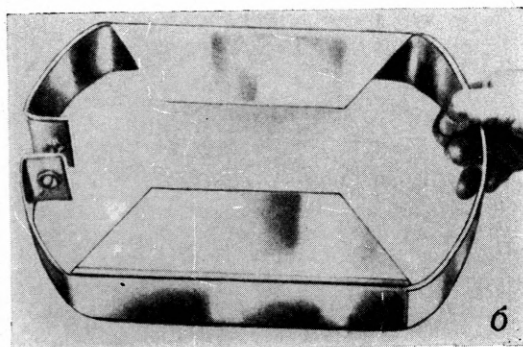
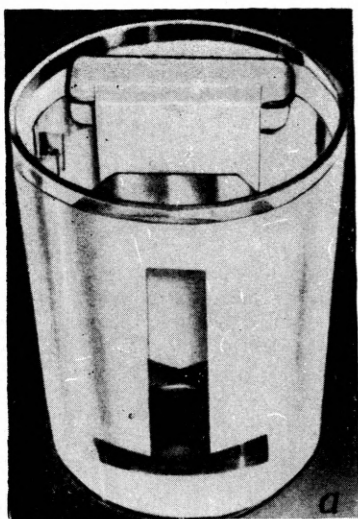
Система *n*-бутанол—пиридин—вода (6 : 4 : 3). На хроматограммы в одну и ту же точку были нанесены галактоза и ксилоза в количествах, указанных сверху (для каждого сахара).



Р и с. 39. Сравнение некоторых сортов бумаги на примере разделения аминокислот (Масек и Гацперкова). Система *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5), сверху вниз аминокислоты: Лиз, Гли, Ала, Про (на фотографии не изображен), Тир, Вал, ФА и Д. W—бумага ватман, SS—Шлейхер—Шюльц, Гусек — Гринсбо (мункет), WF—Нидерштаг (ГДР). Цифры под фронтом хроматограмм — время разделения (часы).



Р и с. 46. Камера большого размера из нержавеющей стали, пригодная для серийных анализов или для двумерной хроматографии (фирма «Will Corp.», Нью-Йорк).



Р и с. 48. а — камера фирмы «Will Corp.» для нисходящей хроматографии;  
б — подставка из нержавеющей стали для фарфоровых лодочек.

стояние между нанесенными пробами следует выбирать возможно большим, если при хроматографировании приходится опасаться боковой диффузии или неправильного течения растворителя. В противном случае капли можно наносить так, чтобы их центры располагались на расстоянии 20 мм друг от друга и менее. Нередко задают вопрос, удобнее ли наносить точки или прямые черточки. Точек можно нанести большее число, их легче сравнивать по размерам и интенсивности; прямые черточки иногда лучше разделяются и нарушающие примеси играют несколько меньшую роль.

*Величина пятна.* Нанесение в виде небольшой точки или узкой поперечной черточки улучшает разделение, поэтому стараются нанести пробу на минимальную возможную площадь. Так как наносить в виде небольшой точки иногда слишком кропотливо, для каждого типа анализа рекомендуется опытным путем установить, какая величина допустима (иногда диаметр доходит до 11 мм) и не может быть превзойдена. Иногда слишком малые точки дают плохие хроматограммы, так как чрезмерная концентрация веществ затрудняет протекание растворителя на месте пятна и обуславливает неправильности в процессе хроматографирования.

*Размещение веществ в начальной точке.* Обычно вещества скапливаются на периферии круглого или эллиптического пятна там, где они были нанесены, так что образуют кольцо; эту же форму пятна сохраняют и на хроматограмме, если не произойдет размывание. Однако был также предложен метод, при котором непосредственно под стартовой линией помещают раскаленную нить, так что наносимая проба не растекается, как обычно, от центра, но, напротив, испаряясь, концентрируется в нем.

### Величина пробы

Нижний предел обусловлен чувствительностью реакции обнаружения для данного соединения, верхний предел определяется тем, что слишком большие пятна или плохо разделяются, или происходят нарушения в ходе процесса. В пробах биологических материалов главной причиной нарушений являются вещества, не определяемые непосредственно и не удаленные полностью при предварительной обработке пробы (стр. 92). Если определяют вещество, несколько маскируемое примесями, обычно следует наносить различные объемы (в геометрической прогрессии) так, чтобы определить то количество, при котором исследуемое вещество еще может быть открыто и прочие вещества не вызывают нарушений. Оптимальный объем наносимой пробы составляет 5—10 мкл. О нанесении больших объемов будет сказано ниже.

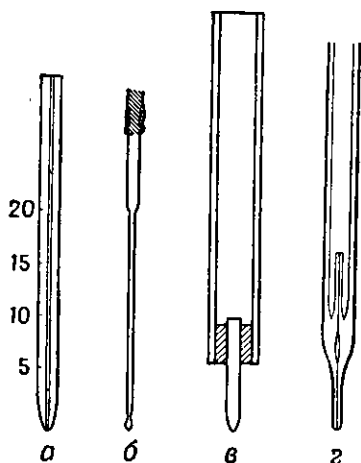
### Растворители для проб

Само собой разумеется, что растворитель не должен содержать нелетучего остатка, который мог бы вызвать нарушения при хроматографировании или разрушать бумагу. При применении менее полярной неподвижной фазы, например при пропитке углеводородами, следует уделить особое внимание выбору растворителя. Если пробу в растворителе, растворяющем жиры, наносить после пропитки, то растворитель может вымыть пропитку на периферию наносимого пятна. Подвижная фаза будет при этом продвигаться через сухое пятно иначе, чем через пропитанную площадь. Если же наносить пятно перед пропиткой в полярном растворителе (например, в спирте), раствор может впитаться в тонкие поры, которые

затем при пропитке углеводородом окажутся заблокированными, и, таким образом, часть вещества не сможет продвигаться и останется на стартовой линии, хотя она должна обладать более высоким значением  $R_f$ .

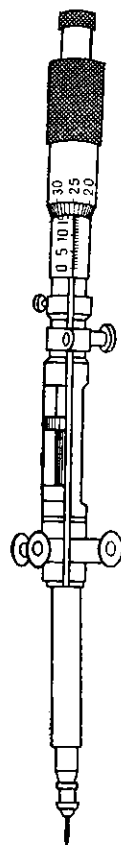
### Специальная техника нанесения растворов

Чаще всего пробы отмеряют и наносят при помощи микропипеток. Точность измерения пробы имеет значение особенно при абсолютных количественных определениях. Для обычной работы пользуются пипетками, применяемыми для анализа крови (рис. 33, а), калибруемыми весовым способом на 5, 10, 20, 25  $\mu\text{л}$ , а для больших объемов — обычными градуированными пипетками. Удобством их является значительная прочность, благодаря чему они не ломаются при мытье и очистке. Необходимо, чтобы кончик и устье пипеток были тонкими. Для получения малых пятен правильной формы удобно отмерять объемы толстостенным калиброванным капилляром, из которого раствор должен перетекать в тонкий



Р и с. 33. Микропипетки для нанесения проб на бумагу.

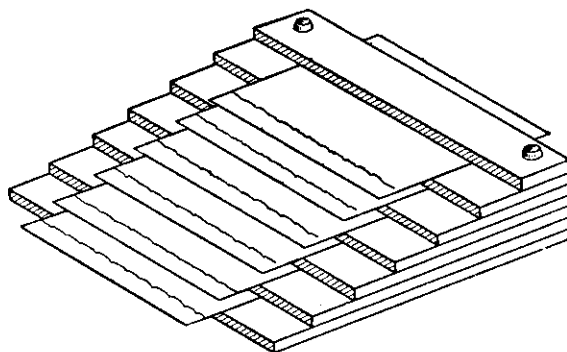
а — гематологическая пипетка; б — микропипетка по Линдерстрему-Лангу и Холтеру; в — микропипетка с пробой; г — микропипетка по Мейнхарду и Хэллу.



Р и с. 34. Медицинский шприц с микрометрическим винтом («Агла»).

капилляр, изготовленный самим экспериментатором (Кейл и сотрудники; частное сообщение). Многие авторы рекомендуют микропипетки по Линдерстрему-Лангу и Холтеру; некоторые типы таких пипеток показаны на рис. 33, б, в, г. Для точного нанесения различных объемов пригодны также микробюретки или шприцы с микрометрическим винтом, удобство которых заключается в медленном и регулируемом истечении (рис. 34). Для насыщения в пипетки радиоактивных или сильно ядовитых веществ следует пользоваться специальными устройствами (см. стр. 196). Пипетка должна находиться в вертикальном положении по отношению к горизонтально

расположенному листу бумаги. Были предложены различные рычажные приспособления, облегчающие поддержание правильного угла (Ливингстон и сотрудники). Так как при вертикальном положении пипетки истечение иногда может оказаться слишком быстрым, его можно замедлить разрезанием над поверхностью или наносить пробу с нижней стороны



Р и с. 35. Столик для нанесения на хроматограммы большого числа проб (Кирби-Берри и сотрудники).

листа (Виганд и Шранк). Для серийного нанесения большого числа малых объемов пригодно простое приспособление по Кирби-Берри (рис. 35).

Некоторые авторы рекомендуют наносить исходные растворы с помощью кисточки, ребра стеклышка, проволочной (платиновой) петельки, эбонитового гребешка, прикладыванием к капельке, предварительно нанесенной на обезжиренное стекло, и другими способами.

### Нанесение больших объемов

Нанесение больших объемов проводят путем повторного нанесения на одно и то же место с промежуточным высушиванием током воздуха, нагреванием или тем и другим одновременно. Чаще всего пользуются обычной сушилкой для волос (феном), которая, однако, непригодна для непрерывной продолжительной эксплуатации. Специальный столик для нанесения, соединенный с воздуходувкой, подающей воздух регулируемой температуры, показан на рис. 36. Показано устройство, модифицированное Мелоуном и Микешем.

Практика показала, что наибольшие затраты активного рабочего времени при хроматографии на бумаге приходятся именно на нанесение. Поэтому было предложено несколько устройств, в которых истечение из пипетки так замедлено и отрегулировано, чтобы капля успевала высохнуть на периферии, не растекаясь сверх допустимых размеров, причем повторное нанесение отпадает (Урбах и др.). Недостаток состоит в том, что такое полуавтоматическое нанесение необходимо контролировать, и в том, что вследствие испарения, вызывающего засорение пипеток, нарушается правильность истечения и затрудняется нанесение точных объемов.

Для ускорения нанесения и предотвращения растекания пятен два автора независимо друг от друга предложили наносить (водные растворы) на поверхность, огражденную барьерами из неполярных веществ; Юльте выбрал для этой цели *n*-дихлорбензол, который после нанесения можно

удалить нагреванием, а Виганд и Шранк ограничивают место нанесения парафиновыми черточками, в которых после высушивания делают лезвием бритвы продольные каналы для подвижной фазы.

Нанесение длинных полос для препаративных целей будет рассмотрено ниже (стр. 216).

### **Нанесение с капиллярным элюированием на бумаге**

Значительный объем раствора можно нанести на бумагу в виде прямоугольного пятна размером, например,  $3 \times 5$  см и погрузить бумагу одним концом в подходящий элюирующий раствор, помещенный в ванну. Ванну закрывают крышкой; бумага из нее выступает по линии, которая будет стартовой линией будущей хроматограммы. Раствор проникает по бумаге и испаряется там, где она свешивается из ванны (в случае необходимости испаряют с помощью тока воздуха). Этим способом можно пользоваться и для предварительной очистки, причем после капиллярного элюирования первоначальное место старта, содержащее невымытые составные части пробы, отрезают. Модификацией этой методики является перенос с другой бумаги на собственно хроматограмму (стр. 179, рис. 95).

### **Нанесение порошков**

Нанесение на хроматограмму порошкообразных материалов вместо растворов ускоряет работу. Доман [1] пользуется специальными стеклянными щипчиками для впрессовывания порошков в бумагу.

### **Непосредственное нанесение тканей на хроматограмму**

Вместо предварительного извлечения и последующего нанесения раствора можно помещать на хроматограмму непосредственно ткань; при этом ее следует или растереть прямо на хроматограмме, или заранее гомогенизировать, или, наконец, нанести в виде цельного среза (Линднер, Германи). Перед собственно хроматографированием в центр среза можно ввести растворитель и таким образом осуществить предварительную экстракцию.

## ***Бумага***

***Р. Коноп, К. Мацек, И. М. Хайс***

### **СТРУКТУРА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ**

Глюкозные остатки в целлюлозе соединены в очень длинные линейные молекулы, которые по данным разных авторов содержат от 100 до 20 000 звеньев (Кюршнер); для природной хлопковой целлюлозы число звеньев по данным физических измерений (Хейзер) составляет, по-видимому, 2000—3600. Эти макромолекулы в кристаллических областях располагаются параллельно друг другу в виде пучков и связаны между собой главным образом водородными связями свободных гидроксильных групп. Макромолекулы обладают неодинаковой длиной, поэтому концы их не совпадают, что обуславливает связи в продольном направлении. В аморфных

областях целлюлозы макромолекулы располагаются не вполне параллельно друг другу, образуя свободные промежутки. Кристаллическая часть состоит из нерезко ограниченных образований, имеющих форму решетки, с промежутками между ними. Макромолекулы и пучки их простираются из кристаллических областей в аморфные. На рис. 38 показана схема такого расположения макромолекул по Фрей-Висслингу. Промежутки обозначены темным, а пучки макромолекул целлюлозы — светлым. Прерывистой линией изображены кристаллические области, которые можно обнаружить при помощи рентгеновского анализа. Некоторые авторы считают, что кристаллические пучки макромолекул целлюлозы образуют соединительные звенья, а аморфные области — узловые точки пространственной сетки; по данным других авторов аморфная целлюлоза склеивает пучки кристаллической целлюлозы в волокна, видимые в электронный микроскоп (рис. 37, по Кивзингеру и Хоку). В природной целлюлозе, образующей стенки растительных клеток, такие субмикроскопические волокна соединяются в волокна, образующие коаксиальные пластинки вокруг продольной оси клетки. Согласно интересным, но мало распространенным воззрениям Каргина и Теренина (цитировано по книге Никитина), целлюлоза представляет собой жидкость, содержащую беспорядочно расположенные крупные асимметричные молекулы, следовательно, она не обладает кристаллическим строением даже в малых областях.

В фильтровальной бумаге волокна, полученные из стенок растительных клеток или их обломков, сплюснуты; они удерживаются вместе, с одной стороны, силами трения, а с другой — водородными связями между размолотыми волокнами; водородные связи образуются при высыхании увлажненного листа. В бумаге поры проходят между волокнами и внутри их, что значительно осложняет объяснение процесса поглощения воды бумагой.

### Сорбция жидкости

Вода при поглощении связывается водородными мостиками с гидроксильными группами свободной поверхности макромолекул целлюлозы. В кристаллических областях, где линейные макромолекулы расположены в известном порядке и взаимно связаны водородными мостиками, эта свободная поверхность очень мала; в аморфных областях (рис. 38), в которых систему целлюлоза — вода можно считать за гомогенную (гелеобразную), свободная поверхность велика. Связанной подобным образом воды (так называемой воды набухания) бумага содержит лишь несколько процентов. Следующие молекулы воды (пропитывающая вода) могут присоединиться к слою адсорбированной воды, проникать под действием капиллярных сил в более крупные — субмикроскопические (рис. 37) и видимые в микроскоп промежутки между волокнами и заполнять их, не вызывая объемных изменений (набухания) (Кассиди [1]). Это явление называют также капиллярной конденсацией. В условиях обычной распределительной хроматографии крупные поры заполнены подвижной органической фазой.

Вопрос о том, какая часть воды, удерживаемой целлюлозой, участвует в процессе хроматографического разделения, не был, насколько нам известно, решен опытным путем. Это могло бы представлять интерес с точки зрения классификации типов распределительной хроматографии (жидкость — жидкость и жидкость — гель) по Муру и Стейну; не исключено, что вода набухания, образующая гелеобразные системы в аморфных областях целлюлозы, не принимает участия в процессе распределения.

Формамид по отношению к целлюлозе обладает большей набухающей способностью, нежели вода, затем из веществ нейтрального характера следуют этиленгликоль, метанол, фуриловый спирт, этанол и т. д. (Кассиди [1]). Процесс сорбции атмосферной воды во времени показан на рис. 41 (см. стр. 116).

С практической точки зрения важно, что при погружении бумаги в липофильный растворитель или раствор липофильного вещества можно без труда удержать на бумаге неполярный растворитель, не склонный к образованию межмолекулярных водородных связей. Молекулы такого растворителя нельзя вытеснить из бумаги действием воды и других полярных растворителей, поэтому образуется устойчивая липофильная неподвижная фаза, что обуславливает возможность хроматографии «с обращением фаз».

### ПРОИЗВОДСТВО БУМАГИ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИИ

Для выработки хроматографических бумаг почти исключительно пользуются хлопковым пухом, так называемым линтером, непригодным для текстильной промышленности. Линтер представляет собой наиболее чистое целлюлозное волокно. Изготовление хроматографической бумаги из древесной клетчатки связано с затруднениями, поскольку очистка такого сырья требует радикального химического воздействия, следствием чего является разрушение волокон целлюлозы и образование оксигелюлозы. Кроме того, преимущество бумаги из линтера заключается в строении и свойствах волокна. Упомянем здесь хотя бы высокое содержание кристаллической части, благодаря чему бумага становится более устойчивой к химическим воздействиям, нежели аморфные целлюлозные волокна (Грюне).

При выработке хроматографических бумаг линтер подвергают щелочной варке в шаровых котлах и затем тщательно промывают водой. Некоторые примеси можно удалить отбеливанием. После промывки массу подвергают размолу в голландере. При этом размол волокна укорачиваются; однако следует избегать их дробления. Длина волокна определяет важнейшие свойства бумаги, например плотность, скорость потока и т. д. После удаления примесей и комков из размолотого материала на специальной бумагоделательной машине вырабатывают фильтровальную бумагу в виде полосы, которая после отжатия воды высушивается в сушилке, сматывается в рулоны и затем разрезается на листы.

### СВОЙСТВА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ БУМАГИ

Под микроскопом можно видеть, что хлопковые волокна напоминают многократно скрученные ленты, посредине которых проходит широкий канал. Диаметр волокон составляет 0,015—0,04 мм, тогда как длина их зависит от вида и размолы сырья. Отдельные волокна могут сохраняться целиком, но ни в коем случае не должны быть раздавлены или продольно расщеплены. Допускается наличие лишь ничтожных количеств слизи или тонко измельченных частиц. Поры у всех бумаг тонкие и прочные. Поверхность бумаги должна быть гладкой, так как шероховатая поверхность понижает чувствительность реакций обнаружения, а также точность количественного анализа *in situ*. Поэтому фирма «Шлейхер и Шюль»

наряду с пероховатыми сортами (М) выпускает еще сатинированные (МGl) или отглаженные (Gl) сорта. Кроме того, к бумагам предъявляют требование равномерности на просвет, хотя незначительные утолщения допустимы. Тем не менее более тонкие, как и более толстые места могут являться помехой, особенно при количественных определениях.

С химической точки зрения бумага содержит 95—99%  $\alpha$ -целлюлозы, т. е. той части целлюлозы, которая нерастворима при 20° в стандартных условиях в 17,5%-ном растворе едкого натра (Зибер). Определением редуцирующей способности бумаги (медное число) было установлено, что волокна из хлопкового пуха при переработке сохраняют достаточно высокую степень полимеризации (Штаудингер). Это согласуется с результатами, полученными при помощи осмотического метода, центрифугирования и измерений вязкости.

Кроме того, в хроматографических бумагах присутствует небольшое количество карбоксильных групп (так называемая оксигеллюлоза), содержание которых хотя и в десятки раз ниже, чем в бумагах из древесной целлюлозы, но тем не менее обуславливает в водных растворах появление

Таблица 7  
СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ СОРТОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ БУМАГ

Бумага	Вес, г/м <sup>2</sup>	Толщина, мм	Впитываю- щая спо- собность (путь 30 см), мин	Емкость по сахарам, мг	Скорость продвижения в системе бутанол— уксусная кислота— вода, часы
Ватман 1	85—90 а)	0,16 а)	140—220 а)	10—15	16
2	95—100	0,18	200—300	10—15	17
3	185	0,36	150—250	20—25	11
3 MM	180	0,31	140—180	20—25	11
4	90—95	0,19	70—100	10—15	9
7	95—100		150—180		9
20	90—95	0,16	400—600		36
31 ET	190	0,50	60—120	40—60	4
54	90—95	0,17	60—120		6
Ш-Ш 598G б)	140—145 в)	0,23—0,28 в)	60—80		5
603 h : P	120—125		220—260		19
2040a	90—95	0,18—0,19	90—140		7
2040b M	120—130	0,22—0,24	130—210		12
2043a	90—95		230—270	10—15	20
2043b MGl	120—130		220—260	15—20	14
2045a Gl	90—95	0,10—0,11	300—400	10—15	42
2045b Gl	120—130	0,15—0,17	300—400		45
2071	630—680	0,65—0,70	240—290	80—120	23
2181	2400—2500	3,60—4,20	260—320		28
2230	700—750	0,88—0,93	80—150		7
2315	150—155	0,29—0,32	80—130		6
2316	150—155	0,29—0,32	220—260		19
Мунктеил Chr 100	95—100		200—240	10	9
ELE/130	120—140		220—250		9
Нидершлаг WF 1	80—90		300—330	5	21

а) Данные получены благодаря любезности фирмы «Рив Энджел и Ко».

б) Ш-Ш—бумага фирмы «Шлейхер и Шюль».

в) Данные заимствованы из работы Грюне.

отрицательного заряда на целлюлозе и сообщает ей ионообменные свойства (см. стр. 88).

Из веществ, не относящихся к углеводам, в линтерных бумагах присутствуют связанные аминокислоты. В бумаге ватман содержание азота составляет до 15 мг на 100 г бумаги, в бумаге Шлейхер — Шюльль содержится примерно в два раза большее количество аминокислот. Липофильные вещества представлены различными жирами, восками и смолами. Количество их оценивают по весу остатка после выпаривания эфирной вытяжки бумаги: в бумагах ватман оно составляет до 25 мг на 100 г бумаги, в бумагах Шлейхер—Шюльль — в два раза выше. При хроматографическом разделении эти вещества обычно вымываются фронтом подвижной фазы.

Из неорганических катионов большую часть составляют кальций и магний; в меньшем количестве присутствуют медь и железо (для железа наблюдалось содержание 1—2 мг на 100 г бумаги), которые тем не менее могут неблагоприятно влиять на хроматографирование аминокислот. Суммарное содержание этих веществ определяется зольностью, достигающей у бумаг ватман и Шлейхер — Шюльль 0,04—0,07%.

Некоторые данные (толщина листа, вес 1 м<sup>2</sup> и всасывающая способность) о наиболее употребительных сортах бумаги ватман, Шлейхер — Шюльль и мунктелл приведены в табл. 7. Весовая характеристика имеет значение главным образом для емкости, а всасывающая способность — для скорости движения подвижной фазы по бумаге. Было найдено, что чем бумага грубее, тем выше скорость проникновения органического растворителя. Скорость перемещения подвижной фазы в направлении выработки (в направлении движения сит бумагоделательной машины) на 5—15% выше, нежели в поперечном направлении. Это обуславливает эллиптическую форму поясов при круговой хроматографии.

#### ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Наличие связанных аминокислот оказывает неблагоприятное влияние особенно при анализе пептидов, когда последние подвергаются элюированию и гидролизу (Уинн). Липофильные вещества, которые вымываются с фронтом растворителя, мешают главным образом идентификации пятен веществ, обладающих высокими значениями  $R_f$ . Наконец, некоторые катионы тяжелых металлов (меди, железа, марганца и т. п.) могут, особенно с аминокислотами, обусловить появление опережающих пятен, а с карбоновыми кислотами — запаздывающих пятен (см. стр. 152). Некоторые катионы металлов, особенно железа, катализируют потемнение фенола в присутствии паров аммиака, благодаря чему в системах, содержащих фенол, возникает черная или красно-бурая окраска линии фронта растворителя (см. рис. 78).

Некоторые явления, обусловленные образованием комплексов металлов с разделяемыми веществами, можно предотвратить, вводя в атмосферу камеры сероводород или цианистый водород. Эти вещества дают с соответствующими катионами осадки на бумаге или образуют с ними прочные комплексы. Кроме того, для предотвращения потемнения фенола можно применять окись углерода или светильный газ или, наконец, предварительно обработать бумагу желтой кровяной солью, 8-оксихинолином или этилендиаминтетрауксусной кислотой.

В некоторых случаях бумагу следует обязательно промывать перед употреблением. Для удаления аминокислот Колоушек и Коулсон [2] рекомендовали промывать бумагу водой. Неорганические катионы можно отмыть соляной или уксусной кислотой с последующей основательной промывкой водой. По промытым таким образом бумагам растворители протекают быстрее, нежели по непромытым, а в некоторых случаях наблюдаются и изменения величины  $R_f$ . Промывать бумагу можно целыми пачками на воронке Бюхнера; можно также промывать отдельные листы бумаги, пропуская через них промывную жидкость так же, как это делают при хроматографическом разделении. Ишервуд и Хейнс предложили для промывания желоб, состоящий из двух частей, с продольной прорезью в дне, в которой можно зажать целую пачку бумаги. Вообще же промывание большого числа взаимно соприкасающихся листов бумаги малопригодно, так как через случайные промежутки между листами жидкость будет протекать быстрее, результатом чего явится неправильное промывание. На правильность тока растворителя по промытой бумаге значительное влияние оказывает также равномерная сушка, которую лучше ускорять с помощью утюга, нежели в сушильном шкафу (Доман и Каган [2]). Особенно важна промывка хроматографических картонов для препаративных целей, так как эти картоны содержат значительное количество загрязнений, которые при элюировании пятен или полосок могут переходить в раствор хроматографически очищенного вещества. В настоящее время в продажу поступает бумага, уже промытая кислотами (см. стр. 107).

### СРАВНЕНИЕ СОРТОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ БУМАГ

В результате развития и широкого применения хроматографии на бумаге появилось значительное количество новых специальных сортов бумаги для хроматографии. Некоторые из не встречающихся в Европе сортов бумаг (Рив Энджел, Шлейхер—Шюль и Итон Дайкман) Каукбани и Кассиди оценивали с точки зрения пригодности для разделения аминокислот. Опытные сорта чехословацкого производства изучал Хайс, а бумаги, выпускаемые в СССР,—Рачинский и Князатова. Оуегла (не опубликовано) сравнивал некоторые старые сорта бумаг Шлейхер—Шюль и бумаги ватман 1 и 4.

Для облегчения ориентировки мы изучили наиболее доступные сорта хроматографических бумаг ватман, Шлейхер—Шюль и мунктелл (Мацек и Гацаперкова). Для всех сортов была исследована пригодность для разделения аминокислот и сахаров в системах с неподвижной водной фазой, для разделения алкалоидов спорыньи в системе со стационарным формамидом и для разделения мало полярных стероидов в системе с обращенными фазами. Пригодность оценивалась по трехбалльной системе: вполне пригодные бумаги обозначались оценкой 1, среднего качества — 2 и непригодные — 3. Из результатов, приведенных в табл. 8 и на рис. 39, следует, что для разделения аминокислот вообще несколько более пригодны бумаги Шлейхер—Шюль, для алкалоидов, напротив,—бумаги ватман; для разделения сахаров и стероидов те и другие примерно одинаково пригодны. Очень хорошее разделение всех типов веществ было достигнуто на бумагах мунктелл.

Из результатов разделения для отдельных типов систем растворителей были рассчитаны некоторые средние величины, на основании которых

Таблица 8

СРАВНЕНИЕ СОРТОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ БУМАГ <sup>а)</sup>

Бумага	Бутанол—пиридин—вода	Бутанол—уксусная кислота—вода	Фенол—аммиак	Формамид/бензол	Петролейный эфир/изопропанол	Общая оценка
	сахара	аминокислоты		алкалоиды	стероиды	
Ватман 1	1	1	1	1	1	I
2	1	1	1	1	1	I
3	1	1	1	1	1	I
3 MM	1	1	1	1	1	I
4	1	2	2	1	1	II
7	1,5	2	2	3	2	III
20	1	3	1,5	2	1	II
31 ET	1,5	1	1,5	3	1	II
54	1,5	3	1	1	1,5	II
III-III 598G	2	1	2	3	2	III
602 h : P	1	1	1	1	1	I
2040a	1	3	1	2	1	II
2040b M	1	1	1	1	1	I
2043a	1	1	1	1,5	1	I
2043b MGI	1	1	1	1,5	1	I
2045a GI	1	2	1	1,5	1	II
2045b GI	2	3	2	2	1	III
2071	1	1	1	3	1	II
2181	2	1				
2230	1,5	3	3	3	3	III
2315	2	2	3	2,5	2	III
Мунктелл Chr 100	1	1	1	1	1	I
ELE/130	1	1	1	3	1	II
Нидершлаг WF 1	1,5	1	1,5	1	1	II

<sup>а)</sup>Пояснения см. в тексте.

мы попытались дать общую оценку сортов бумаги: универсально пригодные бумаги были означены I, хорошие сорта — II и ограниченно пригодные сорта — III. Из полученных данных следует, что в качестве стандартных сортов можно рекомендовать ватман 1 или Шлейхер — Шюль 2043 b MGI, которые обладают в общем сходной характеристикой. На этих бумагах было осуществлено наибольшее число разделений, что представляет также удобство с точки зрения сравнения результатов различных авторов. Почти столь же хороши бумаги ватман 2, 3 и 3 MM или Шлейхер — Шюль 602h : P, 2040b, 2043a, а также шведская бумага мунктелл Chr100.

### Размеры листа

Бумага ватман и Шлейхер—Шюль для хроматографических целей выпускается большей частью в пачках по 100 или по 500 листов. Размеры листа обычных бумаг ватман составляют 46×57 см, бумаг Шлейхер—Шюль 60×58 см. Направление движения бумаги на вальцах на бумагах Шлейхер—Шюль указывается водяным знаком (стрелкой), у бумаг ватман —

стрелкой на упаковке. У тех бумаг Шлейхер—Шюль, которые не снабжены водяным знаком, длинная сторона (60 см) совпадает с направлением движения. Это направление легко можно определить, нанося на бумагу каплю воды. Длинная ось эллипса, образующегося при растекании, укажет на направление движения при выработке.

### Бумаги специального назначения

*Бумаги для ускоренного анализа.* Наиболее подходящими свойствами обладают бумаги ватман 31 ЕТ или 54. Первая оказалась удобной благодаря своей высокой емкости и почти учетверенной по сравнению с бумагой ватман 1 скорости продвижения (табл. 7). Бумаги ватман 4 и Шлейхер—Шюль 2040а, имеющие близкие свойства, обнаруживают в сравнении с бумагой ватман 31 ЕТ почти в два раза меньшую скорость. Ватман 541 также относится к быстрым бумагам.

*Бумаги для препаративных целей.* Из исследованных бумаг ватман и Шлейхер—Шюль наибольшей емкостью при хорошем разделении обладала бумага Шлейхер—Шюль 2071, на которой удавалось разделить даже смесь 200 мг галактозы и ксилозы (рис. 40). Ватман 31 ЕТ обладает почти половинной емкостью, однако удобство этого сорта заключается в примерно шестикратной по сравнению с бумагой Шлейхер—Шюль 2071 скорости продвижения. Меньшей емкостью обладают ватман 3 и 3 ММ.

*Бумаги, отмытые кислотами.* Фирма «Рив Энджел» выпускает бумаги ватман 540 (средняя скорость продвижения) и 541 (высшая скорость продвижения). По специальному требованию фирма «Шлейхер—Шюль» поставляет бумагу всех сортов, промытую кислотами. Такие бумаги необходимы, например, для разделения фосфатов сахаров, кислот, неорганических веществ и т. п.

*Гидрофобные бумаги.* Для этой цели в продаже имеется бумага Шлейхер—Шюль 2043b, гидрофобизованная силиконом дауэкс 1107.

*Бумаги для стандартных анализов.* Фирма «Рив Энджел» выпускает специально обрезанную бумагу ватман 1, особенно удобную для стандартных анализов вне лаборатории. Этой бумагой можно пользоваться преимущественно для хроматографии неорганических катионов, достаточно различающихся значениями  $R_f$ . В одном листе размером 21×11 см всего 12 полос (1,5×9 см). Разумеется, этой бумагой можно пользоваться и для ускоренного анализа органических веществ с достаточно различающимися значениями  $R_f$ .

## МОДИФИЦИРОВАННАЯ БУМАГА

Здесь мы упомянем лишь об обработке бумаги с целью повышения ее ионообменной емкости и с целью удерживания более липофильной фазы. Вообще же пропитка бумаги (солями, менее летучими органическими растворителями и т. п.) обсуждается ниже (см. стр. 122).

### Обработка бумаги для придания ионообменных свойств

Как уже было упомянуто выше (см. стр. 88 и 102), целлюлоза бумаги содержит небольшие количества карбоксильных групп, склонных к ионному обмену. Это свойство чаще является причиной нарушений в процессе хроматографирования, нежели успешного разделения. Если же необхо-

дима бумага для ионообменной хроматографии, то ее обменную способность следует повысить. Этого можно достичь несколькими путями: а) повышением числа карбоксильных групп путем получения оксицеллюлозы; б) пропиткой бумаги ионообменными смолами; в) введением порошкообразных ионообменных смол в целлюлозное сырье для изготовления бумаги; г) введением ионизирующихся функциональных групп в молекулу целлюлозы; д) пропиткой бумаги солями.

а) *Окисленная целлюлоза*. Об оксицеллюлозе как субстрате для капиллярного анализа упоминал еще Гоппельсрелдер. За последнее десятилетие порошкообразная или волокнистая оксицеллюлоза, полученная окислением целлюлозы окислами азота, широко применялась в качестве слабокислого катионита для различных разделений (Аствуд), причем нередко в хроматографических приборах (см. главу о целлюлозных колонках, стр. 213).

Для хроматографии можно применять бумагу, содержание карбоксильных групп в которой повышено до 1—4%, так как при содержании более 5% (т. е. если каждый пятый остаток глюкозы окислен в положении C<sub>6</sub>) оксицеллюлоза становится растворимой в воде при pH выше 9. Пригодность «карбоксильных» бумаг для хроматографии подтвердили Виланд и Берг на примерах аминокислот, аминов и неорганических ионов, разделяемых с помощью водных растворов ацетата или формиата аммония (см. рис. 169).

б) *Пропитку бумаги ионообменными смолами* предложил Крессман. Ледерер предлагает следующую методику: бумагу пропускают через водную суспензию коллоидных частиц дауэкс 50 (катионит) или анионита, отжимают избыточную жидкость и просушивают бумагу. Упомянем здесь также о бумаге, пропитанной окислительно-восстановительными смолами, т. е. макромолекулярными веществами хингидронного характера, легко принимающими или отдающими электрон, окисляя или восстанавливая вещества, находящиеся с ними в соприкосновении (Кассиди и сотрудники [2]).

в) *Добавление ионообменных смол к бумажной массе*. Бумажную массу можно смешать с тонкоизмельченной ионообменной смолой и изготовить на сите бумагу (II 1). На подобной бумаге удалось достичь хорошего разделения различных неорганических катионов и анионов (Хейл). Значение обоих методов, описываемых в пунктах «б» и «в», состоит в том, что можно пользоваться теми же смолами, что и на колонках, поэтому разделение на бумаге может служить моделью для разделения в более крупном масштабе. О пористых мембранах из ионитов, не содержащих целлюлозы, будет упомянуто на стр. 110.

г) *Производные целлюлозы, содержащие диссоциирующие группы*, изучали многие авторы. Различные типы таких ионитов получил Лауч с сотрудниками: (А) карбоксильный катионит — простой эфир гликолевой кислоты (группа  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) — действием хлоруксусной кислоты на целлюлозу в щелочном растворе; (Б) сильно кислый катионит — производное бутансульфокислоты [группа  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{SO}_3\text{H})-\text{CH}_3$ ] — действием бутансультона (II 2); (В) анионит (группа  $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{R}_3)\text{X}^-$ ) — этерификацией *n*-толуолсульфохлоридом и действием третичных аминов на полученный эфир (II 3). Одна ионизирующая группа приходится на 20—30 остатков глюкозы; при повышении числа активных групп бумага разрушалась. К карбоксильным ионитам относится также полуэфир фталевой кислоты (Михеель и Альбертс [1]), который не растворялся в щелочах при 5%-ном содержании карбоксильных групп (II 4).

д) Если пропитывать бумагу солями, нерастворимыми или мало растворимыми в протекающем растворителе, в котором, однако, может происходить ионизация, то эти соли будут функционировать, как иониты; например, сульфат натрия в волокнах целлюлозы способен обменивать катион натрия на катион органического основания, сульфат которого также нерастворим в примененном растворителе (этанол) (Ларсон и сотрудники).

К наиболее давно известным ионообменникам относится гидрат окиси алюминия (II 5), применявшийся при пропитке бумаги для капиллярного анализа неорганических катионов (например, в работах Флуда). Пропитка бумаги 0,03%-ным водным раствором бромистого цетилтриметиламмония (Раттер) делает возможным разделение отрицательно заряженных коллоидов.

### Подготовка бумаги в качестве носителя липофильной фазы

Поскольку обычно  $q_{II} > q_I$  (стр. 53), хроматография на бумаге пригодна для тех веществ, коэффициент распределения которых благоприятен для неподвижной фазы. Липофильные вещества, если только они не передвигаются с фронтом, следует поэтому хроматографировать в системе, в которой неподвижная фаза более липофильна, нежели подвижная. Для такого «обращения фаз» применяли пропитку бумаги различными веществами, например силиконами, алифатическими углеводородами (парафин, парафиновое масло, нефть, керосин), глицеридами (растительные масла), высшими кислотами (квилон — стеаратохромилхлорид), ароматическими углеводородами (нафталин), каучуком и хлорированным каучуком, высшими спиртами. (О пропитках см. стр. 118, практическое использование — стр. 236 и 364.)

Некоторые авторы считали, что связь органической фазы с бумагой-носителем будет прочнее, если целлюлозу превратить в производное, набухающее в липофильных растворителях и обладающее водоотталкивающими свойствами. Это привело к применению сложных (особенно ацетатов) и простых эфиров целлюлозы. Ацетилованная бумага связывает хлорированные углеводороды (хлороформ, трихлорэтилен, хлорбензол, хлористый бензил) в атмосфере, насыщенной их парами, так что нет необходимости в предварительной пропитке. Ацетилованная бумага, однако, может служить и в качестве носителя более полярной фазы, например *n*-октанола, если ее предварительно пропустить через октанол; подвижной фазой может служить, например, смесь петролейного эфира с бензолом (1 : 1). Коптирж и Славик предложили хроматографию на частично ацетилованной бумаге для разделения некоторых динитрофенилгидразонов. Примененный ими способ ацетилирования (II 6) Нейман и сотрудники видоизменили, ацетилируя в течение 10—12 час при 60°. Независимо от них несколько позже Михеель и сотрудники предложили свой способ ацетилирования [1, 2] (в бензольном растворе при 70°). Помимо ацетилирования, этерифицируют также масляной (II 7), бензойной и фталевой (II 4) кислотами.

Из простых эфиров целлюлозы в качестве носителя неполярной фазы (декалина) Бэкер пользовался октадецилоксиметилловым эфиром,

Этерифицированные бумаги (сложные и простые эфиры целлюлозы) не получили широкого распространения главным образом потому, что «обращения фаз» легко добиться пропиткой простой бумаги, не прибегая к ее химической обработке.

## ПРОЧИЕ ЛИСТОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Этот раздел, по существу, не относится к хроматографии на бумаге, поэтому мы ограничимся лишь кратким рассмотрением. Техника работы с этими материалами напоминает во многом хроматографию на бумаге.

О бумаге из стеклянного волокна упоминает Стрейн с сотрудниками, о хроматографии на стеклянной шерсти — Лонгенэкер. Недостатком стекла является его хрупкость, достоинствами — несколько меньшая адсорбционная способность по отношению к ионам и стойкость к действию некоторых реактивов. Мэй разделял на найлоновом волокне жирные кислоты с 8—18 атомами углерода в цепи. Мембраны из ионообменных смол (Крессман, Вестермарк) также воспроизводят механические и геометрические свойства бумаги.

Для «поверхностной» хроматографии Мейнхарда и Хэлла [1, 2] и «хроматострипа» Кирхнера и Миллера необходим тонкий слой порошкообразного адсорбента. В обоих случаях на стеклянную полосу наносят слой кашицы (0,5—2 мм), состоящей из адсорбента (например, окиси алюминия), связующего агента (крахмальный клейстер или гипс) и, если необходимо, наполнителя (кремнезем). Слой высушивают описанным способом и наносят на него пробу, подлежащую разделению. Мейнхард и Хэлл проводят разделение крутовым, а Кирхнер и Миллер — восходящим способом.

## ЛИТЕРАТУРА

- Acland J. D., *Nature*, **176**, 694 (1955).  
 Acher R., Jutisz M., Fromageot C., *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 339 (1952).  
 Astrup T., Stage A., Olsen E., *Acta chem. Scand.*, **5**, 1343 (1951), **6**, 1302 (1952).  
 Astwood E. B., Raben M. S., Payne R. W., Grady A. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2669 (1951).  
 Baker R. G., *Biochem. J.*, **54**, xxxix (1953).  
 Baliga B. R., Krishnamurthy K., Rajagopalan R., Giri K. V., *J. Ind. Inst. Sci.*, **A37**, 18 (1955), *Anal. Abstr.*, **2**, 2180 (1955).  
 Boissonas B. A., Lo Bianco S., *Experientia*, **4**, 270 (1948).  
 Boulanger P., Biserte G., Scriban R., *Ann. Nutrition Alimentation*, **5**, 149 (1951).  
 Cassidy H. G., *Anal. Chem.*, **24**, 1415 (1952). [1]  
 Cassidy H. G., Ezrin M., Updegraff I. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1615 (1953). [2]  
 Connsden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944). [1]  
 Connsden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., *Biochem. J.*, **41**, 590 (1947). [2]  
 Dalgliesh C. E., *Biochem. J.*, **52**, 3 (1952).  
 Dent C. E., в книге Dyke S. C. (red.), *Recent Advances in Clinical Pathology*, 2nd edition, Churchill, London, стр. 252 (1951). [1]  
 Dent C. E., Schilling J. A., *Biochem. J.*, **44**, 318 (1949). [2]  
 Доман Н. Г., Труды комиссии по анал. химии, **6** (9), 452 (1955). [1]  
 Доман Н. Г., Каган З. С., *Биохимия*, **17**, 719 (1952). [2]  
 Flood H., *Z. anal. Chem.*, **120**, 327 (1940), *Discussions Faraday Soc.*, **7**, 190 (1949).  
 Frey-Wyssling, *Papier-Fabr.*, **36**, 214 (1938).  
 Goppelsröder F., *Capillaranalyse*, Birkhäuser, Basel (1901).  
 Gordon A. H., *Biochem. J.*, **45**, 99 (1949).  
 Grunbaum B. W., Kirk P. L., *Anal. Chem.*, **27**, 333 (1955).  
 Grüne A., *Schweiz. Apotheker-Ztg.*, **93**, 567, 587, 605 (1955).  
 Hais I. M., *Chemie*, **7**, 173 (1951). [1]

- Hais I. M., Král J., Ženíšek A., Čas. Lékařů čes., 92, 974 (1953). [2]  
Hale D. K., Chemistry & Industry, 1955, 1147.  
Herrmann J., Pharmazie, 10, 259 (1955).  
Heuser E., Carbohydrates III — Cellulose. В книге Gilman H. (red.), Organic Chemistry, vol. II, Wiley & Sons, New York, стр. 1664 (1943).  
Isherwood F. A., Hanes C. S., Biochem. J., 55, 824 (1953).  
Jepson J. B., Smith I., Nature, 177, 84 (1956).  
Jirgl V., Vnitřní lékařství, 2, 922 (1956).  
Kácl K., Ledvina M., Chem. Listy, 47, 242 (1953).  
Kember N. F., Wells R. A., Nature, 175, 512 (1955).  
Kinsinger W. G., Hock C. W., Ind. eng. Chem., 40, 1711 (1948), Textile Res. J., 18, 366 (1948).  
Kirby-Berry H., Sutton H. E., Cain L., Berry J. S., Univ. Texas Pubs, 5109, 22 (1951).  
Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., 23, 420 (1951).  
Koloušek J., Naturwissenschaften, 43, 375 (1956). [1]  
Koloušek J., Coulson C. B., Chem. Listy, 46, 186 (1952). [2]  
Kopoldová J., Čas. Lékařů čes., 89, 416 (1950).  
Košíř J. V., Slavík K., Chem. Listy, 44, 17 (1950), Collection Czechoslov. chem. Commun., 15, 17 (1950).  
Kowkabany G., Cassidy H., Anal. Chem., 22, 817 (1950).  
Kressmann T. R. E., Nature, 165, 568 (1950).  
Kürschner K., Chemie dřeva, Práce Bratislava, стр. 116 (1952).  
Larson L. M., Sternberg H., Peterson W. H., J. Am. Chem. Soc., 75, 2036 (1953).  
Lautsch W., Manecke G., Broser W., Z. Naturforsch., 8b, 232 (1953).  
Lederer M., Anal. chim. Acta, 12, 143 (1955).  
Lindner G., Naturwissenschaften, 43, 201 (1956).  
Livingston C. H., Payne M. G., Fulls J. L., Blouch R. M., Science, 118, 56 (1953).  
Longenecker W. H., Anal. Chem., 21, 1402 (1949).  
Macek K., Hасаперková J., Chem. Listy, 51, 895 (1957).  
Mai S. H., Federation Proc., 10, 388 (1951).  
Meinhard J. E., Hall N. F., Anal. Chem., 21, 185 (1949). [1]  
Meinhard J. E., Hall N. F., Anal. Chem., 22, 344 (1950). [2]  
Meloun B., Mikeš O., Chem. Listy, 51, 1574 (1957).  
Micheel F., Albers P., Mikrochim. Acta, 1954, 489. [1]  
Micheel F., Schweppe H., Naturwissenschaften, 39, 380 (1952); Mikrochim. Acta, 1954, 54. [2]  
Moore S., Stein W. H., Ann. Review Biochem., 21, 521 (1952).  
Müller A. F., Leuthardt F., Helv. chim. Acta, 32, 2289 (1949).  
Нейман М. Б., Левковский В. Н., Луковников А. Ф., ДАН СССР, 81, 841 (1951).  
Никитин В. Н., ЖФХ, 23, 775 (1949).  
Opieńska-Blauth J., Postępy Higieny, 8, 289 (1954).  
Рачинский В. В., Князязтова Е. И., ДАН СССР, 85, 1119 (1952).  
Rutter L., Nature, 166, 273 (1950).  
Sieber K., Die chemisch-technischen Untersuchungsmethoden der Zellstoff- und Papier-Industrie. Springer Verlag, Berlin, стр. 485 (1943).  
Smith I., Ph. D. Thesis, London (1955). [1]  
Smith I., Stevens B. J., Jepson J. B., Biochem. J., 62, 2P (1956). [2]  
Sparmann G., Schneider G., Naturwissenschaften, 42, 298 (1955).  
Staudinger H., Makromolekulare Chemie und Biologie. Wepf & Co., Basel, стр. 62 (1947).  
Strain H. H., Sato T. R., Norris W. P., Anal. Chem., 24, 423 (1952).  
Ultée A. J., Jr., Chem. Weekblad, 48, 821 (1952).  
Urbach K. F., Science, 109, 259 (1949).  
Westermarck T., Acta chem. Scand., 6, 1194 (1952).  
Wiegand P. F., Schrank A. R., Anal. Chem., 28, 259 (1956).  
Wieland Th., Berg A., Angew. Chem., 64, 418 (1952).  
Wood T., Biochem. J., 42, 611 (1956).  
Wynn V., Nature, 164, 445 (1949).  
Ženíšek A., Král J. A., Biochim. biophys. Acta, 12, 479 (1953).

# РАЗДЕЛЕНИЕ

---

## *Выбор систем растворителей*

*К. Мацек, Ж. Прохазка*

Для хроматографирования большинства обычных веществ в настоящее время в литературе описано много систем растворителей. Тем не менее во многих областях мы постоянно сталкиваемся с вопросом выбора подходящей системы для вещества, которое еще не подвергалось хроматографированию, или для нескольких веществ, каждое из которых хотя и было хроматографировано, но в различных системах. В этой главе будут приведены некоторые общие правила выбора систем растворителей.

Прежде всего необходимо подчеркнуть, что в настоящее время публикуются десятки и сотни вариантов какой-либо определенной системы, которая сама по себе могла бы оказаться удовлетворительной для разделения взятых веществ. Это дезориентирует и затрудняет сравнение хроматографического поведения различных веществ. Для выбора системы необходимо знать хотя бы основы механизма хроматографии на бумаге, а именно значения адсорбции и ионного обмена, отношение поперечного сечения фаз на хроматограмме и зависимость коэффициентов распределения и величин  $R_f$  (см. стр. 53). Еще более важно знать факторы, которые влияют на растворимость веществ: возможность взаимодействия между растворителем и растворенным веществом, аддитивное влияние отдельных функциональных групп, влияние диссоциации и ассоциации и взаимные отношения отдельных растворителей.

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ И ИХ СВОЙСТВА

Как уже указывалось в теоретической части, все органические вещества, а следовательно, и растворители можно классифицировать по их склонности к образованию водородных связей. Растворители, расположенные в зависимости от этого свойства, образуют ряд (табл. 9), подобный элюотропному ряду Траппа для колоночной адсорбционной хроматографии. В начале такого ряда находятся растворители, являющиеся донорами и акцепторами электронов и склонные к образованию весьма

Таблица 9

## ЭЛЮОТРОПНЫЙ РЯД РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Растворитель	Раствори- мость воды в 100 мл растворителя а), в), г)	Диэлектри- ческая по- стоянная при комнат- ной темпе- ратуре б)	$\Delta R_M$		Пригод- но для индекса С/О
			CH <sub>2</sub>	COOH	
Вода . . . . .		81,1			
Молочная кислота . . . . .		23			
Формамид . . . . .		84			
Морфолин . . . . .					
Муравьиная кислота . . . . .		58,5			
Ацетонитрил . . . . .		38,8			
Метанол . . . . .		31,2			
Уксусная кислота . . . . .		6,3			
Этанол . . . . .		25,8			
Изопропанол . . . . .		26			
Ацетон . . . . .		21,5			
<i>n</i> -Пропанол . . . . .		22,2			
Диоксан . . . . .		3			
Пропионовая кислота . . . . .		3,15			
Тетрагидрофуран . . . . .					
<i>трет</i> -Бутанол в)					
Изомасляная кислота . . . . .	20	2,6			
2-Бутанол . . . . .	12,5		-0,18	0,40	
Метилэтилкетон . . . . .	35,3 <sup>10</sup>	18	-0,18		
Циклогексанон . . . . .	2,4 <sup>31</sup>	18,2	-0,17	0,43	
Фенол . . . . .	6,7 <sup>16</sup>	9,7	-0,23	0,68	
<i>трет</i> -Амидовый спирт . . . . .					
<i>n</i> -Бутанол . . . . .	7,9	19,2	-0,20	0,50	
<i>m</i> -Крезол . . . . .	2,4				
Циклогексанол . . . . .	5,7 <sup>15</sup>	15	-0,23	0,65	
Изоамиловый спирт . . . . .	2,7 <sup>22</sup>				
<i>n</i> -Амидовый спирт . . . . .	2,7 <sup>22</sup>	16			
Бензиловый спирт . . . . .	4 <sup>17</sup>	13	-0,28	0,50	
Этилацетат . . . . .	8,6	6,1	-0,27	0,98	
<i>n</i> -Гексанол . . . . .	0,6		-0,25	0,72	
<i>сим.м</i> -Коллидин . . . . .	3,5				
Валериановая кислота . . . . .	3,7 <sup>16</sup>		-0,32	0,46	
Этилформиат . . . . .	11,8 <sup>25</sup>		-0,24	0,64	
Изовалериановая кислота . . . . .	4,2		-0,31	0,36	
Фуран . . . . .					
Этиловый эфир . . . . .	7,5	4,4	-0,32	1,05	
<i>n</i> -Октанол . . . . .			-0,32	0,85	
Диэтоксиметан . . . . .			-0,29	0,67	
Капроновая кислота . . . . .	0,4		-0,37	0,54	
<i>n</i> -Бутилацетат . . . . .	0,5 <sup>25</sup>	5	-0,28	0,68	
Диизопропоксиметан . . . . .			-0,30	0,92	
Дипропоксиметан . . . . .			-0,32	0,81	
Нитрометан . . . . .		39	-0,24	1,33	
Бромистый <i>n</i> -бутил . . . . .			-0,34		
Изопропиловый эфир . . . . .	0,2		-0,33	1,20	
<i>n</i> -Бутилбутират . . . . .			-0,34	1,18	
Бромистый <i>n</i> -пропил . . . . .	0,3		-0,37		
<i>n</i> -Бутиловый эфир . . . . .			-0,36		
Хлористый метилен . . . . .	2				
Хлороформ . . . . .	1 <sup>15</sup>	5,1			
Изоамиловый эфир . . . . .			-0,40		
Дихлорэтан . . . . .	0,6				

↑  
1—2

↓

2—3

↑  
↓

Продолжение табл. 9

Растворитель	Раствори- мость воды в 100 мл растворителя а), в), г)	Диэлектри- ческая по- стоянная при комнат- ной темпера- туре б)	$\Delta R_M$		Пригод- но для индекса С/О
			CH <sub>2</sub>	COOH	
Бромбензол . . . . .	0,05 <sup>30</sup>	5,4			
Трихлорэтан . . . . .					
Дибромэтан . . . . .					
Бромистый этил . . . . .	0,9				
Бензол . . . . .	0,08 <sup>22</sup>	2,24	-0,42		3—5
Хлористый пропил . . . . .	0,27				
Трихлорэтилен . . . . .	0,1				
Толуол . . . . .	0,05 <sup>16</sup>	2,3			
Ксилол . . . . .		2,6			
Четыреххлористый углерод . . . . .	0,08	2,25	-0,44	1,61	
Сероуглерод . . . . .		2,6			
Декалин . . . . .		2,13			
Циклопентан . . . . .					
Циклогексан . . . . .		2,1			
Гексан . . . . .	0,01 <sup>15</sup>	1,88			5—15
Гептан . . . . .	0,005 <sup>15</sup>	1,97			
Керосин . . . . .					
Парафиновое масло . . . . .					

а) Приведенные величины заимствованы из книги Ходгмана (C. D. Hodgman и сопр., «Handbook of Chemistry and Physics»).

б) Значения заимствованы из книги Д'Анса и Лакса (D'Ans, Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker»).

в) Растворители до *трет*-бутанола неограниченно смешиваются с водой.

г) Если не оговорено особо, величины растворимости приведены для температуры 20°.

прочных водородных связей (гидрофильные растворители, обычно называемые полярными), тогда как в конце ряда располагаются растворители, такими свойствами не обладающие (гидрофобные растворители, также называемые липофильными или неполярными). Между обоими крайними типами, разумеется, существует постепенный переход, образуемый растворителями средней гидрофильности. Растворители, помещенные в начале таблицы (до *трет*-бутанола), неограниченно смешиваются с водой, тогда как последующие с водой образуют два слоя. Растворители, выделенные жирным шрифтом, обладают свойствами, необходимыми для применения в качестве основных растворителей в хроматографии на бумаге.

В качестве дополнения к табл. 9 приведена табл. 10, в которой растворители сгруппированы по их химическому характеру (вертикальные графы). Для горизонтальных рядов гидрофильность убывает сверху вниз, поэтому в нижней части таблицы располагаются растворители гидрофобного характера. Растворители были расположены в зависимости от результатов разделения дикарбоновых кислот, фенолов и индолов в системах, образуемых насыщением соответствующего растворителя водой. Таблица позволяет быстро подобрать хроматографически эквивалентные системы, так как растворители, находящиеся в одном и том же ряду, обладают одинаковой гидрофильностью (или гидрофобностью); это означает, что данное вещество в системах, составленных из этих растворителей, обладает приблизительно постоянным значением  $R_f$ . На основании сказанного выше (см. стр. 75) становится понятным, что речь идет только о приблизительно одинако-

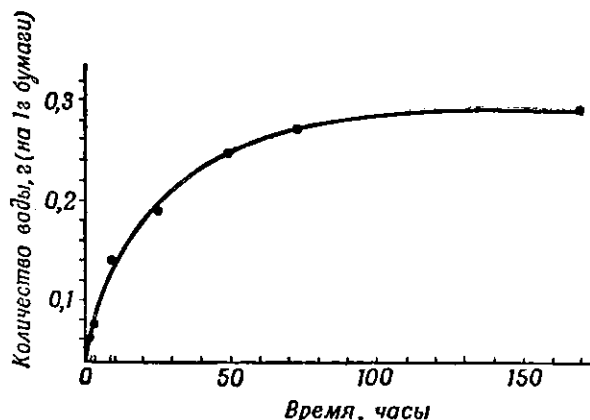
Таблица 10

РАСТВОРИТЕЛИ, ОБЛАДАЮЩИЕ ОДИНАКОВОЙ ГИДРОФИЛЬНОСТЬЮ (ИЛИ ГИДРОФОВНОСТЬЮ)

Кетсны	Спирты	Кислоты	Сложные эфиры	Ацетали	Простые эфиры	Хлорированные алифатические углеводороды	Ароматические углеводороды	Предельные углеводороды	Разные
Метилэтилкетон Циклогексанон	Бутанол-2	Изомасляная							
	n-Бутанол								Фенол (хинолин)
	Циклогексанол		Этилацетат						
	Бензиловый спирт								
	n-Гексанол	Валериановая	Этилформиат						симм-Коллидин
	n-Октанол	Изовалериановая		Диэтоксиметан	Этиловый эфир				m-Крезол
		Капроновая	Бутилацетат	Диизопропоксиметан					Нитрометан
			Бутилбутират	Дипропоксиметан	Изопропиловый эфир Бутиловый эфир Изоамиловый эфир	Бромистый n-бутил Бромистый n-пропил Хлороформ			
						Дихлорэтан Дибромэтан Бромэтан Хлористый n-пропил Трихлорэтилен Четыреххлористый углерод	Бензол		Бромбензол
							Толуол Ксилол		Сероуглерод
								Декалин Циклогексан	

вых свойствах, которые будут несколько отличаться при хроматографии веществ с различными функциональными группами, так как в этом случае могут играть роль свойства растворителей как акцепторов или доноров протонов.

Очень важно знать, какие растворители являются равногидрофильными, так как это позволяет быстро заменить тот или иной растворитель в системе, который хотя и дает подходящие значения  $R_f$ , но не вполне удовлетворяет требованиям, указанным в пунктах 2 и 6 (стр. 118—119). Применение взаимозаменяемых систем иного характера (например, замена



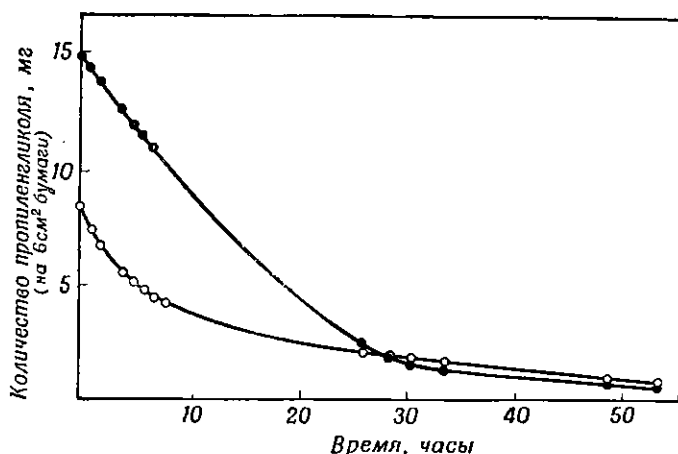
Р и с. 41. Поглощение воды бумагой в камере, насыщенной водой (Мацек). Количество воды в фильтровальной бумаге (в граммах на 1 г) в зависимости от времени насыщения (в часах).

протоноакцепторного растворителя протонодонорным) может способствовать разделению веществ с функциональными группами, отличающимися теми же свойствами при аналогичной растворимости в исследуемой системе. От этого зависит также и удобство применения подобных систем для двумерной хроматографии.

Как уже было упомянуто ранее (см. стр. 73), основным процессом при хроматографии на бумаге является распределение между двумя несмешивающимися жидкостями, одна из которых удерживается бумагой, а вторая служит подвижной фазой. При составлении систем необходимо поэтому принимать во внимание обе фазы.

В простейшем случае, имеющем место при разделении гидрофильных и среднегидрофильных веществ, на бумаге удерживается вода, а подвижной фазой служит несмешивающийся с водой органический растворитель. Такую двухкомпонентную двухфазную систему получают встряхиванием воды с органическим растворителем, не смешивающимся с водой; после разделения обеих фаз та, которая богаче органическим растворителем, будет служить подвижной фазой; камеру основательно насыщают обоими компонентами. Насыщение водой служит для пропитывания бумаги водной фазой, насыщение органическим растворителем предотвращает испарение растворителя при его движении по бумаге. Для этого типа систем в качестве подвижной фазы можно пользоваться растворителями, указанными в табл. 9, от изомасляной кислоты до изопропилового эфира. В некоторых случаях к двухкомпонентной системе можно добавлять еще третий компонент. Роль его различна; добавление кислот или оснований

может, например, подавлять или, напротив, усиливать диссоциацию веществ с кислотными или основными функциональными группами и таким способом предотвращать нежелательное образование «хвостов». Одновременно органические кислоты и основания, как и некоторые смешивающиеся с водой спирты и кетоны, повышают растворимость воды в подвижной фазе и тем самым гидрофильность системы. При этих условиях в качестве основного растворителя можно пользоваться даже такими гидрофобными



Р и с. 42. Испарение пропиленгликоля с бумаги, пропитанной пропиленгликолем (Диршерль и Герхардс).

● бумага ватман; ○ бумага Шлейхер—Шюльц 2043b.

растворителями, как четыреххлористый углерод. Следует упомянуть, что были проведены опыты по смачиванию бумаги водой непосредственно перед разделением (II 8), однако результаты в общем не отличались от результатов, полученных при насыщении бумаги водой из атмосферы камеры (некоторые исключения см. на стр. 369).

Приведенный тип систем особенно удобен для разделения веществ гидрофильного характера и даже для некоторых веществ средней гидрофильности (стр. 119). Однако, поскольку такие вещества мало растворимы в воде, отдадут предпочтение другому типу систем с неподвижным полярным органическим растворителем, например формамидом, пропиленгликолем, диметилформамидом, иногда и с некоторыми низшими спиртами, преимущественно метанолом. Возможны две рабочие методики. При растворителях с высокой температурой кипения (формамид, пропиленгликоль) неподвижную фазу наносят погружением бумаги в раствор этой фазы в летучем растворителе (II 9). Высокая температура кипения обеспечивает удерживание таких растворителей в бумаге в течение продолжительного времени, даже если и происходит уменьшение их количеств (рис. 42). Количество растворителя в бумаге, которое определяет величины  $R_f$  разделяемых веществ, определяется концентрацией вещества, взятого для пропитки, способом пропитки и сортом бумаги. По данным Диршерля и Герхардса бумага Шлейхер—Шюльц 2043b обладает по отношению к пропиленгликолю лишь половиной емкости в сравнении с бумагой ватман 1. Для удержания летучих растворителей (метанола) пользуются тем же способом, что и для воды, т. е. насыщение осуществляют из атмо-

сферы камеры (II 10). Для разделения в обоих случаях служит органический растворитель, не смешивающийся с неподвижной фазой, т. е. все растворители от хлороформа до гептана.

Для хроматографии гидрофобных веществ следует пользоваться третьим типом систем — с так называемыми обращенными фазами: на бумаге удерживается малолетучий гидрофобный растворитель, а подвижной фазой служит гидрофильный. Однако, поскольку бумага в силу своего химического строения имеет большее сродство к гидрофильным растворителям, в таких случаях ее необходимо химически модифицировать [ацелированием (II 6), пропитыванием силиконом (II 11) или (относительно реже) — каучуком] или использовать пропитку маслами или углеводородами с высокой температурой кипения, которые будут ограничивать доступ полярного растворителя к гидроксильным группам целлюлозы (II 12—14). В таких случаях подвижной фазой служат преимущественно водные растворы спиртов или уксусная кислота. Не следует применять безводные спирты, так как может происходить вымывание неподвижной фазы.

Помимо трех основных приведенных типов систем, наиболее часто применяемых в хроматографии на бумаге, был описан еще ряд других (однофазные системы, разделение при помощи воды и др.); для разделения пользовались также адсорбционной хроматографией на бумаге, пропитанной гидратом окиси алюминия (II 5). Применение этих систем, однако, не столь распространено, поэтому мы упомянем о них лишь в тех разделах, где их применение увенчалось успехом. Самостоятельный раздел представляют системы, о которых будет сказано в главе о неорганической хроматографии (стр. 684) и которые в качестве главной составной части или в виде добавки содержат комплексообразующие вещества.

В заключение необходимо подчеркнуть, что всюду имеются в виду химически чистые растворители, если это не оговорено особо.

### ВЫБОР СИСТЕМЫ

Прежде чем приступить к изложению принципов выбора систем, кратко упомянем о некоторых требованиях, предъявляемых к ним.

1. Анализируемые вещества должны в данной системе обладать значениями  $R_f$  от 0,05 до 0,85. При идентификации стараются, чтобы вещество имело  $R_f$  около 0,5, при разделении большего числа веществ следует стремиться к тому, чтобы они были распределены по всей длине хроматограммы.

2. Система должна полностью разделять два (или более) вещества близкого строения, причем различие в величинах  $R_f$  должно составлять по крайней мере 0,05. Лишь для веществ, имеющих  $R_f$  0,01—0,2, достаточно меньшее различие, поскольку их можно разделить повторным хроматографированием.

3. Изотерма распределения вещества в выбранной системе должна быть линейной. Пятна должны иметь круглую форму и по окончании разделения занимать примерно такую же площадь, как и при нанесении; форма пятен не должна изменяться с концентрацией.

4. Система не должна вызывать химических изменений анализируемых веществ.

5. Растворитель не должен взаимодействовать с реактивом, применяемым для проявления, или понижать чувствительность реакции проявления. Повышение чувствительности таких реакций, напротив, желательно.

6. Состав системы должен быть постоянным и легко воспроизводимым.

Пункты 1 и 2 являются основными в выборе системы растворителей. В первую очередь выбор определяется тем, что нам известно об анализируемом веществе. В зависимости от этого могут иметь место три рассмотренных ниже случая.

### Строение анализируемого вещества известно

В этом случае удобнее пользоваться данными о групповых константах для различных систем растворителей (см. стр. 80) и заранее рассчитать вероятные величины  $R_i$  для нескольких систем, из которых затем выбрать наиболее выгодную теоретически. Однако для веществ сложного строения нельзя применять простые математические формулы с учетом аддитивного влияния отдельных групп, и о растворимости можно судить лишь приближенно, исходя из соотношения гидрофильных и гидрофобных групп. Основываясь на практических соображениях, группы можно распределить следующим образом:

а) сильногидрофильные группы: гидроксильная, карбоксильная, первичная аминная, амидная, альдегидная, сульфогруппа;

б) среднегидрофильные группы: кетонная, эфирная, третичная аминная, нитрогруппа, нитрильная, сложноэфирная;

в) гидрофобные группы: метильная, метиленовая; ароматические ядра примерно эквивалентны четырем группам  $\text{CH}_2$ .

Гидрофильные группы в системах с неподвижной полярной фазой будут понижать величины  $R_i$ , а гидрофобные, напротив, повышать. Весьма приближенно можно утверждать, что величина снижения  $R_i$  (групповая константа, стр. 78) данной сильногидрофильной группой примерно эквивалентна величине приращения  $R_i$ , обусловленной двумя-четырьмя гидрофобными метиленовыми группами, представляющими гомологическую разность. Понижение  $R_i$ , обусловленное группой средней гидрофильности, соответствует примерно одной-двум группам  $\text{CH}_2$ . Основываясь на сумме гидрофильных и гидрофобных групп с учетом вышесказанного и на их соотношении, выбирают тип системы. Если преобладают гидрофильные группы, пользуются гидрофильными системами (стр. 121), если преобладают гидрофобные, применяют обращенные фазы. Для веществ, у которых число гидрофильных групп при соответствующем пересчете окажется эквивалентным числу гидрофобных групп, наиболее удобны системы с формамидом или пропиленгликолем в качестве неподвижной фазы. В системах с неподвижной полярной фазой следует выбирать такие смеси растворителей, в которых коэффициент распределения достаточно велик (т. е. чтобы разделяемые вещества лучше растворялись в неподвижной фазе, чем в подвижной).

Если вещество в исследуемой системе остается на стартовой линии, это свидетельствует о его крайне малой растворимости в подвижной фазе, и следует поэтому пользоваться более гидрофильной системой, расположенной в табл. 9 выше. Если, напротив, вещество движется с фронтом растворителя, то оно мало растворимо в неподвижной фазе, и в этом случае выбирают в качестве подвижной фазы растворитель с более гидрофобными свойствами (для того чтобы снизить растворимость анализируемого вещества в подвижной фазе); еще лучше пользоваться системами для более гидрофобных веществ (формамид как неподвижная фаза или обращенные фазы). В некоторых случаях следует также испытать влияние кислотных или основных добавок: кислоты замедляют движение оснований, а основания — кислот. Если при выборе гидрофильных растворителей мы дойдем

до *n*-бутанола, а вещество все еще будет оставаться на стартовой линии, следует испытать разделение с перетеканием или пользоваться системами, смешивающимися с водой.

При рассмотрении вопроса о разделении веществ следует всегда обращать внимание на то, что величины групповых констант возрастают при увеличении липофильности системы. Следовательно, разделение двух веществ, различающихся, например, присутствием кетогруппы, будет более совершенным в системах более липофильного характера. Такое изменение групповых констант для карбоксильной и метиленовой групп приведено в табл. 9.

### Известен суммарный состав веществ

Для веществ, не содержащих азота, можно приближенно судить об их характере на основании соотношения углерода и кислорода, из которого рассчитывают индекс C/O, т. е. отношение числа атомов углерода к числу атомов кислорода в молекуле. Если величина этого индекса находится между 1 и 5, выбирают растворитель из числа гидрофильных; индекс, равный 5—15, указывает на необходимость применения систем средней гидрофильности, при еще более высоких значениях C/O следует пользоваться обращенными фазами. Выбор растворителя на основании индекса C/O ясен из табл. 9. Однако зависимость от приведенных значений индекса правильна лишь для нейтральных или кислых растворителей, но не для основных, в которых кислоты в результате увеличения диссоциации будут передвигаться значительно медленнее.

Для веществ, содержащих азот, следует принимать во внимание многие факторы, поэтому выбор может осложниться большими погрешностями. Для гидрофильных веществ оказывается, что один атом азота примерно равноценен двум атомам кислорода, тогда как для гидрофобных веществ, содержащих преимущественно гетероциклический или третичный атом азота, каждый атом его приблизительно эквивалентен одному атому кислорода. И в этом случае большое значение имеет рН системы.

### Состав анализируемых веществ неизвестен

Поскольку о характере вещества нельзя судить только на основании его растворимости, проводят предварительное хроматографирование лучше всего в системе бутилацетат — вода (стр. 121). В зависимости от величины  $R_f$  анализируемого вещества далее пользуются либо более гидрофильными, либо более гидрофобными системами.

До сих пор мы рассматривали выбор систем, не учитывая качества пятен. Большая часть нарушений формы пятен у веществ кислого или основного характера обусловлена диссоциацией их в водной фазе (см. стр. 87), и для устранения этих нарушений следует подобрать подходящее значение рН системы. Образование продолговатых пятен может, однако, иметь и другие причины, из которых мы упомянем лишь малую растворимость анализируемого вещества в подвижной фазе [для предотвращения этого можно попытаться взять другой равногидрофильный (равногидрофобный) растворитель или наносить меньшее количество анализируемого вещества] и адсорбцию на целлюлозе (эта опасность имеет место преимущественно для растворителей из нижней части табл. 9 и ее можно устранить, пользуясь системами с формамидом или пропиленгликолем в качестве неподвижной фазы) (П 9).

Система не должна вызывать химических изменений анализируемых веществ. Органические растворители, перечисленные в табл. 9, обычно таких изменений не вызывают. Здесь следует принимать во внимание главным образом вещества, служащие добавками к основным системам, например кислоты и основания, которые могут способствовать расщеплению или изменению веществ, чувствительных к изменениям pH. Большая часть растворителей не взаимодействует с обычными реактивами, применяемыми для проявления. Исключением являются фенолы, азотистые основания и некоторые растворители, способные окисляться перманганатом калия. Разумеется, кислоты и основания будут оказывать влияние на обнаружение веществ с помощью кислотно-основных индикаторов, а флуоресцирующие или гасящие флуоресценцию растворители могут помешать обнаружению в ультрафиолетовом свете.

Весьма важен последний пункт о том, что состав системы должен быть постоянным и воспроизводимым. Необходимо учитывать изменение содержания воды в подвижной фазе с изменением температуры. Понижение температуры способствует отслаиванию части воды в лодочке и может вызвать таким образом нарушение процесса хроматографирования. В системах, содержащих спирты и сильные органические кислоты, возможна этерификация, а в системах, содержащих сложные эфиры и сильные кислоты, — омыление. Поскольку, однако, наиболее часто применяют именно эти системы, стараются использовать их лишь в течение определенного промежутка времени, лучше всего в течение 2—14 дней с момента их приготовления. Сильно склонны к изменениям системы растворителей с низкими температурами кипения, как, например, эфир и т. п. Эти системы стараются не применять, так как они дают плохо воспроизводимые результаты. Если, однако, необходимо применить именно такую систему, то камеру основательно насыщают растворителем и по возможности проводят разделение при низких температурах (в холодильном шкафу).

### РЕКОМЕНДУЕМЫЕ СИСТЕМЫ

Вполне понятно, что при выборе систем растворителей значительную роль играют доступность растворителей и их стоимость; имеют значение также традиции лаборатории или института. Чрезвычайная разбросанность данных в литературе лишь с трудом позволяет высказать сколько-нибудь однозначное суждение о пригодности определенной системы. По-видимому, единственное исключение составляет система *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5), которая действительно универсальна. Мы, однако, придерживаемся того мнения, что дальнейшее развитие метода неизбежно приведет к сокращению числа систем растворителей. В качестве первого шага в этом направлении приводим на основании собственного опыта в области разделения веществ самого разнообразного химического характера несколько наиболее подходящих систем — от гидрофильных до гидрофобных. Камеры с такими системами следует постоянно иметь под руками. Системы расположены в порядке убывания гидрофильности.

1. Фенол, насыщенный водой.
2. *n*-Бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5).
3. *n*-Бутанол — аммиак 1,5 н. (1:1).
4. Бутилацетат, насыщенный водой.
5. Четыреххлористый углерод, содержащий 1% уксусной кислоты, в камере, насыщенной 50%-ной водной уксусной кислотой.

6. Бумага, пропитанная формамидом (II 9a); подвижная фаза — хлороформ; камера насыщена хлороформом.

7. Бумага, пропитанная формамидом; подвижная фаза — бензол; камера насыщена бензолом.

8. Бумага, пропитанная формамидом; подвижная фаза — бензол — циклогексан (3 : 7); камера насыщена той же смесью.

9. Петролейный эфир — метанол — вода (II 10).

10. Бумага, пропитанная керосином (II 12); подвижная фаза — 80%-ный водный метанол, содержащий 5% *n*-бутанола; камера насыщена этой же смесью.

Из систем средней гидрофильности (5—9) отдают предпочтение формамидным системам. В некоторых случаях, однако, затруднение может состоять в необходимости высушивания хроматограммы при высокой температуре вследствие высокой температуры кипения формамида, что недопустимо для термолабильных веществ, а также при разделении жидкостей. В таких случаях предпочитают систему с четыреххлористым углеродом или систему петролейный эфир—метанол—вода, которая приблизительно равноценна системе формамид/бензол — циклогексан; системой 9 можно пользоваться и для веществ, несколько более гидрофильных, заменяя петролейный эфир бензолом.

В заключение следует отметить, что идеальный выбор системы возможен лишь по выяснении влияния всех факторов, воздействующих на передвижение вещества по хроматограмме. Сведение числа всех систем растворителей к нескольким десяткам, для которых будут известны основные и групповые константы, сделает возможным быстрый подбор наиболее выгодных условий для хроматографии. В настоящее время такое положение существует только для некоторых простейших веществ. Значительное удобство могло бы также представить знание коэффициентов пересчета величин  $R_f$  при переходе от одной системы к другой, что, однако, возможно лишь в ряду растворителей, обладающих сходным характером.

## Техника разделения

**К. Мацек, И. М. Хайс**

Разделение представляет собой основу хроматографического процесса. Хотя в литературе этому вопросу посвящены сотни работ, в основе по-прежнему остается техника, предложенная основоположниками хроматографии на бумаге — Консденом, Гордоном и Мартином. В этом разделе мы описываем только основные типы хроматографического разделения и приборы, которые оказались наиболее удобными, так как их дальнейшие видоизменения обычно не оказывают существенного влияния на качество разделения. Материал разделен на три части; в первой части методики сгруппированы в зависимости от направления движения, во второй части описывается техника повторной хроматографии и в третьей — различные специальные и вспомогательные методы. В заключение проводится сравнение отдельных методов.

Принципы хроматографии на бумаге рассмотрены выше (стр. 38—39). В главе о выборе систем (стр. 112) было упомянуто, что атмосфера камеры должна быть насыщена всеми компонентами системы растворителей. Это насыщение осуществляют, помещая на дно камеры чашку с обеими фазами системы растворителей. Более совершенного насыщения можно достичь, укрепляя на стенках камеры бумагу, смоченную растворителями. В некоторых случаях было рекомендовано перед разделением оставлять на некоторое время бумагу в атмосфере камеры, для того чтобы наступило равновесие, однако в большинстве случаев это не является необходимым; об исключениях мы упомянем в специальной части. В других случаях, напротив, полного насыщения водой не требуется, рекомендуется насыщать лишь до определенной относительной влажности. Этого можно достичь, заменяя воду растворами различных электролитов.

О влиянии температуры на величину  $R_f$  веществ указывается на стр. 145. Для получения воспроизводимых результатов разделения и величин  $R_f$  при разделении следует поддерживать постоянную температуру, что можно осуществить, проводя хроматографирование в термостате, или лучше термостатированием всего помещения, в котором производится работа. В большинстве случаев, однако, при стандартных анализах нет необходимости поддерживать постоянную температуру, так как подвижность каждого из анализируемых веществ сравнивают с подвижностью эталонного образца. Хроматографическое разделение проводят, как правило, при комнатной температуре. Лишь при разделении высококипящих жидкостей или при использовании легко летучих растворителей рекомендуется вести разделение при пониженных температурах, лучше всего в холодильном шкафу при  $+5^\circ$ . Хроматографирование при повышенных температурах хотя и ускоряет анализ, однако не оказывает влияния на качество разделения.

## МЕТОДЫ С РАЗЛИЧНЫМ НАПРАВЛЕНИЕМ ДВИЖЕНИЯ

### НИСХОДЯЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

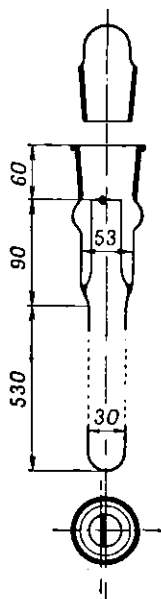
При этом классическом способе бумагу с нанесенными на нее пробами вкладывают верхним концом в сосуд с подвижной фазой, которая постепенно просачивается вниз по бумаге. Все устройство состоит из сосуда (лодочки) для системы растворителей, тем или иным способом укрепляемого в верхней части камеры, в которой проводят хроматографирование.

#### Камеры

Основой прибора служит полностью герметичная хроматографическая камера, насыщенная парами всех составных частей системы растворителей. В качестве камеры может служить любой сосуд подходящей формы и размера, который можно легко герметизировать. Наиболее удобным материалом для камеры является стекло, так как оно позволяет следить за движением растворителя по бумаге. В зависимости от размера и назначения все применяемые камеры можно распределить на следующие группы:

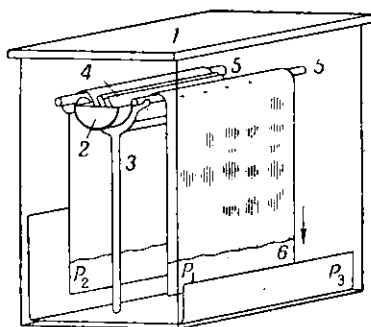
1. *Узкие камеры*, в которые помещают лишь одну полоску бумаги с одним образцом. Эти камеры служат преимущественно для предварительного исследования систем растворителей. Рабек для этой цели сконструировал специальную трубку диаметром 3 см и высотой 62 см, снабженную сверху круговым желобком для растворителя и шлифом (рис. 43).

2. *Камеры для стандартных анализов*, в которые одновременно можно помещать 2—4 хроматограммы с 5—7 пробами каждая. Этот тип камер наиболее употребителен. Камеры чаще всего изготовляют целиком из стекла в виде цилиндра (диаметр 20—40 см, высота 50—65 см) или прямоугольного параллелепипеда (30×40×60 см) (рис. 44). Очень удобны камеры, снабженные расширением на расстоянии около 10 см от верхнего края, позволяющим помещать лодочку без каких-либо подставок (рис. 45). Камеру сверху закрывают стеклянной пластинкой, которая должна обеспечивать герметичность. Для этого обычно достаточно отшлифовать верхний край камеры. Уплотнение с помощью пористой резины ненадежно, так как каучук подвергается воздействию органических растворителей. Однако уплотнение пористыми пластмассами (например, полиамидами) оказалось целесообразным. Уплотнение жирными смазками неудобно.



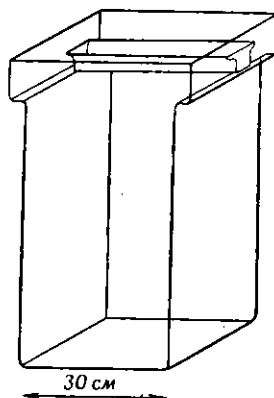
Р и с. 43. Трубка для исследования систем растворителей (Рабек). К верхнему концу трубки 30×620 мм припаивают нормальный шлиф 50 мм. В образующийся при этом кольцевой карман (на рисунке обозначенный размером 90) помещают подвижную фазу для нисходящего разделения. Полосу бумаги перегибают через горизонтальный поперечный стеклянный стержнек. Камерой можно пользоваться и для восходящей хроматографии.

3. *Камеры для больших листов бумаги*. Камеры больших размеров нельзя изготовить из стекла, поэтому их делают из других материалов.



Р и с. 44. Камера для нисходящей хроматографии.

Атмосфера камеры, накрытой крышкой 1, насыщена парами обеих фаз системы, налитой на бумагу  $P_3$  устилающую дно и стенки камеры. Лодочка 2, содержащая подвижную фазу, укреплена на стойке 3. Листы бумаги  $P_1$  и  $P_2$  прижаты к лодочке стеклянной пластинкой 4 и перегнуты через стержни 5. Подвижная фаза впитывается бумагой, и ее фронт 6 движется вниз.



Р и с. 45. Камера с расширением наверху для нисходящей хроматографии.

Лодочку из толстостенного стекла или фарфора свободно устанавливают в расширенной части камеры.

Очень удобными оказались ящики глубиной 20—30 см, имеющие деревянный застекленный каркас. Удобны, по-видимому, также стальные камеры,

выпускаемые фирмой «Уилл». Эти камеры имеют размер  $63 \times 85 \times 85$  см и снабжены стеклянными оконцами в стенках, позволяющими следить за движением растворителя. Удобно также приспособление для удаления избытка системы растворителей со дна камеры (рис. 46).

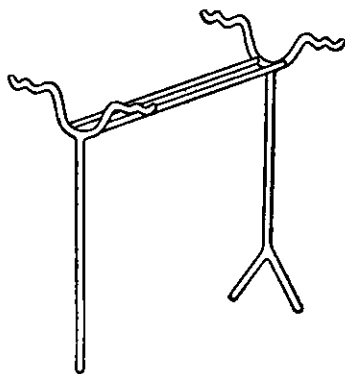
### Сосуды для растворителей

Подвижную фазу чаще всего помещают в лодочки, имеющие в сечении форму U, V или  $\square$ . Реже пользуются чашками. В качестве материала обычно применяют стекло, так как стеклянные лодочки легко можно изготовить в лаборатории из стеклянных трубок диаметром 3—5 см (П 15). Удобнее, однако, лодочки из литого стекла или из фарфора, так как они не так хрупки. Подобными же свойствами обладают лодочки из пластмасс, особенно из стойких к действию органических растворителей и термопластичных, формирующихся при нагревании до  $100^\circ$  (например, фатрадур; Колоушек и Гартман). Некоторые фирмы выпускают металлические эмалированные лодочки и лодочки из нержавеющей стали.

Длина лодочки определяется размерами камеры, а диаметр — поверхностью листа, который в нее помещают. В обычных камерах для двух хроматограмм размером  $45 \times 20$  см пользуются лодочками длиной 22 см и диаметром 3—4 см. В камерах для больших листов пользуются соответственно большими лодочками. Для исследования влияния pH или концентрации солей на разделение при прочих равных условиях с успехом можно пользоваться лодочкой по Вундерли, состоящей из четырех сегментов.

### Положение лодочки в камере

Для укрепления лодочек было описано много способов. Очень удобны камеры с расширением наверху, так что лодочка, будучи несколько длиннее камеры в узкой части, свободно помещается в ее широкой части (рис. 45). Одним из наиболее старых способов является установка лодочки на подставке, изготовленной из стеклянных палочек (рис. 47). Неудобство этого способа заключается в хрупкости всей конструкции. В настоящее время лодочку чаще всего прикрепляют к стенкам камеры. В случае деревянных ящиков или металлических конструкций это осуществить легко, но в цельностеклянных камерах необходимо



Р и с. 47. Стеклянная подставка для лодочки.

сверлить отверстия в стенках и вставлять в них палочки, на которые помещают лодочку. Удобна также подставка, которая удерживается в верхней части камеры благодаря своей упругости. Эти подставки изготовляют из пластмасс или нержавеющей стали (рис. 48). Иногда подвешивают лодочки к крышке камеры при помощи, например, проволоки из нержавеющей стали, которую продевают через отверстие в крышке камеры.

### Прочие принадлежности камеры

Удобно, если стеклянная пластинка, которой закрывают камеру, снабжена одним или двумя отверстиями с пришлифованными пробками, через которые можно доливать подвижную фазу, не открывая камеры. Этим избегают нарушения равновесия в атмосфере камеры.

Бумагу необходимо закрепить в лодочке, так как иначе при пропитывании растворителем она может соскользнуть на дно камеры. Для этого используют специальные грузики. Удобнее всего грузики из литого стекла, имеющие треугольное сечение. Прижимать бумагу можно также толстыми стеклянными палочками, загнутыми на конце под прямым углом для того, чтобы было удобнее вынимать их из лодочки.

Бумага должна свисать из лодочки отвесно вниз. Однако, поскольку при этом нередко возникают неправильности в протекании растворителя, вдоль лодочки помещают стеклянную палочку, через которую и перегибают лист. Эту палочку следует поместить на подставке или каким-либо образом соединить с лодочкой. В некоторых случаях достаточно, если стенки лодочки вертикальны. Стеклянные палочки, помещаемые на подставке (рис. 44, 47), удобны тем, что из одной лодочки на каждую сторону можно свесить по два и три листа, если поместить на подставке две или три палочки. Кроме того, после разделения из камеры легко можно вынуть хроматограмму вместе с палочкой, не опасаясь, что бумага соскользнет или оборвется.

В больших камерах, насыщаемых снизу, атмосфера не во всех частях может оказаться одинаково насыщенной парами растворителей, поэтому некоторые авторы прикрепляют к нижней части хроматограммы стальные иглы и меняют при помощи магнита, помещенного снаружи, положение нижнего края бумаги, устраняя таким образом различия в насыщении камеры (Хейнс, Ишервуд). Этот процесс можно автоматизировать, применяя электромагнитное устройство (Хед, Канауэй).

### Разделение с перетеканием

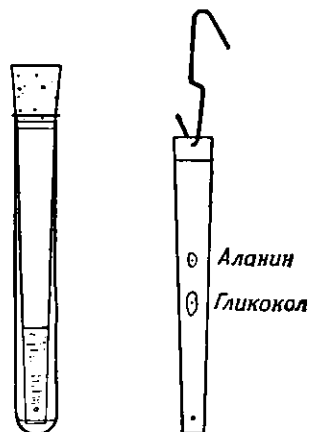
В некоторых системах, вообще очень удобных вследствие круглой формы пятен, вещества обладают низкими значениями  $R_f$ . В таких случаях, особенно если в смеси отсутствуют вещества с высокими значениями  $R_f$ , вещества с низкими значениями  $R_f$  можно разделить и идентифицировать при помощи перетекания. Когда фронт растворителя достигнет нижнего края листа, разделение не прерывают и растворитель свободно стекает с листа. Чтобы при этом не возникали неправильности в протекании растворителя, на нижнем крае бумаги выстригают зубцы (ширина около 2 см, длина 2 см). Менее распространен способ, предложенный Миетти-ненем и Виртаненом, которые прикрепляли к нижнему краю листа рулончик целлюлозы, впитывавший растворитель.

### ВОСХОДЯЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Отличие восходящей хроматографии от нисходящей состоит в том, что растворитель при восходящей хроматографии поднимается вверх по бумаге. В связи с этим возникает возможность упрощения камеры, так как отпадает необходимость в лодочке и опорной конструкции для нее. Подвижную фазу можно поместить в чашке на дне камеры или налить непосредственно на дно. Дальнейшая задача заключается в способе подвешивания хроматограммы.

### Камера

В качестве камер пользуются такими же цилиндрическими или прямоугольными сосудами, какие были описаны для нисходящего способа. Высота этих камер, однако, может быть примерно на 10 см меньше, так как исключается пространство, занимаемое лодочкой. Для предварительного исследования систем можно пользоваться камерами типа Рабека, наливая растворитель прямо на дно камеры, или лучше пробирочным способом Рокланда и Данна [2]. В этом способе камерой служит пробирка, на дно которой налита подвижная фаза. Если требуется насыщать обеими фазами, Миллетти рекомендует налить на дно камеры одну фазу и



Р и с. 49. Восходящая хроматография в пробирке (Рокланд и Данн).

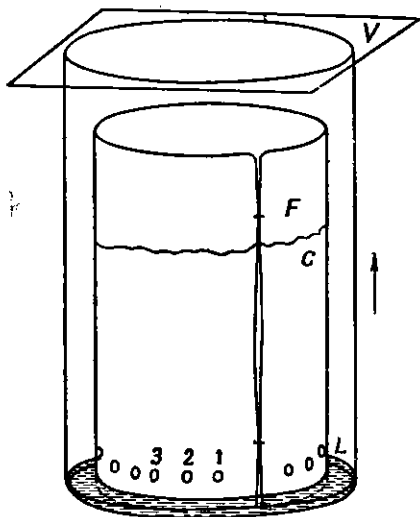
Полоску бумаги зажимают между обеими половинами продольно разрезанной корковой пробки.

затем поместить над ней в маленькой чашечке собственно подвижную фазу; эту чашечку ставят на стеклянный шарик.

### Укрепление бумаги

По способу Уильямса и Кирби бумагу свертывают в форме цилиндра достаточно большого диаметра (рис. 50). Оба боковых края скрепляют металлической скрепкой или ниткой. Полученный цилиндр ставят на дно камеры, где помещена подвижная фаза, стремясь, чтобы он при пропитывании не покоробился. Подобным же способом поступают и при работе с разрезанной бумагой при стандартных неорганических анализах в полевых условиях (Хант и Уэллс).

В других случаях бумага может быть прикреплена к крышке камеры



Р и с. 50. Прибор для восходящей хроматографии (Уильямс и Кирби).

Лист фильтровальной бумаги, на которой нанесены исследуемые пробы (1, 2, 3, ...), свертывают в цилиндр и сшивают края ниткой или скрепляют зажимом. В одну и ту же камеру можно вложить несколько таких бумажных цилиндров различного диаметра. Подвижную фазу можно наливать непосредственно на дно камеры.

с помощью проволоки из нержавеющей стали, пропущенной через отверстие в крышке; можно также пользоваться различными подставками, как при нисходящем способе. В пробирочном способе и вообще при приме-

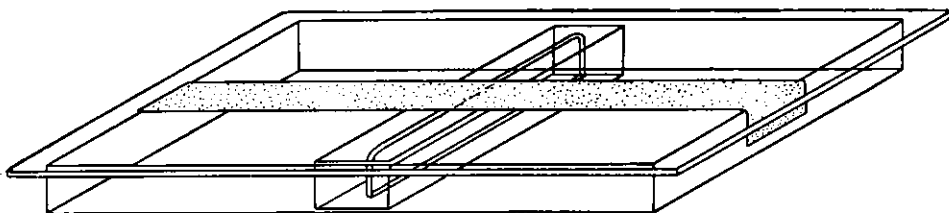
нии узких камер, верхний конец которых закрывают корковой пробкой, бумагу просто вкладывают в разрез пробки (рис. 49).

### Разделение с перетеканием

Для разделения с перетеканием следует применять более низкие камеры, так как растворитель, достигнув определенной высоты, перестает двигаться (см. стр. 62—63). Для отвода растворителя Сю предложил использовать стопку фильтровальной бумаги, заключенную между двумя пластинками. Фишбах и Левин оставляют выступающий наружу через отверстие в крышке верхний конец бумаги, так что растворитель испаряется сам по себе. Это испарение можно ускорить с помощью вентилятора или путем помещения камеры в вытяжной шкаф.

### ГОРИЗОНТАЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Этот способ разделения, за исключением круговой хроматографии, которую мы выделяем в самостоятельную главу, пока не приобрел практического значения и мало распространен. Каверау предложил мостиковый способ, при котором полоску бумаги натягивают между двумя прорезями в горизонтальной трубке. Эта трубка с помощью шлифов соединена



Р и с. 51. Устройство для горизонтальной хроматографии (Берлингоцци и сотрудники).

На каждой полоске бумаги можно хроматографировать по две пробы, так как растворитель подводится к середине полоски с помощью бумажного фитиля из ванночки, расположенной в середине сосуда.

с двумя колбами, одна из которых содержит подвижную фазу. Мередит и Сэммонз хроматографируют в стеклянной кювете, в которую вставлена рамка из стеклянных палочек. На эту рамку натянута полоска бумаги, согнутая в середине под углом  $180^\circ$ ; между обеими половинами бумаги остается просвет 2—3 см. Наиболее прост способ Берлингоцци и сотрудников, которые натягивают полоску бумаги, как и при электрофорезе на бумаге, горизонтально, но подводят растворитель к середине полоски. Анализируемое вещество наносят в нескольких сантиметрах от середины по обе ее стороны, поэтому на каждой полоске можно проводить по два анализа (рис. 51). Подобное расположение применял и Леонис, который помещал полосу бумаги на горизонтально натянутых в поперечном направлении полиамидных волокнах, а растворитель подводил лишь с одного конца бумажной полоски.

### СПИРАЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА

Цель этого метода заключается в уменьшении размера камер для нисходящей или восходящей хроматографии; кроме того, при спиральном методе должны устраняться нарушения, возникающие вследствие недостаточного или неравномерного насыщения высоких камер парами растворителей. Подобный способ впервые был применен Ма и Фонтэном, которые при восходящем разделении свертывали бумагу в виде спирали, а не в виде цилиндра. В настоящее время, однако, под понятием спиральной хроматографии подразумевают метод, в котором растворитель подводится в направлении, не параллельном оси спирали, а перпендикулярно ей. Поэтому такой метод нельзя отнести ни к одному из рассмотренных способов разделения, так как направление движения растворителя постоянно меняется. В качестве каркаса, на который навивается бумажная спираль, Шимек пользовался двумя спирально свернутыми стеклянными палочками. Большинство других авторов применяет наворачивание бумаги на спиральный лист — металлический (Олкок и Каннел) или из пластмассы (Барролье). Форма этих спиралей и камер для них показана на рис. 52.

Для разделения при помощи перетекания можно пользоваться способом, предложенным Эртелем. В отличие от описанных выше способов в этом случае вводят подвижную фазу в середину спирально свернутого листа, так что края бумаги могут выступать из камеры, благодаря чему происходит свободное испарение растворителя.

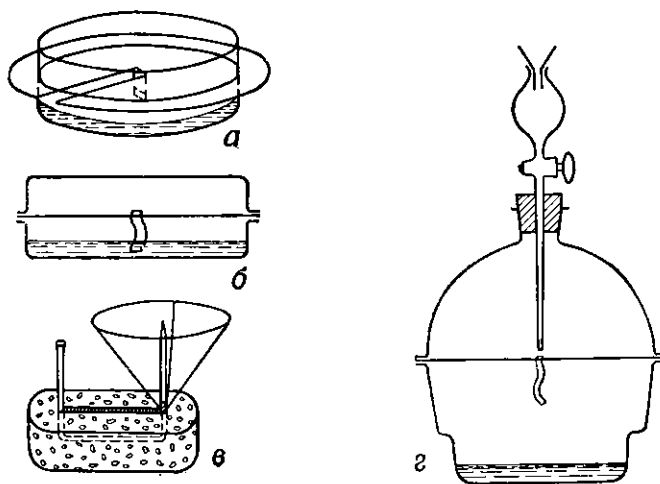
### КРУГОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Способ кругового разделения, в основе которого лежит размывание точки, нанесенной в центр, во все стороны, относится к наиболее старым способам анализа на бумаге. Можно считать, что впервые этот способ применил Рунге более ста лет назад, затем Грюсс и Трей (историю вопроса см. у Вейля). В хроматографии на бумаге в современном смысле слова метод кругового разделения был впервые предложен Раттером в 1948 г.

При круговом разделении бумагу помещают в горизонтальном положении, поэтому такой способ иногда рассматривают как метод с горизонтальным направлением потока. Отдельные разновидности метода отличаются способом подведения растворителя к центру бумажного диска. Из большого числа их мы рассмотрим лишь некоторые. В диске вырезают полосу от края до центра, затем отгибают ее к дну чашки, на которой лежит диск; через эту полосу всасывается растворитель для разделения. Однако, поскольку вырез в бумаге иногда может обусловить геометрические неправильности хроматограммы, другие авторы рекомендуют вставлять под центр бумажного кружка полосу бумаги, свернутую в виде фитиля, который служит для подачи растворителя со дна чашки (Гири и Рао [2]). В другой модификации, предложенной для хроматографии на бумаге Шимеком, применяется устройство, похожее на предложенное Треем в конце прошлого века: жидкость подводят в центр кружка системой сообщающихся сосудов. Кроме того, жидкость можно, разумеется, подводить снизу при помощи капилляра, меняя диаметр которого можно изменять и скорость истечения (Лакшминараян). Наконец, по способу Циммермана и Неринга [2] растворитель подается сверху в центр бумаги при помощи капельной воронки.

Из практических соображений мы подразделяем устройства для круговой хроматографии (как и при нисходящей хроматографии) на три группы в зависимости от размеров и назначения камеры.

1. *Камеры небольших размеров.* При этом наиболее простом способе, особенно удобном для проведения стандартных анализов, довольствуются двумя сложенными вместе чашками Петри. Между чашками натягивают диск фильтровальной бумаги и растворитель подводят со дна нижней чашки лучше всего при помощи фитиля. Размеры чашек Петри выбирают



Р и с. 53. Прибор для круговой хроматографии.

а — по Раттеру: подвижную фазу подводят снизу с помощью узкой полоски бумаги; б — по Гири: подвижную фазу подводит при помощи бумажного фитиля, вставленного в центр бумажного кружка; в — по Трею (капиллярный анализ): исследуемый раствор наливают в воронку; бумажный кружок помещают на проволоочный каркас, укрепленный на вертикальном колене U-образной трубки; U-образная трубка установлена в подставке из корковой пробки; г — по Циммерману: подвижную фазу подводят сверху, приливая по каплям из капельной воронки или из пипетки. Полезно также в центр бумажного кружка помещать бумажный фитиль для отвода случайного избытка жидкости с бумаги.

в зависимости от количества веществ в анализируемой пробе и значений  $R_f$ . Чаще всего пользуются чашками диаметром от 8 до 12 см (рис. 53а,б).

Лакшминараян описал специальную микрометодику, при которой количества веществ около 0,25  $\mu\text{г}$  разделяют круговым способом на бумаге размером  $4 \times 4$  см. При этом методе успех разделения зависит от нанесения малых объемов растворов (обычно 0,25  $\mu\text{л}$ ) и от подвода растворителя при помощи узких капилляров со дна камеры. По окончании разделения и проявления зоны наблюдают под микроскопом, помещая хроматограмму между предметным и покровным стеклом.

2. *Камеры больших размеров.* Для более полного разделения более сложных смесей пользуются эксикаторами, вкладывая бумагу между крышкой и основанием. Растворитель можно подводить либо сверху, как рекомендуют Циммерман и Неринг [2], либо с помощью фитиля снизу. Используют эксикаторы размером 20—30 см. При применении камер больших размеров уже могут иметь место неправильности в протекании жидкости, и, кроме того, разделение требует слишком много времени. Если же необходимо проводить разделение на более длинном пути, то начало хроматограммы следует сдвинуть к краю круга ( $R_{a0}$ ) и наносить пробы рядом друг с другом на стартовую линию в форме дуги. При этом способе раство-

ритель подводят с помощью фитиля к точке, расположенной между стартовой линией и краем круга.

3. *Камеры для препаративных целей.* Описание этих камер приводится в разделе препаративной хроматографии (см. стр. 210—212).

Неудобство первоначального способа заключалось в том, что на один бумажный кружок можно было наносить лишь одну пробу, и, следовательно, нельзя было проводить сравнение со стандартом. Прум и Войвод устранили это неудобство, введя секторную хроматографию: вместо нанесения пробы в центр круга несколько проб наносят по окружности диаметром 1—3 см, а растворитель подводят в центр этой окружности. Таким способом можно нанести до 8 проб, и после разделения и проявления вместо концентрических колец получаются секторы (см. рис. 134).

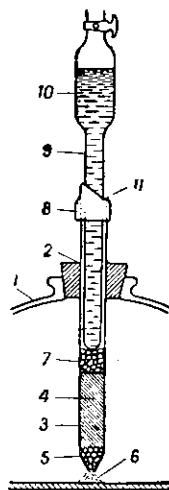
Для разделения с перетеканием можно пользоваться кружками бумаги, диаметр которых превышает диаметр камеры; на выступающей части бумаги происходит испарение растворителя (Карль).

### КОМБИНИРОВАННЫЕ СПОСОБЫ

Почти все способы, которые будут описаны, основаны на круговом разделении, которому предшествует грубое фракционирование путем быстрого разделения на полоске бумаги или на колонке. Этот тип разделения был предложен Маршалом и Миттвером, которые пользовались двумя секторами, соединенными узкой полоской бумаги. В центр нижнего сектора, погруженного нижним концом в подвижную фазу, наносили анализируемый раствор. При капиллярном проникновении растворителя на нижнем секторе происходило грубое фракционирование, а на следующем секторе анализируемые вещества были полностью разделены круговой хроматографией.

Р и с. 54. Прибор для предварительного фракционирования на колонке (Эрбринг и Патт).

Колонку укрепляют в крышке (1) эксикатора при помощи корковой пробки (2); 3 — трубка, в которой находится слой целлюлозы (4); ниже помещен слой ваты (5), выходящий из колонки снизу (6) и соприкасающийся с центром бумажного кружка. Над слоем целлюлозы помещен еще слой ваты (7); наверху колонки с помощью каучуковой трубки 8 укреплен автоматическая липетка (9), из которой на бумагу подается растворитель (10). В случае необходимости в колонку в точке 11 можно подавать воздух.



Идея Маршала и Миттвера была развита в двух направлениях. Швердт-фегер [1] предложил способ круговой хроматографии, в котором вместо фитиля под центр бумажного диска помещали стеклянную трубку, наполненную ватой. В нижнюю часть этой трубки помещали анализируемый раствор и одновременно через нее подвели к бумаге подвижную фазу. При этом в трубке с ватой происходило предварительное фракционирование, и в центр бумажного кружка поступала уже частично фракционированная смесь. Эрбринг и Патт и почти одновременно с ними Тешпель пользовались подобным же устройством (рис. 54), но с той разницей, что колонку с целлюлозой они помещали над бумажным кружком и предварительно фракционированную смесь вводили на бумагу сверху. При анализе твердых материалов, например лекарственного сырья, по Эрбрингу

и Патту, порошкообразный материал можно помещать непосредственно на целлюлозную колодку.

Приведенные методы, однако, позволяют исследовать лишь один образец на одном листе бумаги. Для серийных анализов Маттиас предложил остроумное решение. Пробу предварительно фракционируют на узкой полоске бумаги по способу Маршала и Миттвера и в дальнейшем производят круговое разделение на полоске (рис. 55). Разделение протекает более совершенно, нежели в других способах, как это видно из рис. 55. Этот способ напоминает восходящую хроматографию, и для него можно воспользоваться соответствующими приборами. Для серийных анализов до 100 проб Маттиас предложил рамку из стеклянных палочек, на которую натягивают отдельные полоски бумаги, и всю рамку вставляют в прямоугольный стеклянный сосуд (рис. 56). Подобный же способ примерно одновременно описали Швердтфегер и Гавгули.

### ПОВТОРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

К этой группе хроматографических методов мы относим все те способы разделения, при которых разделение повторяют как в том же направлении (повторная хроматография), так и в направлении, перпендикулярном первоначальному (двумерная хроматография). Сюда же мы относим и те случаи, когда пятна после первичного разделения переносят на другую бумагу и на ней проводят дальнейшее разделение.

### ПОВТОРНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Для повторного разделения пригодны методы с любым направлением движения подвижной фазы. Целью повторного разделения является более совершенное разделение особенно богатых компонентами смесей веществ. В зависимости от систем растворителей, применяемых при каждом однократном разделении, методы повторного разделения можно разбить на две группы.

#### Разделение с помощью многократного пропускания одной и той же системы растворителей

Этот метод применяют преимущественно для увеличения подвижности веществ с низкими значениями  $R_f$ , а также для лучшего разделения веществ с близкими значениями  $R_f$ , так как при повторном разделении длина пятна в направлении движения растворителя сокращается. Когда, следовательно, при вторичном и дальнейших разделениях фронт растворителя доходит до заднего края пятна, последний сдвигается вперед и длина пятна уменьшается (рис. 57).

Повторным разделением в последнее время пользуются часто, особенно в круговой хроматографии (рис. 58). Удобно применять его также и для препаративных целей, где резкая ограниченность зон имеет большое значение для элюирования пятен с бумаги (Гири [1]). Преимущество повторного разделения по сравнению с хроматографией с перетеканием состоит в том, что вещества с высокими значениями  $R_f$  не удаляются с бумаги, а в конце концов образуются концентрированные пятна, что особенно удобно для количественного анализа *in situ*. Определенное неудобство заключается в большей затрате активного рабочего времени по сравнению с разделе-

нием при перетекании. Для сокращения этого времени можно пользоваться способом Кейла, по которому при первом пропускании растворителя проводят разделение с перетеканием, и когда пятна распределяются по всей длине бумаги, концентрируют их, а также разделяют вещества с низкими значениями  $R_f$  двух-четырёхкратным дополнительным пропусканием растворителя.

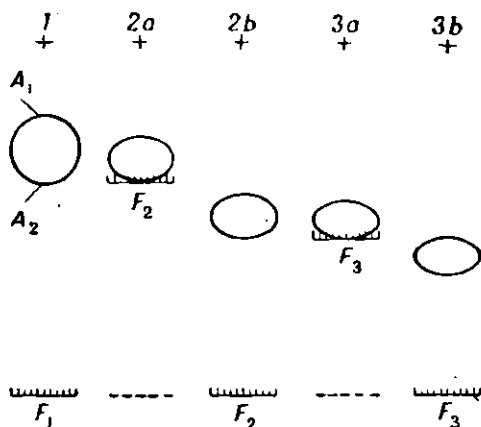


Рис. 57. Укорачивание пятен при повторном хроматографировании.

После первичного хроматографирования при повторном разделении точка  $A_1$  становится стартовой точкой ранее, нежели точка  $A_2$ , так как фронт растворителя доходит до нее раньше. В схеме не учтено влияние диффузии, несовершенство достижения равновесного состояния и градиент состава подвижной фазы.

### Разделение с помощью разных систем растворителей

Если необходимо разделить несколько веществ, из которых одни хорошо разделяются в одной системе, а другие — в другой, можно добиться их разделения, применяя различные системы при первом и при втором пропускании (см. рис. 217, а). Такой метод был применен для разделения основных аминокислот и пептидов (Северин и Федорова), порфиринов (Чу и сотрудники), неорганических веществ (Поллард и сотрудники) и др.

Особый случай повторного разделения представляет собой фракционированная хроматография, при которой системы растворителей выбирают так, чтобы при каждом пропускании со старта вымывались лишь некоторые из анализируемых веществ; эти вещества затем разделяют на бумаге обычным образом. По Мацеку и Ванечку [3] для подвижной фазы применяют растворители от наименее полярных до сильно полярных. Например, при анализе алкалоидов спорыньи, флуоресцирующих в ультрафиолетовом свете, сначала разделяют бензолом на бумаге, пропитанной формамидом. По окончании разделения обнаруживают в ультрафиолетовом свете разделившиеся алкалоиды эрготоксиновой группы и немедленно хроматографируют далее с помощью хлороформа. Последний вымывает со старта некоторые оксиалкиламины изолизергиновой кислоты, которые затем распределяются вдоль хроматограммы, тогда как алкалоиды эрготоксиновой группы вымываются вместе с фронтом растворителя. При третьем пропускании растворителя проводят разделение хлороформом с перетеканием, причем разделяются оставшиеся полярные алкалоиды, тогда как алкалоиды, разделенные при первом и втором пропускании, вымываются с бумаги. Разумеется, этим методом можно пользоваться лишь в тех случаях, когда обнаружение веществ возможно без химического проявления.

В тех случаях, когда для обнаружения веществ необходимо применять химические агенты, можно пользоваться способом, предложенным Кузиным и Саенко, которые после каждого пропускания растворителя обрезают перед проявлением бумагу вблизи стартовой линии, соединяли ее

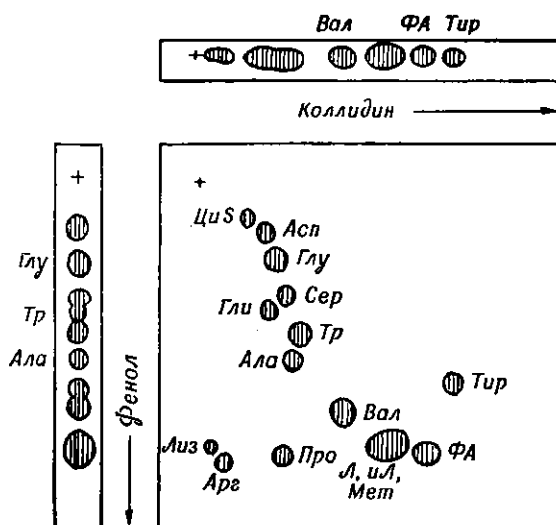
с новой полоской бумаги и проводили разделение с помощью нового растворителя. При круговой хроматографии они накладывали анализируемый образец на небольшой кусочек бумаги овальной формы, который затем помещали в центре кружка бумаги и пропускали через него ток растворителя. При каждом пропускании растворителя кружок бумаги заменяли свежим, а снятый проявляли.

### ДВУМЕРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Одно из основных преимуществ хроматографии на бумаге по сравнению с колоночной заключается в возможности двумерного разделения. Принцип его аналогичен повторному разделению. При двумерной хроматографии, однако, пользуются листами бумаги квадратной формы, в одном углу которых помещают исследуемую пробу, и повторное разделение проводят в направлении, перпендикулярном первоначальному (рис. 59). Значительная величина поверхности бумаги

Р и с. 59. Принцип двумерной хроматографии и применение этого метода для разделения сложных смесей.

Над соответствующими направлениями двумерной хроматограммы показано разделение аминокислот одномерной хроматографией в соответствующих системах растворителей. Как можно видеть, их разделение несовершенно, при двумерной же хроматографии они разделяются значительно лучше (за исключением лейцина, изолейцина и метионина).



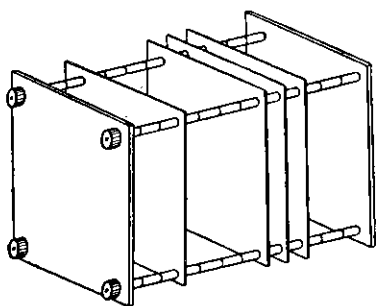
и движение пятен в двух направлениях способствуют более совершенному разделению, нежели при повторной хроматографии или других одномерных методах. Впервые двумерное разделение в капиллярном анализе применил Лизеганг, а в хроматографии на бумаге — независимо от него, годом позже, создатели метода хроматографии на бумаге Консен, Гордон и Мартин.

Для двумерной хроматографии можно в принципе пользоваться теми же камерами, какие были описаны в разделе о восходящей или нисходящей хроматографии. Конечно, ввиду большей поверхности бумаги при нисходящей хроматографии необходимы камеры большего размера. Для экономии места Ямагути и Гоуард рекомендовали проводить разделение в обычных камерах, беря вместо лодочки круглую чашку. На бумаге делают надрезы над линией старта так, чтобы ее можно было обернуть вокруг чашки.

Для большого числа двумерных хроматограмм удобно устройство, предложенное Датта с сотрудниками. Отдельные листы бумаги насаживают на четыре стержня, прочно укрепленные в двух металлических пластинках (рис. 60). Весь такой блок вставляют в камеру и хроматографируют восходящим способом. По окончании разделения блок вынимают, удаляют

растворитель в сушильном шкафу и немедленно проводят разделение в перпендикулярном направлении. При этом и проявление можно проводить в целом блоке, если необходимо погружать бумагу в реактив или действовать его парами.

В зависимости от применяемых систем растворителей способы двумерной хроматографии также можно разбить на две группы.

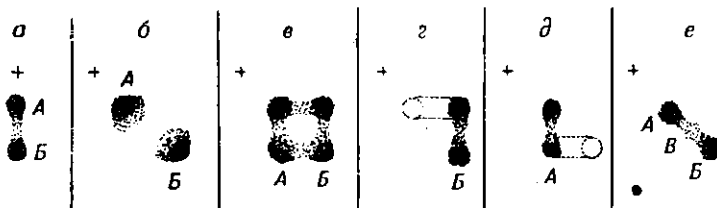


Р и с. 60. Рамка для серийной двумерной хроматографии (Датта).

Две металлические пластинки соединены четырьмя стержнями, на которых укрепляют листы хроматографической бумаги с нанесенными пробами. На стержни между каждыми двумя соседними листами надевают стеклянные кольца. В рамку можно поместить 12 листов бумаги размером  $20 \times 20$  см. По окончании первичного разделения всю раму вынимают из камеры, сушат, не развывая и, повернув на  $90^\circ$ , проводят разделение в поперечном направлении.

### Разделение с помощью одной и той же системы растворителей в обоих направлениях

Этим способом не удастся достичь более совершенного разделения, нежели, например, при повторном разделении. Тем не менее его можно использовать для подтверждения того, что пятна представляют собой индивидуальные вещества. В некоторых случаях, когда на хроматограмме возникают два пятна, нельзя решить, образуется ли второе пятно из первого лишь в процессе хроматографирования или присутствует другая форма того же вещества. Лишь с помощью двумерной хроматографии



Р и с. 61. Доказательство однородности или неоднородности вещества с помощью двумерной хроматографии в одной и той же системе.

*a* — одномерное разделение; *b* — два различных вещества; *в* — во время разделения протекает реакция  $A \rightleftharpoons B$ ; *г* — либо пятна при первичном разделении являются артефактом, не имеющим места при вторичном разделении, либо перед хроматографией или во время ее произошла реакция  $A \rightarrow B$ ; *д* — то же, что и в предыдущем случае, но в противоположном направлении; *е* — между пятнами *A* и *Б* находится пятно *В*.

с одной и той же системой растворителей удастся доказать, имеем ли мы дело с двумя разными веществами (рис. 61, б), с двумя формами одного и того же вещества (рис. 61, в) или, наконец, происходит превращение одной формы в другую в процессе хроматографирования (рис. 61 г, д).

К этой группе относятся также методы, в которых об идентичности какого-либо вещества судят на основании химической реакции, проведенной после первого пропускания растворителя; при применении одного и того же растворителя в обоих направлениях происходило бы диагональное перемещение. Вещества, которые изменятся при химическом воздей-

ствии, например при окислении, будут отклоняться от этой диагонали (Бреннер и сотрудники, Микеш и Голейшовский). Пример обнаружения метионина показан на рис. 62. Подобным же способом пользовались Свободова и сотрудники для исследования генетической связи веществ (см. стр. 611, рис. 228).

### Разделение с различными системами растворителей

В этом наиболее часто встречающемся случае всегда выбирают такие две системы, в которых исследуемые вещества по возможности должны давать различное чередование пятен. Очередность применения растворителей устанавливают на опыте; во втором направлении деление обычно бывает более совершенным, нежели в первом. Если растворитель после первого пропускания удален неполностью, течение во втором направлении обычно сопровождается неправильностями. Нарушающее действие оказывает также неравномерная увлажненность бумаги. Следовательно, ту часть, где находился фронт первого растворителя (содержащую обычно вымытые из бумаги липоидные вещества), в том случае, если анализируемые вещества не перемещаются вместе с фронтом, лучше отрезать.

### ПЕРЕНОС ПЯТЕН НА ДРУГУЮ ХРОМАТОГРАММУ

Этот метод по своим результатам приближается к двумерной хроматографии, но с тем отличием, что при его применении можно пользоваться камерами для одномерной хроматографии. Исследуемый раствор подвергают разделению в одном направлении и, основываясь на флуоресценции, а в случае нефлуоресцирующих веществ — на результатах проявления контрольной полоски, вырезают одно или несколько сливающихся пятен. Эти пятна прикрепляют затем к другим одномерным хроматограммам и разделяют с помощью другого растворителя. Метод был предложен Деккером с сотрудниками; различные видоизменения этого метода отличаются главным образом способом прикрепления пятен к вторичной хроматограмме. Шлегль и Зигель прикладывают вырезанные пятна к стартовой линии новой полоски, зажимают между двумя стеклами и скрепляют резинкой. Уинтерингэм [1] пришивает пятно над стартом новой хроматограммы так, чтобы бумага от старой полоски служила для подвода растворителя. Деккер с сотрудниками пришивают пятно первичной хроматограммы в месте старта двумерной хроматограммы; отсюда этот способ получил название многомерной хроматографии. Аналогичные способы, в которых, однако, вещества элюируют из пятен, полученных при первом пропускании растворителя, описаны в разделе, посвященном вымыванию пятен (стр. 177).

### РАЗЛИЧНЫЕ СПЕЦИАЛЬНЫЕ СПОСОБЫ

#### АТМОСФЕРА КАМЕРЫ

В некоторых случаях необходимо, чтобы камера была наполнена не воздухом, а каким-либо другим газом или воздухом под давлением, отличающимся от атмосферного. Окись углерода или светильный газ нередко вводят в камеру для того, чтобы подавить неблагоприятное

каталитическое действие тяжелых металлов. В случае разделения легко окисляющихся веществ иногда удобнее полностью удалить воздух из камеры и проводить процесс в атмосфере инертного газа. Шамрай сконструировал для этого случая специальную камеру, позволяющую проводить все операции от нанесения пробы до конца разделения в токе водорода, не открывая камеры (рис. 63).

Для разделения при повышенном или пониженном давлении можно применять совершенно герметичные камеры (Вольфсон

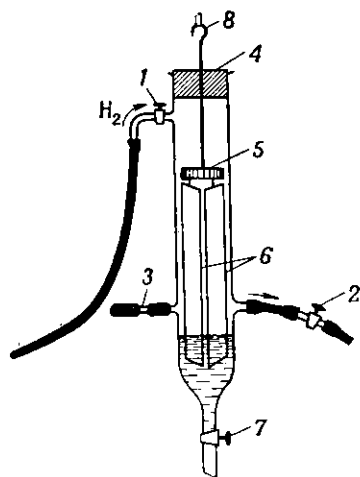


Рис. 63. Камера для хроматографии в атмосфере инертного газа (Шамрай).

1 — кран для подвода инертного газа (водород); 2 — трубка для откачивания с помощью масляного насоса; 3 — пипетка для нанесения пробы на бумагу без открывания камеры; 4 — каучуковая пробка; 5 — подвесной диск для укрепления полоски бумаги (6); 7 — кран для слива растворителя; 8 — подвижный шарнир для погружения бумаги в подвижную фазу.

и сотрудники или Уинтерингэм и сотрудники [2]) (рис. 233). Разделением при разрежении иногда пользуются, если необходимо мгновенное насыщение камеры.

О влиянии растворителей, применяемых для насыщения камеры, см. стр. 112.

#### РЕГУЛИРОВАНИЕ СКОРОСТИ ДВИЖЕНИЯ РАСТВОРИТЕЛЯ

Скорость перемещения подвижной фазы по бумаге оказывает весьма существенное влияние на качество разделения исследуемых веществ. Обычно указывают, что более медленное движение обеспечивает более совершенное разделение (Ирреверр и Мартин). Скорость движения определяется преимущественно вязкостью смеси растворителей, затем плотностью фильтровальной бумаги; кроме того, имеют значение летучесть растворителей, содержащихся в подвижной фазе, степень насыщенности атмосферы камеры и направление движения подвижной фазы. Помимо этих факторов, которые иногда нельзя произвольно изменять, имеется еще ряд возможностей.

При нисходящей хроматографии можно ускорить ток растворителя, нашивая над стартовой линией хроматограммы полоски бумаги. Для замедления тока можно между линией старта и поверхностью растворителя прорезать отверстия или сузить полоску бумаги, служащую для подвода подвижной фазы.

При круговой хроматографии регулировать скорости потока легче. В способе Раттера эту скорость можно изменять в зависимости от толщины фитиля, подводящего растворитель; регулирование легко осуществляется при подаче растворителя сверху. В комбинированных методах скорость регулируют, сужая бумагу (Маттиас) или делая в ней прорезы (Швердтфегер [2], Гангули [1]).

## МЕТОД ДВУХ СТЕКОЛ

Хроматографическое разделение между двумя стеклами до настоящего времени не получило широкого распространения, хотя, казалось бы, оно обладает рядом преимуществ в отношении продолжительности

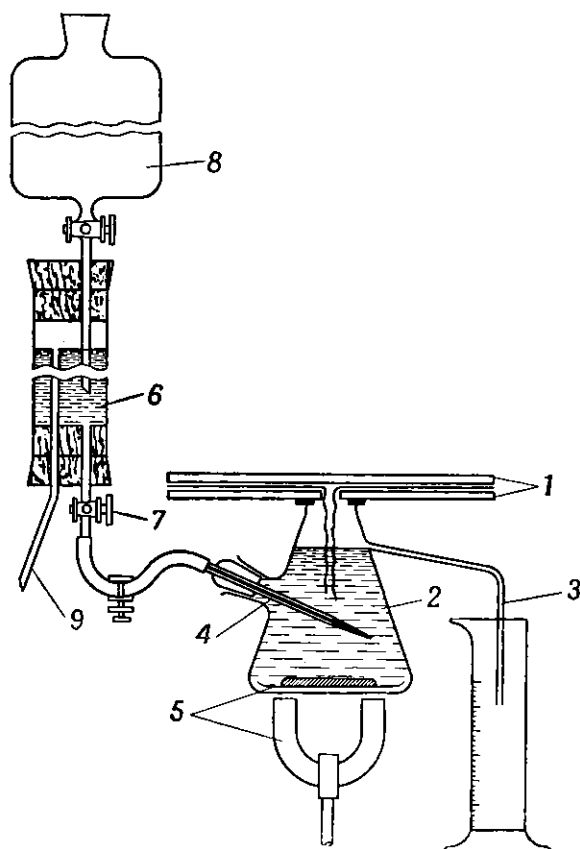


Рис. 64. Прибор для градиентного разделения при круговой хроматографии (Франк). Кружок бумаги (или две полоски для одномерной хроматографии) помещают между двумя стеклянными пластинками (1); нижняя пластинка в центре снабжена отверстием диаметром около 12 мм. Пластинки помещают в горизонтальном положении на колбе 2 емкостью около 100 мл, в которой находится подвижная фаза. Колба снабжена двумя боковыми отводами; отвод 3, находящийся выше уровня 100 мл, имеет диаметр около 5 мм и служит для слива избыточного растворителя. Тубус 4 служит для подачи подвижной фазы; 5 — магнитная мешалка; 6 — резервуар для растворителя с постоянным уровнем, соединенный с колбой 2 краном 7 и каучуковой трубкой; 8 — делительная воронка емкостью около 500 мл, содержащая растворитель для разбавления; 9 — сливная трубка.

службы прибора, экономии места и особенно возможности разделения летучих веществ. Неудобством являются поверхностные явления на границе влажной бумаги и стекла, которые могут оказывать нежелательное действие. Разделение между стеклами применили Мюллер и Клегг [1] при автоматической хроматографии (см. ниже), а также Гудечек при горизонтальной хроматографии фенолов (стр. 304). В способе Гудечека поверхностные явления не вызывали нарушений, так как автор пользовался безводными системами. В круговой хроматографии метод между двумя стеклами применял Штарке, который подводил растворитель через отверстие

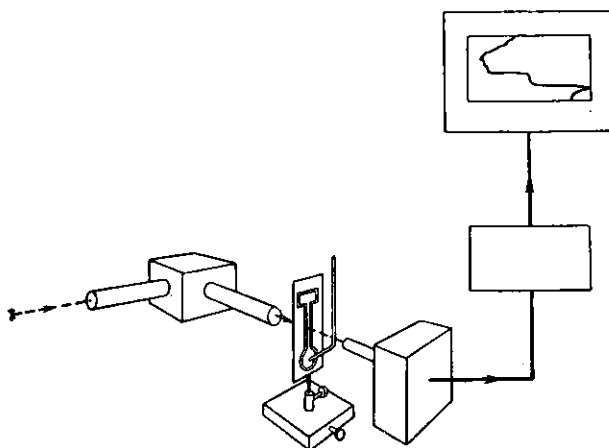
в верхнем стекле, в которое была вставлена стеклянная трубочка, содержащая порошок целлюлозы и исследуемый образец (аналогично методу Тепеля). См. также рис. 64.

### ГРАДИЕНТНАЯ ЭЛЮЦИЯ

В некоторых случаях лучшее разделение исследуемых веществ можно осуществить при непрерывном изменении состава системы растворителей (градиентное разделение). Более подробно градиентные явления при хроматографии на бумаге обсуждаются на стр. 59. Этот метод, который уже довольно давно применяется в колоночной хроматографии (см. стр. 57), Ледерер использовал в хроматографии на бумаге для лучшего разделения неорганических катионов, а Франкс — для разделения высших жирных кислот. Для разделения следует применять несколько видоизмененные камеры. Ледерер, например, применял камеру для восходящей хроматографии и сверху подавал по каплям растворитель, изменявший состав системы; на дно была помещена магнитная мешалка для непрерывного перемешивания раствора. Франкс при горизонтальной хроматографии подводил растворитель со стороны сосуда, содержавшего подвижную фазу, которая подавалась на бумагу снизу, и разделение проводилось между двумя стеклами (рис. 64).

### АВТОМАТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Во всех описанных способах хроматограмму просматривают обычно после окончания разделения. В принципе концентрация разделяемых



Р и с. 65. Автоматическая хроматография (Мюллер и Клегг).

На хроматографическую бумагу с помощью штемпелька, смоченного парафином, наносят пробу (на рисунке — контур в виде буквы Т). Пробу наносят на нижнюю часть бумаги с тыльной (считая от плоскости чертежа) стороны. Изменение пропускания светового луча бумагой в процессе разделения фиксируют фотозаписывающим элементом, ток из которого поступает в усилитель и автоматически записывается, как функция времени (график для смеси красителей показан справа сверху).

веществ рассматривается как функция расстояния. Мюллер и Клегг [1] описали еще один принцип. Они наблюдали для определенной точки хроматограммы изменение концентрации во времени, обна-

руживаемое по степени пропускания света. Пучок лучей устанавливался на каком-либо месте хроматограммы, и интенсивность проходящего света отмечалась фотоэлементом и записывалась как функция времени. Момент прохождения более сильно светопоглощающей зоны через данный участок записывался на ленте как максимум. Удобство метода, по утверждению авторов, заключается в быстроте. До некоторой степени ему родственна проточная хроматография с непрерывным полярографическим контролем (см. стр. 191).

### ПРОТИВОТОЧНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Интересный способ предложил Дуст-Блази с сотрудниками, проводивший разделение одновременно одной фазой восходящим, а другой — нисходящим способом. Исследуемый образец был при этом нанесен в середине листа. Здесь, следовательно, имело место противоточное разделение, аналогичное противоточному распределению по Крэйгу с двусторонним отбором. Способ этот, предложенный для разделения липоидов, не получил, однако, дальнейшего применения.

### ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ АВТОМАТИЧЕСКИЕ УСТРОЙСТВА

Определенное неудобство некоторых систем состоит в том, что время их прохождения по бумаге нельзя оценить заранее, поэтому возникает необходимость часто проверять удаленность фронта растворителя от края хроматограммы. Для некоторых систем скорость продвижения оказывается такой, что разделение приходится начинать или заканчивать ночью. Некоторые авторы пытались устранить этот недостаток, konstruiруя вспомогательные автоматические устройства. Для того чтобы не было необходимости постоянно следить за фронтом растворителя (особенно при повторном разделении до одной и той же линии), по Хедену можно пользоваться двумя электродами, укрепляемыми на краю хроматограммы на том уровне, до которого должен дойти фронт растворителя. При разделении с помощью водных систем по достижении этого уровня замыкается цепь тока, что можно связать, например, со звуковой сигнализацией.

Хасбанд предложил для автоматического пуска хроматографирующего прибора устройство, состоящее из часового механизма и резервуара, соединенного с лодочкой для подвижной фазы. В определенный момент подвижная фаза подавалась из резервуара в лодочку и начиналось разделение.

Сравнительно более сложно устройство, предложенное Матту и Комуцци, которые автоматизировали не только старт, но и прекращение разделения. Принцип этого устройства основан на том, что при восходящей хроматографии полосы бумаги укрепляют в держателях, опусканием которых начинают разделение, а подъемом — прерывают его в любое заданное время.

### СРАВНЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ СПОСОБОВ

Перед обсуждением достоинств и недостатков отдельных методов необходимо подчеркнуть, что видоизменения обычно не оказывают существенного влияния на качество разделения. Значительное число моди-

фикаций во многих случаях обусловлено простотой самого метода хроматографии на бумаге, позволяющего часто обходиться любыми подручными средствами.

Мы попытаемся оценить отдельные методы с точки зрения качества полученной хроматограммы. Как стандартный метод для обычной лабораторной работы следует рекомендовать нисходящую хроматографию. Удобство по сравнению с восходящим методом заключается в том, что разделение можно вести на отбосительно более длинных хроматограммах. Восходящее же разделение ограничено величиной капиллярных сил, которые должны противодействовать силе земного тяготения. По достижении высоты фронта растворителя 20 см скорость подъема по бумаге уже резко понижается. Во многих случаях верхняя часть камеры (а также район фронта) оказывается недостаточно насыщенной, поэтому может произойти слияние пятен и фронта. Скорость продвижения при капиллярном подъеме, а также высота подъема были теоретически рассмотрены рядом авторов (Мюллер и Клегг [2], Каукабани и Кассиди; см. также стр. 62). В сравнении с круговой хроматографией нисходящее и восходящее разделение обладают тем преимуществом, что допускают возможность двумерного хроматографирования. Круговая модификация двумерной хроматографии по Айрану пока еще не имеет никаких преимуществ по сравнению с обычной круговой хроматографией. Равным же образом для количественных или препаративных целей нисходящая и восходящая разновидности хроматографии оказываются более удобными.

Для некоторых целей количественного разделения, особенно для разделения веществ с близкими значениями  $R_f$ , круговой способ удобнее, так как дает более резко разграниченные зоны. Удобство этого способа становится особенно очевидным тогда, когда необходимо определить значительное количество одного вещества наряду с малым количеством другого. Преимуществом кругового метода является также и его быстрота.

Для идентификации веществ с низкими значениями  $R_f$  можно хроматографировать с перетеканием или повторно. Оба способа обладают как преимуществами, так и недостатками. Преимуществом первого является меньшее время, необходимое для анализа, и меньшие требования к активной рабочей нагрузке. Преимущество повторного разделения состоит в образовании более концентрированных пятен, что имеет значение в особенности для разделения, а также количественной оценки веществ с близкими значениями  $R_f$ ; далее, удобство метода состоит в том, что ни одно вещество с высоким значением  $R_f$  не выходит за пределы бумаги. В некоторых случаях выгодной оказывается комбинация обоих способов (см. стр. 133). Соотношение нормальных величин  $R_f$  при однократном пропускании растворителя и величин  $\bar{R}_f$  при повторном хроматографировании при  $n$ -ом пропускании изучали Джинз и сотрудники, которые вывели соотношение

$$\bar{R}_f = 1 - (1 - R_f)^n. \quad (32)$$

В любом случае повторное хроматографирование в круговом методе и в восходящей хроматографии оказывается более выгодным, нежели разделение с перетеканием.

Здесь необходимо также обратить внимание на соотношение между величинами  $R_f$ , измеренными при различных способах разделения. Помимо прочих факторов, упоминаемых на стр. 143—149, важных для получения воспроизводимых величин  $R_f$ , мы подчеркиваем особую роль насыщения камеры, которое главным образом в круговом и восходящем методах

не оказывается столь же совершенным, как при нисходящем методе (Бурма и Чакраборти [3]). Если, однако, камера достаточно насыщена парами обеих фаз растворителей, то воспроизводимые величины можно получить не только при восходящем и нисходящем методах, но и при круговом разделении (Сайфер и Орескес; Бурма и Чакраборти [3]). Величины  $R_f$  при восходящем и нисходящем методах в общем практически не отличаются; по крайней мере различиями в большинстве случаев можно пренебречь. Однако между величиной  $R_f$  в этих способах и величиной  $R_f$  в круговом методе разница оказывается существенной. Чакраборти и Бурма провели интересный опыт; они вырезали из кружка бумаги крест, т. е. проводили разделение на бумаге, форма которой приближалась к форме полосы. Они установили, что величины  $R_f$ , полученные при этом, полностью соответствуют величинам  $R_f$  при нисходящем разделении. При постепенном расширении концов такого креста значения  $R_f$  возрастали до наивысших значений, получаемых при круговой хроматографии. Теоретически это явление рассмотрели Лестранж и Мюллер, которые показали, что величины  $R_f$  при хроматографии на полосах равняются квадрату величин  $R_f$  при круговой хроматографии, которые авторы обозначали  $R_R$ :

$$R_f = R_R^2. \quad (33)$$

Это соотношение Гангули [2] подтвердил обширным экспериментальным материалом.

## Положение и форма пятен

И. М. Хайс

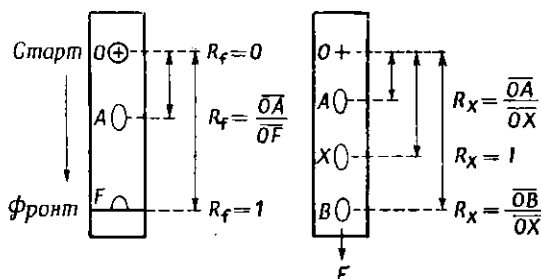
Хроматографию на бумаге применяют для доказательства присутствия веществ в смесях и для их идентификации. Разумеется, сама по себе хроматографическая идентификация далеко не может считаться точной. Ее можно приблизить к достоверности, проводя разделение в нескольких системах растворителей. В тех случаях, когда надежность доказательства особенно важна, результаты хроматографии на бумаге дополняют данными, полученными с помощью других физико-химических способов.

При идентификации руководствуются двумя главными принципами: во-первых, специфичными реакциями проявления, во-вторых, положением (и до некоторой степени формой) пятен. Положение пятен обычно характеризуют коэффициентом  $R_f$ .

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИЗМЕРЕНИЕ $R_f$

Величина  $R_f$  представляет собой расстояние пятна вещества  $A$  от линии старта, выраженное в долях расстояния фронта растворителя ( $F$ ) от линии старта ( $O$ ); следовательно,  $R_f = OA/OF$ . Если не оговорено особо, всегда измеряют расстояние до центра пятна. Но иногда расстояние  $OA$  отсчитывают до переднего края пятна или до места наивысшей концентрации вещества в пятне; обычно так поступают в том случае, если эти точки оказываются резко выраженными и менее зависящими от количества вещества

в пятне, чем положение центра пятна. Представление о качестве разделения можно составить, сопоставляя значения  $R_f$  для переднего и заднего



Р и с. 66. Понятия величин  $R_f$  (слева) и  $R_r$  (справа).

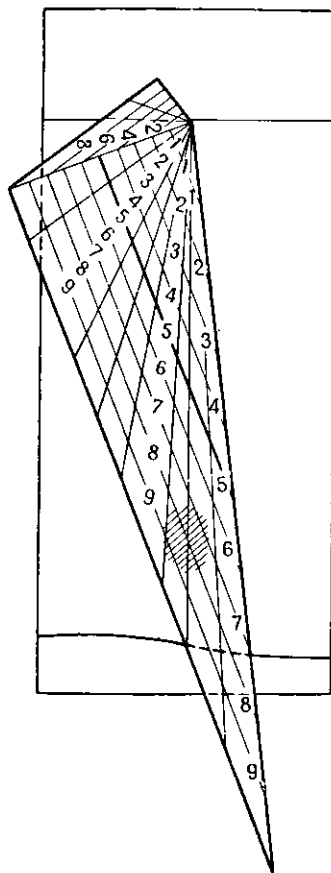
края пятна. Из самого определения  $R_f$  следует, что его значение составляет величину больше нуля и меньше единицы. С величинами  $R_f$  больше единицы можно встретиться лишь в исключительных случаях, именно тогда, когда смесь растворителей образует два фронта и для расчета  $R_f$  берут фронт, ближайший к старту.

Зависимость между значением  $R_f$  и коэффициентом распределения вещества  $\alpha$  при распределительной хроматографии дается уравнением [15] на стр. 53. Обсуждение того обстоятельства, оправдывается или нет предположение о распределительном механизме при хроматографии органических и неорганических веществ на бумаге, приводится на стр. 73 и 670. Зависимость между величинами  $R_f$  при одномерной (нисходящей и восходящей) хроматографии и при круговой хроматографии см. на стр. 142 [уравнение (33)].

Для более быстрого вычисления значений  $R_f$  на хроматограммах были предложены различные приспособления, например прозрачная разграфленная трафаретка («партогрид», Рокланд и Дани [3], рис. 67), каучуковая лента с масштабом (Филлипс) и др.

Р и с. 67. Прибор для непосредственного отсчета значений  $R_f$  (модификация «партогрида» Рокланда и Данина).

Нулевую точку прозрачного треугольника накладывают на стартовую точку хроматограммы, располагая его так, чтобы ось хроматограммы пересеклась с фронтом растворителя. В показанном на рисунке случае пятно имеет  $R_f$  0,8.



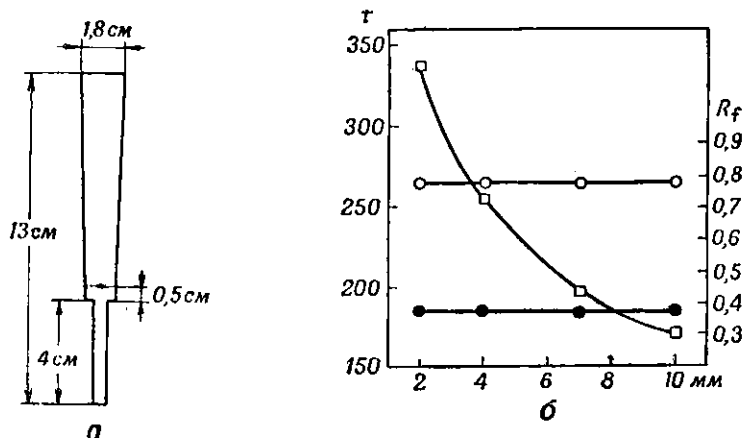
## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ВЕЛИЧИНУ $R_f$

Уже создатели распределительной хроматографии аминокислот на бумаге (Консен с сотрудниками) указывали на семь факторов, обуславливающих различия в величинах  $R_f$  при применении одной и той же системы.

растворителей. Такими факторами являются сорт бумаги, температура, объем пробы, примеси в пробе, степень насыщения водой, способ подачи растворителя и расстояние между стартовой линией и источником растворителя.

### Бумага и скорость продвижения растворителя

Толщина бумаги, размеры пор, предшествующее набухание и степень чистоты оказывают вполне понятное влияние на соотношение между содержанием в бумаге неподвижной и подвижной фаз, а тем самым также на величину  $R_f$ . Для более плотных бумаг наблюдаются более низкие значения  $R_f$ . Так как по этим бумагам растворители продвигаются медленно, то некоторые исследователи (Циммерман [1]) полагали, что здесь имеет место прямое влияние скорости продвижения на величину  $R_f$ . Однако



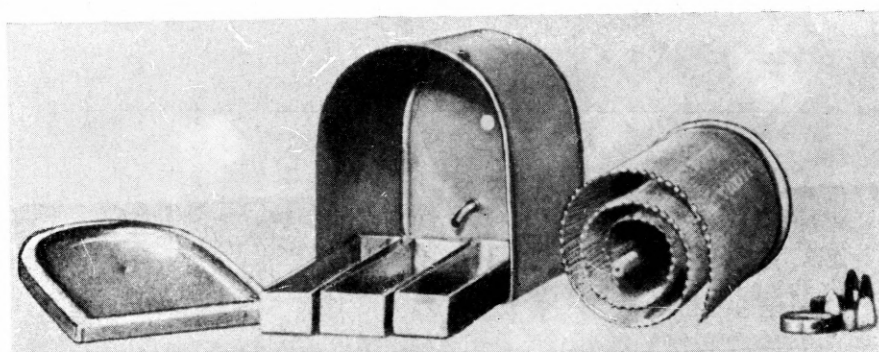
Р и с. 68. Влияние замедления тока подвижной фазы на значения  $R_f$  аминокислот (Каукабани и Кассиди).

а — полоска бумаги, применяемая для замедления тока подвижной фазы через бумагу (ток можно замедлить, сужая нижнюю часть бумаги).

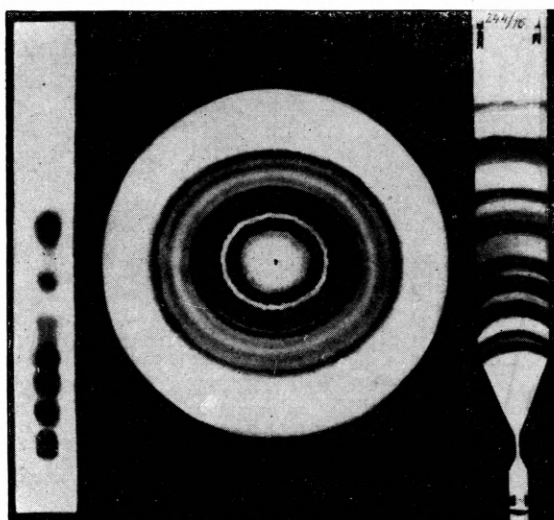
б — система—80%-ный фенол. □ время (в минутах), необходимое для того, чтобы растворитель поднялся на высоту 11,4 см ( $t$ , левая шкала), уменьшается, если увеличивается ширина полоски (ось абсцисс). Значения  $R_f$  (правая шкала) гликокола (●) и валина (○) остаются при этом постоянными.

Каукабани и Кассиди показали, что величина  $R_f$  остается неизменной, если скорость продвижения уменьшать не изменением сорта бумаги, а путем сужения полосы бумаги между сосудом с растворителем и началом собственно хроматограммы (рис. 68, а, б). Относительное повышение значения  $R_f$  у «быстрых» бумаг авторы объясняют их большей пористостью и, следовательно, меньшим содержанием целлюлозы и меньшей активной поверхностью для удерживания неподвижной (водной) фазы на единицу объема бумаги, причем они удерживают достаточное количество подвижной фазы. На ускорение продвижения и повышение величины  $R_f$  аминокислот после промывания бумаги соляной кислотой указал Прохазка.

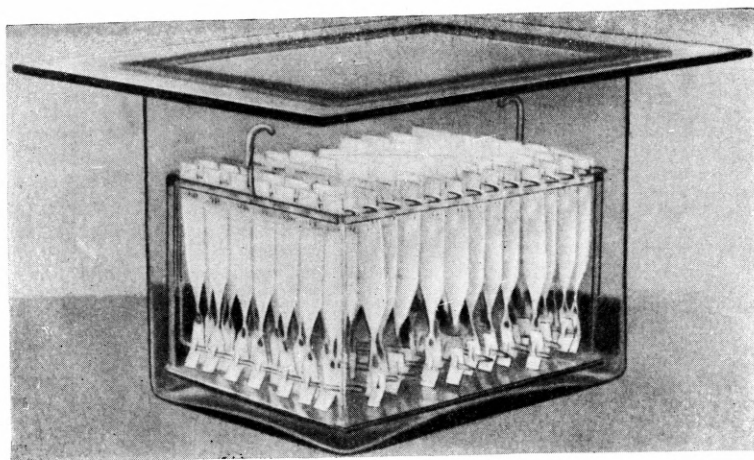
Погрешности при изготовлении, промывании и сушке бумаги могут обусловить колебания скорости продвижения и величин  $R_f$  одинаковых проб на одном и том же листе бумаги. Одна и та же марка бумаги не всегда обладает точно одинаковыми свойствами, особенно из разных партий или при неодинаковом хранении.



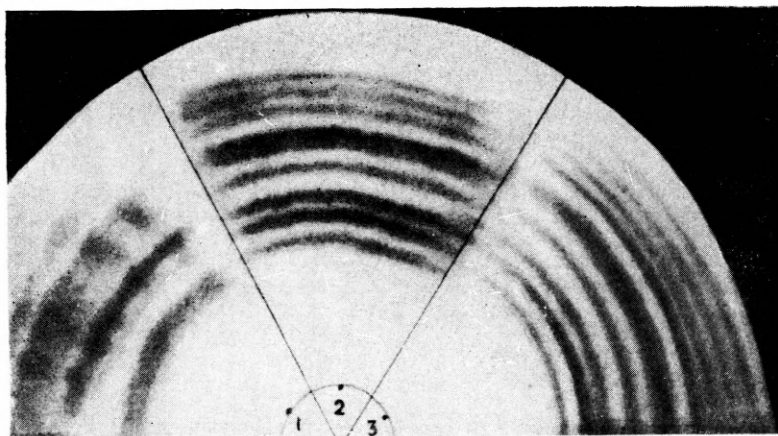
Р и с. 52. Прибор для спиральной хроматографии (Оллок и Каннел).



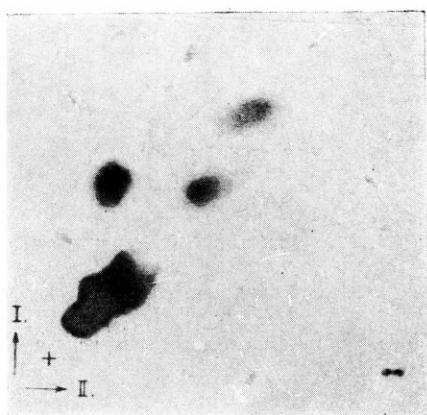
Р и с. 55. Сравнение различных способов разделения (Маттиас).  
Хроматография белкового гидролизата в системе *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5). Слева — восходящая, в центре — круговая хроматография, справа — разделение по Маттиасу.



Р и с. 56. Прибор для серийной хроматографии (до 100 проб) (по Маттиасу).

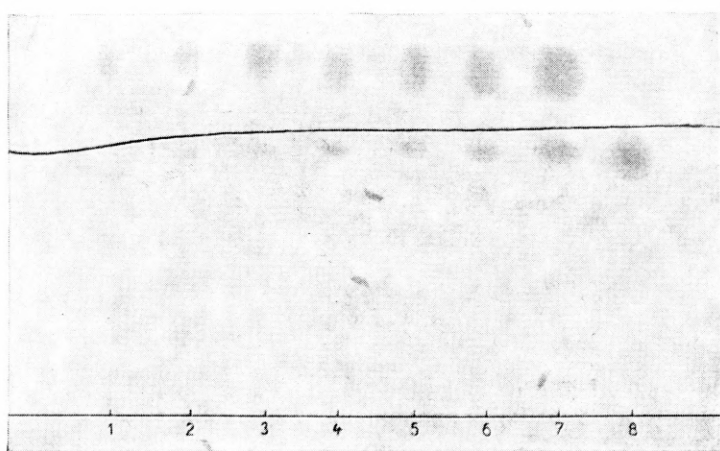


Р и с. 58. Повторное разделение при круговой хроматографии (Гири и сотрудники). Проба была нанесена сначала в точку 3, после первичного разделения — в точку 2 и после вторичного — в точку 1. Следовательно, проба из точки 1 была подвергнута однократному, из точки 2—двукратному и из точки 3 — трехкратному разделению.



Р и с. 62. Диагональная хроматография (Микеш и Голейшовский).

Разделение проводилось в приборе Датта на малых листах фильтровальной бумаги. В обоих направлениях пользовались системой *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Между первичным и вторичным разделением проведено окисление надмуравьиной кислотой в газовой фазе. Метионин и пептиды, содержащие метионин, при вторичном разделении отклонились от диагонали, на которой находятся пятна прочих аминокислот.



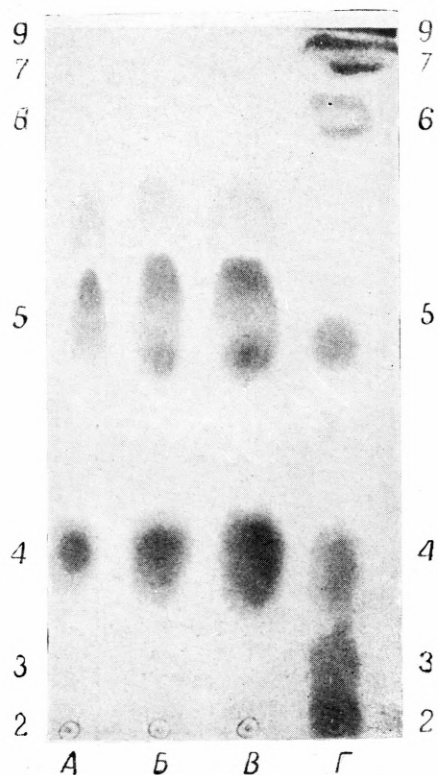
Р и с. 75. Возникновение двойных пятен в системах, содержащих соляную кислоту (Вацек).

Система изобутанол—26%-ная соляная кислота—вода (100 : 15 : 27). На стартовую линию хроматограммы нанесена *n*-аминобензойная кислота в возрастающих количествах от 0,5  $\mu$ г до 4,5  $\mu$ г (1—8). При концентрации 0,5  $\mu$ г заметно лишь одно пятно *n*-аминобензойной кислоты с высшим значением  $R_f$ , при 4,5  $\mu$ г — одно пятно с низшим значением  $R_f$ . Во всех других случаях образуется два пятна. При повышении содержания соляной кислоты в этой же системе удвоения пятен не наблюдается и остаются лишь пятна с низшим значением  $R_f$ .



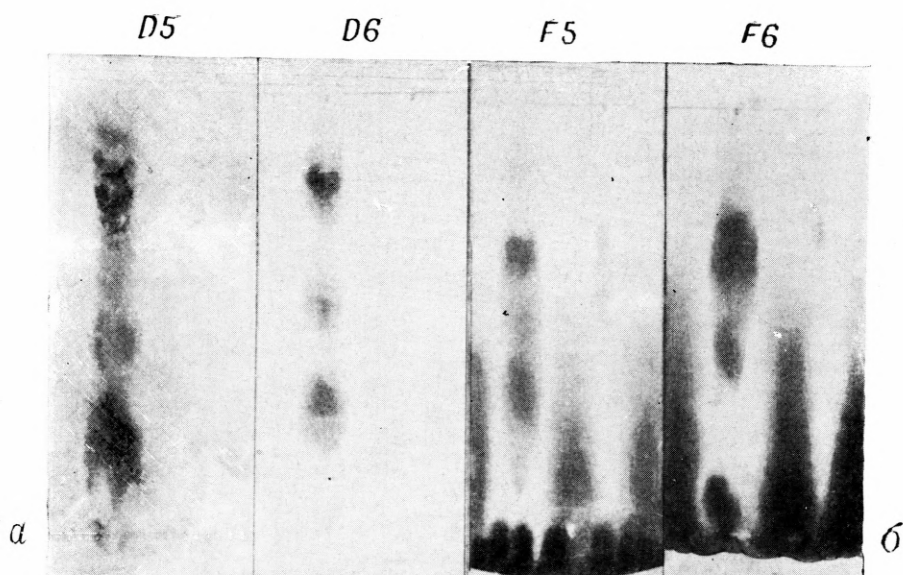
Р и с. 76. Пример образования отстающих теней (Мацек и Тадра).

Система *n*-бутанол—пропионовая кислота—вода (10 : 5 : 7), нисходящий метод. Проявление: кислый фталат анилина (Д31). 1—5-кетоглюконовая кислота; 2—2-кетоглюконовая кислота+глюкоза+5-кетоглюконовая кислота (от старта к фронту); 3—2-кетоглюконовая кислота; 4—2- и 5-кетоглюконовые кислоты. При замене пропионовой кислотой образование отстающих теней подавляется.



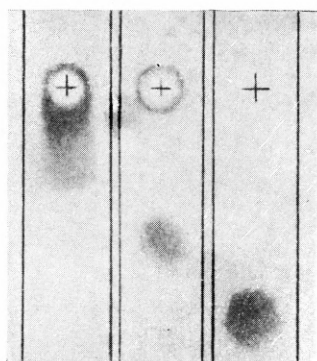
Р и с. 77. Образование «быстрых теней» (Томпсон).

Система бензол—уксусная кислота—вода, восходящий метод. Проявление: соли железа (III) (Д53). А — смесь гидроксаматов жирных кислот с 2—9 атомами углерода; Б, В, Г — различные количества кислот с 5 и 4 атомами углерода. Образование «быстрых теней» приписывается влиянию загрязнений в бумаге.



Р и с. 78. Влияние присутствия железа в бумаге на почернение фенола в присутствии аммиака (Коноп).

Система фенол — вода. Хроматографирована смесь аминокислот. *D5* и *D6* — опытные образцы бумаги в исходном состоянии, *F5* и *F6* — те же образцы, промытые раствором соляной и плавиковой кислот и дистиллированной водой, содержащими следы железа. На этой бумаге часть аминокислот превратилась в комплексы, дававшие с нингидрином красное окрашивание.



Р и с. 79. Влияние загрязнений в бумаге на хроматографическое поведение сложных эфиров фосфорной кислоты (Хейнс и Ишервуд).

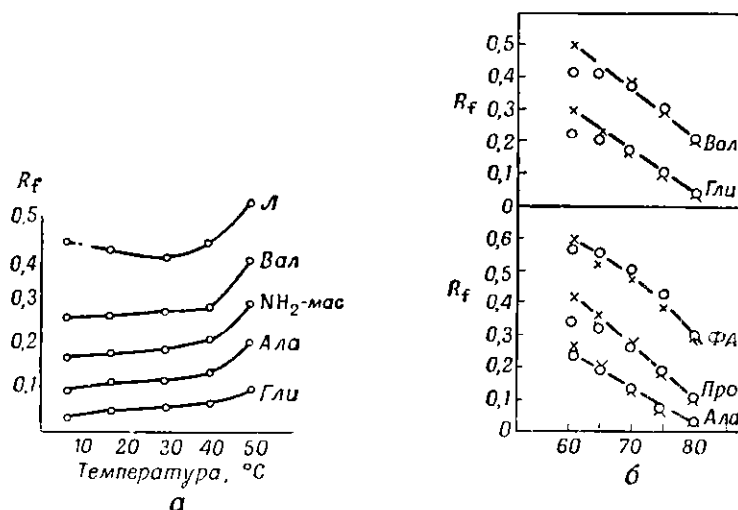
Система: *n*-пропанол—аммиак—вода (6 : 3 : 1). На линию старта нанесен глюкозо-1-фосфат. Слева направо: бумага ватман 1, бумага ватман 54 (промытая при изготовлении кислотой), бумага ватман 1, промытая в лаборатории 0,1 н. HCl, затем дистиллированной водой.



Р и с. 80. Хроматографическое поведение значительного количества малорастворимого вещества (Хайс). Система: *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5). Проявление нингидрином. На линию старта нанесены 12, 300 и 900  $\mu$ г тирозина. Пятно тирозина для больших количеств имело бледную середину, сероватую полосу от линии старта и интенсивно фиолетовую кайму. В месте, обозначенном  $\leftarrow \hat{c} \rightarrow$ , оттенок слегка красноватый. Опрыскивание бромфеноловым синим показало, что кислота находится в области  $\leftarrow \hat{c} \rightarrow$  у всех трех образцов, а у образцов 300 и 900  $\mu$ г — от  $\hat{c}$  до фронта пятно занимает всю поверхность, дающую положительную реакцию с нингидрином.

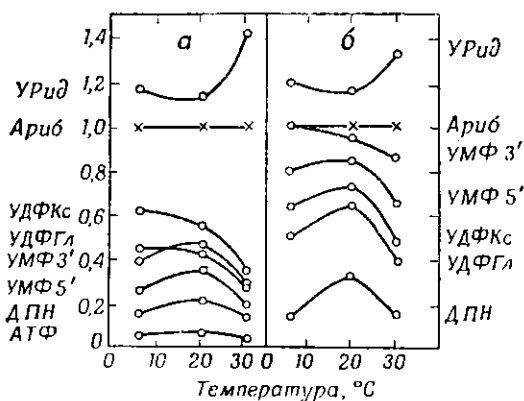
## Температура

Температура оказывает влияние на величину поперечного сечения фаз, их состав, коэффициент распределения и на адсорбцию, а следо-



Р и с. 69. Влияние температуры и содержания воды на значения  $R_f$  аминокислот.  
 а — влияние температуры в системе *n*-пропанол—вода (9 : 1) по Циргенсену.  
 б — на оси абсцисс нанесены объемные проценты смеси коллидин—лутидин (1 : 1) в воде. Х знача при температуре 1—4°, О значения при температуре 25—25,5° (Каукабани и Кассиди).

вательно, и на величину  $R_f$ . Эти влияния иногда могут взаимно компенсироваться, так что величина  $R_f$  не слишком изменяется (Коунсел и со-трудники), иногда же влияния складываются. У растворителей, насыщен-



Р и с. 70. Влияние температуры на значения  $R_{\text{аденозин}}$  некоторых пуринов и пиримидинов (Паладини и Лелуар).  
 Система этанол—1 М ацетат аммония (7, 5 : 3), рН 7,5 (а) и рН 3,8 (б).

ных водой, влияние температуры отчасти можно свести к влиянию изменения растворимости воды в растворителе; Каукабани и Кассиди (рис. 69) для смеси коллидина с лутидином показали, что значение  $R_f$  остается при различных температурах (0—25°) практически неизменным, если содер-

жание воды сохранять также постоянным, так что органическая фаза при некоторых температурах оказывается ненасыщенной водой. Напротив, для коллидина, насыщенного водой, между 10 и 20° наблюдается резкий скачок значений  $R_f$  аминокислот, связанный с тем, что между этими двумя температурами лежит критическая температура растворения воды в коллидине. При повышенной температуре растворимость воды в коллидине меньше, и этим снижается величина  $R_f$ . Исследования, проведенные с растворителями, смешивающимися с водой (рис. 69, справа; Бурма [1]; Йиргенсонс; Паладини и Лелуар), указывают на влияние температуры и тогда, когда при всех температурах сохраняется одно и то же содержание воды; разумеется, нет возможности полностью исключить изменение состава и соотношения поперечных сечений фаз.

Иногда такими изменениями относительных положений можно воспользоваться для практических целей; Боскотт, например, разделяет в 20%-ном растворе хлористого калия полифенолы при 20°, а фенолкарбоновые кислоты при 34°. На ацетилированной бумаге изменение положения пятен в зависимости от температуры выражено особенно отчетливо; иногда может происходить даже изменение их порядка, как наглядно показал Нейман с сотрудниками.

### Количества разделяемых веществ

Если имеет место адсорбция и диссоциация, теория позволяет предвидеть способы повышения величины  $R_f$  при увеличении количества пробы, аналогично уменьшению величины  $R_f$  в случае вогнутой кривой разделения (см. стр. 49 и 87). Для аминокислот, сахаров и других веществ, где предполагается распределительный механизм процесса, влияние количества разделяемых веществ обычно выражено незначительно. Иногда наблюдается понижение значений  $R_f$  при увеличении количества пробы, например для динитрофенилгидразонов на ацетилированной бумаге (Рибарж и Оуегла, частное сообщение) или для аскорбигена (Прохазка и Коржистек [2], рис. 71). Вероятно, здесь играет роль вязкость или нарушение соотношения поверхностей поперечного сечения обеих фаз благодаря наличию значительного количества разделяемых веществ, а иногда механизм, изображенный на рис. 81.

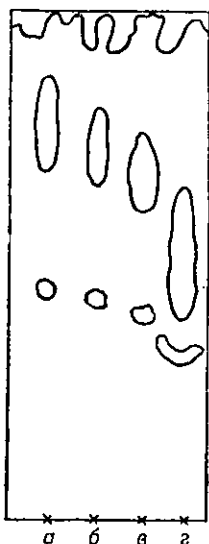


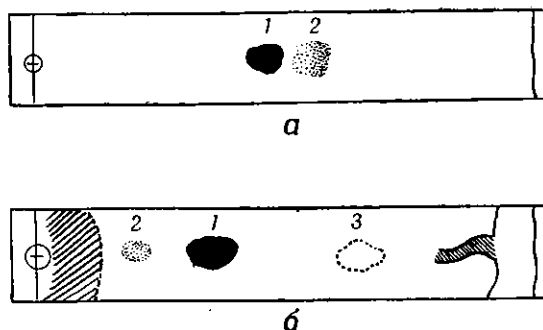
Рис. 71. Зависимость значений  $R_f$  аскорбигена от концентрации (Прохазка).

Концентрация аскорбигена от а к д повышается по экспоненциальному закону.

### Присутствие посторонних веществ в пробе

Кислоты и основания изменяют значения  $R_f$  кислых и основных веществ и аминокислот (Ландуа и сотрудники). Примеси в пробе иногда могут обусловить даже изменение порядка чередования пятен, как показано на рис. 72 (по Коштиржу и Рабеку). Это является главной причиной того, что иногда не следует наносить слишком большие количества образца, а также того, что для идентификации, а иногда и для количественных

определений пользуются смешанными хроматограммами, и, наконец, того, что образцы проб приходится подвергать предварительной обработке (стр.92).



Р и с. 72. Изменение значений  $R_f$  пировиноградной кислоты в зависимости от присутствия посторонних веществ в пробе (Коштирж и Рабек).

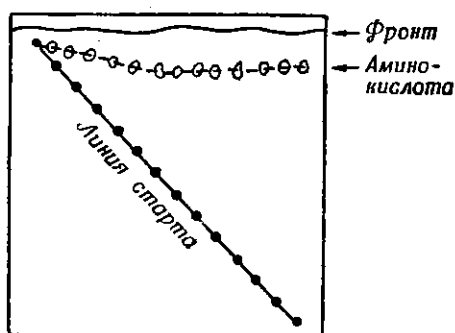
Система *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5). Проявление — реактив Яффе (Д107).  
 а — модельная хроматограмма: 1 — креатинин; 2 — пировинограднокислый натрий.  
 б — хроматограмма сыворотки человека после депротеинизации ацетоном: 1 — креатинин; 2 — пировиноградная кислота; 3 — неизвестное вещество, дающее слабую положительную реакцию Яффе.

#### Насыщение бумаги и атмосферы камеры составными частями системы растворителей

Влияние насыщения атмосферы камеры на величину  $R_f$  весьма значительно. Большее содержание воды в атмосфере обычно повышает величину  $R_f$ . По-видимому, здесь играет роль скорее повышение содержания воды в подвижной фазе, нежели увеличение поперечного сечения неподвижной фазы благодаря сорбции воды. Недостаточное насыщение атмосферы подвижным органическим растворителем может привести к тому, что пятна по направлению к фронту растворителя будут сближаться друг с другом, так как в процессе хроматографирования растворитель будет испаряться, и поток его в точках, удаленных от источника растворителя, будет уменьшаться (см. также стр. 154).

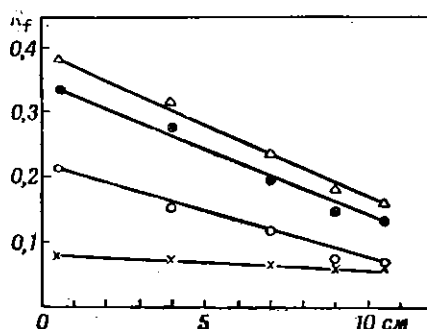
#### Расстояние между линией старта и поверхностью растворителя

Об этом влиянии кратко упоминают Консен с сотрудниками, которые констатировали также, что соотношение между поперечными сечениями неподвижной и подвижной (например, бутанольной) фаз не остается постоянным по всей длине листа. Это влияние особенно резко выражено при восходящем методе (рис. 73). Бурма и Банерджи [2], Рокланди и сотрудники [1] и Каукабани и Кассиди, изучавшие этот вопрос независимо друг от друга, пришли к заключению, что при снижении содержания воды в растворителе значения  $R_f$  гидрофильных веществ понижаются, так как ухудшается их растворимость в подвижной фазе. Во время хроматографирования, если бумага недостаточно насыщена парами воды и если камера герметична и более летучий растворитель не испаряется с бумаги, происходит фронтальный анализ составных частей смеси и запаздывание сорбции воды вблизи старта. Поэтому к точкам, более удаленным от поверхности растворителя, поступает смесь, обедненная водой, и величина  $R_f$  понижается (рис. 74).



Р и с. 73. Влияние расстояния стартовой линии от поверхности подвижной фазы на значения  $R_f$  аминокислот (Бурма).

Восходящая хроматограмма в системе изопропанол—вода (7 : 3).



Р и с. 74. Влияние расстояния стартовой линии от поверхности подвижной фазы на значения  $R_f$  валина (Каукабани и Кассиди).

Восходящая хроматограмма в системе коллидин—вода при различной молярной доле коллидина:  $\Delta$  0,19;  $\bullet$  0,24;  $\square$  0,37;  $\times$  0,52. На оси абсцисс нанесено расстояние (см) стартовой линии от поверхности растворителя.

### Количество жидкости в сосуде для растворителя

При незначительном наполнении лодочки нередко наблюдается замедление движения растворителя и понижение величины  $R_f$ . Вероятной причиной этого является то обстоятельство, что бумага впитывает из растворителя воду, растворитель в резервуаре обедняется водой и притом в тем большей степени, чем меньше объем сосуда. Уменьшение содержания воды обуславливает замедление протекания растворителя и понижение величины  $R_f$ .

### «Старение» смесей растворителей

Многие смеси при хранении изменяют свой состав. Общеизвестным примером является смесь спиртов (особенно первичных) с кислотами, в которой происходит этерификация, приводящая к понижению растворимости воды в органической фазе. Если сосуд не герметичен, в смеси может уменьшиться содержание более летучей составной части. Значительные изменения могут происходить в хроматографической камере благодаря различной летучести составных частей. Поэтому обычно рекомендуется перед вкладыванием хроматограммы сменить содержимое сосуда для растворителя (лодочки).

### Условия получения воспроизводимых величин $R_f$

Бэйт-Смит и Уэстолл следующим образом сформулировали условия, при которых может быть достигнута воспроизводимость величин  $R_f$ .

1. Постоянство температуры в пределах  $0,5^\circ$ .

2. Смесь растворителей необходимо очень хорошо перемешать и затем выдерживать в течение 3 суток для «дозревания» при температуре, при которой предполагается проводить хроматографирование (особенного внимания требуют системы, в которых протекает этерификация).

3. На хроматограмму следует всегда наносить контрольное вещество; с помощью которого судят о пригодности системы растворителей (постоянство значений  $R_f$  контрольного образца).

4. Расстояние фронта от стартовой линии должно быть не менее 25 см.
5. Камера должна быть совершенно герметична.
6. Необходимо пользоваться стандартными приемами при нанесении, сушке, проявлении и т. д.

### ЗНАЧЕНИЕ $R_f$

В этой книге приводятся таблицы величин  $R_f$  в качестве наиболее простого способа указания положения веществ на хроматограммах. Величина  $R_f$  является константой для данного вещества лишь в точно стандартных условиях, как это было указано в предыдущем разделе. Она особенно зависит от температуры, постоянством которой в практической работе часто пренебрегают и которую в большинстве таблиц мы не указываем. Поэтому нет ничего удивительного, что для одних и тех же систем и, по-видимому, тождественных условий различные авторы приводят разные величины  $R_f$ . Мы настоятельно предостерегаем от излишнего доверия к «табличным» величинам  $R_f$ , которые лишь указывают, каковы вероятный порядок и взаимное расположение пятен в данной системе, и какой системой следует пользоваться для наилучшего отделения вещества от соседних веществ, дающих аналогичные реакции при проявлении.

В отдельных случаях, когда размещение пятен определяется изменением градиента состава системы растворителей, положение пятна настолько зависит от положения старта, что выражать подвижность веществ при помощи величин  $R_f$  становится нецелесообразным (см. также стр. 62 и рис. 24, б).

### Применение метчиков

Для надежной идентификации обычно нельзя обойтись без метчиков (стандартов). В случае многих веществ это может быть связано с затруднениями, так как некоторые чистые вещества трудно доступны. Однако при качественных определениях стандарт для сравнения может и не быть совершенно чистым; достаточно, чтобы он не содержал слишком много примесей, обладающих близкими значениями  $R_f$  и проявляемыми тем же реактивом. Количества метчиков могут быть весьма незначительными, так как нет необходимости наиболее ценные метчики наносить вместе с исследуемыми веществами на каждую хроматограмму; ими пользуются лишь иногда для определения положения какого-либо другого вещества с близким  $R_f$ , и лишь это последнее вещество наносят затем на каждую хроматограмму. В некоторых случаях в качестве метчиков можно пользоваться природными смесями известного состава.

Метчики наносят либо отдельно, либо непосредственно на пятно исследуемого образца (смешанные хроматограммы); усиленные пятна вероятнее всего обуславливаются внесенными метчиками. Применение таких смешанных хроматограмм обязательно в тех случаях, когда присутствие посторонних веществ изменяет величину  $R_f$ ; см., например, рис. 72.

При серийных анализах смесей, мало отличающихся по своему составу, принадлежность отдельных пятен обычно определяют для целого листа бумаги.

### Оценка положения по стандартному веществу

Иногда величины  $R_f$  плохо воспроизводимы или их нельзя определить, так как фронт растворителя перешел границу бумаги. В таком случае положение пятен относят к положению какого-либо вещества (обозначим его X), расстояние которого от стартовой линии принимают за единицу. В таком случае величины  $R_f$  могут оказаться и более 1 (вещество B, рис. 66). В качестве стандарта X обычно выбирают доступное и по возможности обнаруживаемое при помощи специфической реакции вещество, пятно которого на хроматограмме располагается достаточно близко к пятнам остальных исследуемых веществ.

### Обозначение неидентифицированных пятен

Непригодность порядковых чисел для временного обозначения неидентифицированных пятен объясняется тем, что они произвольны. Если такие пятна следуют в порядке возрастающих или убывающих значений  $R_f$ , то в случае, если позднее между уже занумерованными пятнами будет дополнительно найдено еще какое-либо пятно, ему будет трудно приписать очередной номер.

Удобнее оказался следующий способ: значения  $R_f$  в избранной системе, в которой происходит хорошее разделение, кладут в основу нумерации наиболее важных пятен, пользуясь средними значениями из нескольких хроматограмм или значениями  $R_f$  из одной «образцовой» хроматограммы; при этом для вещества, например с  $R_f$  0,27, берут обозначение 27. Для прочих пятен номера получают интерполяцией между номерами главных пятен. Поскольку иногда несколько пятен имеют одинаковые величины  $R_f$ , к номеру добавляют буквенный индекс, связанный с каким-либо характерным свойством вещества, например с цветом флуоресценции (Хайс и Свободова [2]) или химическим характером (Хайс и Моравек [1]). Только в том случае, если совпадут как положение пятен, так и прочие свойства, обозначенные буквенным индексом, необходимо прибегнуть к числовым индексам или дополнительным данным о величине  $R_f$  в какой-либо другой системе.

## НАРУШЕНИЯ И ПОГРЕШНОСТИ ПРИ ХРОМАТОГРАФИИ

В этом разделе мы попытаемся, не претендуя на полноту, описать, а в отдельных случаях также объяснить наиболее часто встречающиеся отклонения от нормальной формы пятен. Объяснением аномалий при хроматографии занимался Шуте [2].

### РЕЗУЛЬТАТ НЕЛИНЕЙНОСТИ ФУНКЦИИ РАЗДЕЛЕНИЯ.

#### «ХВОСТЫ» И «УСЫ»

Если отношение между количеством вещества, удерживаемым неподвижной фазой, и количеством вещества, находящимся в подвижной фазе (при достижении равновесного состояния), остается одинаковым при различных концентрациях, то мы получим линейную изотерму. При этом форма пятна приблизительно симметрична, нет ни «хвоста» сзади, ни «усов» спереди, положение центра пятна не зависит от количества вещества

в пятне. Если же при повышенных концентрациях в неподвижной фазе удерживается относительно меньшее количество вещества, тогда изотерма разделения становится выпуклой, и пятна будут обладать резким фронтом впереди и диффузным «хвостом». Противоположный случай имеет место при вогнутой изотерме. Более подробно эти случаи рассмотрены в теоретической части (см. стр. 50, см. также рис. 18 на стр. 55).

Пятна, форма которых свидетельствует о выпуклой изотерме, наиболее часто встречаются в следующих случаях: адсорбция на неподвижной фазе (см. стр. 70), влияние установления равновесия диссоциации на величину кажущегося (эффективного) коэффициента распределения (см. стр. 86), ассоциация в органической фазе благодаря, например, образованию димеров (см. стр. 87). Разумеется, в самом начале изотерма адсорбции может оказаться близкой к прямой, так что при низких концентрациях разделяемых веществ даже при наличии адсорбционного механизма образование пятен с «усами» не является неизбежным. В случае диссоциирующих веществ можно добиться образования круглых пятен или симметричных полосок или путем полного подавления диссоциации, или, напротив, способствуя ей, или, наконец, поддерживая ее постоянной. В случае, например, слабых кислот применяют более сильные кислоты, щелочи или буферные растворы достаточной емкости.

#### МНОГОКРАТНЫЕ ПЯТНА ОДНОГО И ТОГО ЖЕ ВЕЩЕСТВА

При образовании двойных пятен «одного и того же» вещества в большинстве случаев имеет место разделение двух форм, остающихся в условиях хроматографирования достаточно постоянными, как, например, при разделении глюкуроновой кислоты и ее лактона в системах, в которых равновесие не сдвигается нацело в ту или другую сторону (см. рис. 138, Партридж). Очень часто в процессе разделения или даже при нанесении протекает реакция, в результате которой часть нанесенного вещества переходит в другое соединение (например, фотолиз витаминов  $B_2$  и  $B_{12}$ ). Образование сравнительно стойких соединений с прочими составными частями смеси, с загрязнениями в бумаге или с составными частями системы растворителей нередко приводит к образованию многократных пятен. Примерами являются два пятна глюкозы в присутствии аммиака (Бэйли и сотрудники), отделение гистамина или тироксина от их солей с трихлоруксусной кислотой, присутствующей в нанесенной пробе (Уэст и Райли; Акленд). Если отделяют NaCl от KCl, то образуется два пятна  $Cl^-$ . Бек и Эбри подтвердили, что часть одной аминокислоты может удерживаться в пятне другой и что, кроме того, две аминокислоты могут образовывать три пятна, одно из которых будет соответствовать молекулярному соединению обоих; следовательно, это означает, что одно вещество может содержаться в двух пятнах. Образование нескольких пятен лизина в фенольной системе Аронов объясняет тем, что возникают различные продукты присоединения с фенолом, причем каждый продукт перемещается независимо от собственного коэффициента распределения; соотношение этих форм различно при разном рН образца. Известно также образование двух пятен для глутаминовой кислоты (Дент). Кацл и Ледвина наблюдали это явление также и у аспарагиновой кислоты в присутствии хлористого кальция.

Другая возможность образования двойных пятен появляется в том случае, когда вдоль хроматограммы перемещаются два фронта, например

в системе *n*-бутанол—соляная кислота. Пример, приведенный на рис. 75, показывает интересную зависимость интенсивности двух пятен *n*-аминобензойной кислоты от концентрации (Вацек и сотрудники). Изменяя концентрацию HCl в смеси, можно предотвратить образование двух пятен.

Двойное пятно возникает также в том случае, когда вещество позади главного пятна образует «хвост», который вытесняется другим веществом (из пробы или из системы растворителей), так что на его заднем конце вновь возникает скопление вещества.

Сведения о взаимном отношении двух пятен может дать двумерная хроматография в той же системе растворителей, как схематически показано на рис. 61. Рассмотрим некоторые, наиболее часто встречающиеся случаи образования многократных пятен.

### Отстающие тени

Таким термином Хейнс и Ишервуд обозначают пятна, образующиеся при хроматографии фосфорных эфиров и имеющие меньшие значения  $R_f$ , нежели основные пятна; эти пятна могут (но не обязательно должны) быть связаны с основными пятнами. Образование их можно предотвратить, либо вводя в камеру сероводород, либо промывая бумагу раствором 8-оксихинолина или комплексона. Эти же авторы описывают также возникновение многократных полос, объясняя это влиянием недостаточной кислотности (они появляются при применении уксусной кислоты, но отсутствуют при использовании более сильной муравьиной кислоты). Подобные же пятна можно наблюдать на хроматограмме кетоглюконовых кислот в смеси бутанола и пропионовой кислоты (Мацек и Тадра [2], рис. 76).

### Опережающие, или быстрые тени

Опережающие (быстрые) тени представляют собой явление, противоположное отстающим теням, описанным в предшествующем разделе (рис. 77). Наиболее часто причиной их появления служат загрязнения в бумаге, образующие с разделяемыми веществами соединения с более высоким значением  $R_f$ , нежели у главных пятен веществ. Классическим примером являются розовые опережающие пятна («pink fronts») аминокислот, образующиеся при наличии в бумаге следов тяжелых металлов (Консен и сотрудники). Эти розовые тени особенно заметны в некоторых растворителях и могут полностью обесценить хроматограмму, например в случае бумаги ватман 1 в бутаноле и бензиловом спирте. Помимо меди, на которую указывают Консен и сотрудники, сильное влияние оказывает железо (Коноп, см. рис. 78).

### Пятна на стартовой линии

Вещество может давать пятно с высоким значением  $R_f$  и в то же время частично будет оставаться на стартовой линии. Причин для этого может быть несколько:

1. Плохая растворимость вещества в обеих фазах системы растворителей; при этом часть вещества остается на старте в твердом виде.
2. Образование нерастворимых соединений с целлюлозой или с загрязнениями в бумаге; например, фосфорные эфиры в щелочной среде осаждаются щелочноземельными металлами, содержащимися в бумаге (рис. 79).

3. Часть нанесенного пятна не смачивается подвижной фазой, и вещество поэтому не может перемещаться вместе с растворителем.

4. Целлюлоза в месте нанесения была повреждена действием температуры при нанесении или составными частями самой пробы и необратимо адсорбировала вещество.

5. Часть вещества адсорбировалась на другой составной части смеси, задерживающейся на старте (например, на белковом веществе).

6. При использовании пропитанных бумаг причиной стартового пятна может оказаться вымывание пропитки из центра пятна растворителем наносимой пробы.

7. Вещество было нанесено в растворителе, более полярном, нежели составные части системы, проникло в наиболее тонкие поры и по испарении растворителя осталось в них, так как составные части употребляемой для хроматографирования системы растворителей туда не смогли проникнуть. Этот механизм, по-видимому, встречается довольно часто, особенно в хроматографии с «обращенными фазами».

Если после первого хроматографирования высушить бумагу и вновь хроматографировать на ней, то может оказаться, что наряду с пятнами на старте будут образовываться побочные пятна в том месте, до которого дошел растворитель при первом разделении (Хассалл и Магнус).

### ДЛИННЫЕ ПРОДОЛЬНЫЕ ПЯТНА

Одной из причин возникновения продолговатых пятен, занимающих область в несколько десятых  $R_f$ , может быть медленное установление сорбционного равновесия между неподвижной и подвижной фазами или медленное установление равновесия между двумя формами одного и того же вещества в растворе по сравнению с быстрым движением растворителя (см. стр. 54). Однако продолговатые пятна могут быть обусловлены и другими причинами. Они возникают в случае растворителей, смешивающихся с водой, если содержание последней взято слишком высоким. Ниже мы рассмотрим некоторые особые случаи.

#### Длинные полосы от стартовой линии к собственно пятну

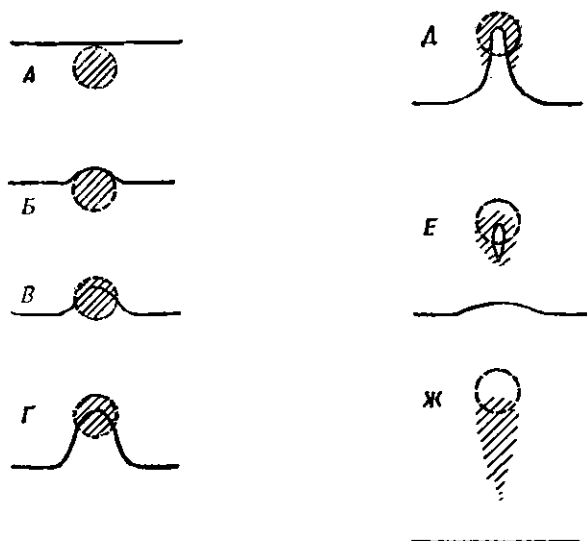
Образование очень длинных «хвостов» может происходить из-за постепенной экстракции остатка на старте, задержанного по какой-либо из рассмотренных выше причин. Особенно отчетливо можно такие полосы продемонстрировать при нанесении суспензий, например суспензии рибофлавина. От точки, где находится зернышко суспензии, начинается полоса, тянущаяся к главному пятну. Такой пример приведен на рис. 80. Постепенное превращение разделяемого вещества в процессе разделения в вещество с более низким значением  $R_f$  или в нерастворимое вещество также может вызвать подобное явление.

#### «Язычки»

Примеси, вымываемые растворителем из бумаги или образующиеся в ней при хроматографировании, иногда дают двойные выступы за фронтом. Это явление обычно наблюдается для растворов в феноле.

На хроматограммах вытяжек из материалов, содержащих липиды (например, из молока, крови и т. д.), образуются длинные «язычки»,

достигающие фронта растворителя. В начальных фазах таких хроматограмм можно наблюдать формы линии фронта, схематически показанные



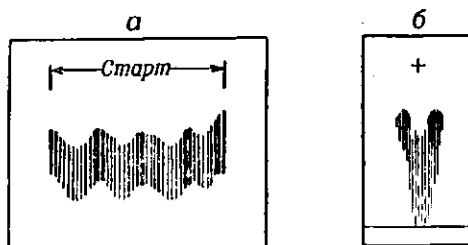
Р и с. 81. Постепенное образование «язычков».

Движущийся фронт растворителя приходит в соприкосновение с нанесенным пятном (Б), обтекает его (В, Г) и лишь позже покрывает его полностью. Лишь начиная с этого момента происходит хроматографическое разделение, с опозданием по сравнению с нормальным поведением. Липофильные вещества образуют языкообразные выступы в направлении от фронта.

на рис. 81. Шуте [1] также указывает на возможность более медленного продвижения жидкости в месте нанесения пятна по сравнению с окружающими участками, что вызывает отклонения в величинах  $R_f$ .

### Продольные полосы

Это явление иллюстрируется рис. 82 и 197. По-видимому, оно связано с повышенной вязкостью нанесенной пробы.



Р и с. 82. Примеры продольных полос: гирляндобразная форма (а) и вилкообразное пятно (б).

### ПОПЕРЕЧНЫЕ ПЯТНА

Нередко приходится сталкиваться с явлением, благоприятно влияющим на разделение и состоящим в том, что пятна становятся в продольном направлении короче, нежели первоначально нанесенное пятно, а в попе-

речном направлении сохраняют приблизительно прежнюю ширину. Иногда можно наблюдать, как при начальном быстром продвижении фронт растворителя десорбирует встречающиеся вещества, причем чаще всего с заднего края, но также и из середины и переднего края, и сосредоточивает их в форме поперечной полоски. Лишь затем начинается хроматографическое разделение. Объяснить эти явления нелегко.

Утоньшение полоски может происходить благодаря взаимному вытеснению разделяемых веществ, а также вытеснению составными частями системы растворителей, которые при движении подвижной фазы разделяются фронтальным анализом. По-видимому, этим можно объяснить тонкие полоски флуоресцирующих веществ на хроматограммах вытяжек мочи.

Поперечные пятна особенно легко образуются на медленных бумагах. Поперечные пятна вблизи фронта можно объяснить высыханием растворителя при недостаточном насыщении камеры. Продольное сокращение пятен при повторном хроматографировании показано на рис. 57.

### Диффузия в боковых направлениях

Это явление наблюдается преимущественно тогда, когда бумага пропитана неводной органической фазой, как более полярной (Бертон и сотрудники), так и менее полярной (Миллз и Вернер, см. рис. 151). Сливания соседних проб можно избежать путем прорезания бумаги. Диффузию в боковых направлениях можно ограничить, пропитывая бумагу менее концентрированным раствором.

## *Лаборатории для хроматографирования на бумаге и их оборудование*

*И. М. Хайс*

### ПОМЕЩЕНИЕ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

Одним из главных преимуществ хроматографии на бумаге является то обстоятельство, что можно обходиться весьма простым, дешевым и часто самодельным оборудованием.

В то время как для предварительных опытов или эпизодического применения хроматографии необходимо лишь место на обычном лабораторном столе для хроматографической камеры, при систематическом хроматографировании значительного числа проб размещение камер в обычной лаборатории неудобно из следующих соображений: камеры занимают много места, процесс разделения может нарушаться благодаря сильным колебаниям температуры, при вкладывании и извлечении хроматограмм из камеры неприятно пахнущие, нередко токсичные пары растворителей могут проникать в помещение.

Поэтому, по крайней мере в крупных исследовательских учреждениях, рекомендуется выделять для хроматографии на бумаге специальные помещения, в которых другие работы не производятся и где нет резких колебаний температуры. Для этой цели удобна комната без окон, в которой можно регулировать температуру (обогревающие спирали должны быть герме-

тизированы) и поддерживать медленный обмен воздуха. Чтобы при открывании дверей не возникали сквозняк и резкие изменения температуры, двери должны быть двойными; вторую дверь можно заменить портьерой. Удобно, если помещение, в котором сушат и проявляют хроматограммы, будет находиться рядом с лабораторией. Между обеими комнатами должен находиться вытяжной шкаф, доступный с обеих сторон, так чтобы влажную хроматограмму можно было перенести в него, не проходя через двери или коридоры, затем плотно закрыть шкаф со стороны комнаты для хроматографирования, а после испарения летучих растворителей продолжить обработку в другой комнате. В вытяжной шкаф можно в случае необходимости подводить воздух извне, чтобы не нарушать режима температуры и давления в помещении.

Если хроматографируемые вещества чувствительны к свету, освещение рабочего помещения должно быть слабым, и его следует включать лишь по мере необходимости. Для того чтобы можно было следить за положением фронта растворителя, рекомендуется заднее рассеянное освещение, например в виде осветительной плоскости с молочным стеклом в стене комнаты. Для того чтобы уменьшить опасность повреждения стеклянных камер, их следует ставить не непосредственно на пол, а на специальные подставки достаточной высоты.

### ПРИБОРЫ, ПРИСПОСОБЛЕНИЯ И МАТЕРИАЛЫ

Отдельные детали устройств описаны в других разделах, поэтому здесь мы ограничимся их перечислением. Подробный обзор опубликовала Опеньска-Блаут.

#### Основное оборудование

Камеры для нисходящей, восходящей или круговой хроматографии (стр. 123, 126 и 129).

Лодочки, подставки и стеклянные подпорки для нисходящей хроматографии (стр. 125—126).

Сушильный шкаф (стр. 160).

Устройство для нанесения проб [например, инфракрасная лампа, фён (сушилка для волос), специальный столик (рис. 35 на стр. 99 и рис. 36)].

Градуированные пипетки или другие приборы для нанесения.

Линейка.

Ножницы для бумаги.

Делительные воронки и мерные цилиндры для приготовления систем растворителей.

Распылитель с источником сжатого воздуха.

Чашки или кюветы для погружения бумаги (для пропитки — стр. 109 и II 9а, для проявления — стр. 164).

Зажимы для подвешивания хроматограмм (стр. 160).

#### Прочее оборудование

Прибор для измерения  $R_f$  (стр. 143), таблица для расчета  $R_f$  (стр. 77).

Герметичный ящик для хранения хроматограмм.

Аналитическая ультрафиолетовая лампа.

Фотометр для определения веществ в растворах и непосредственно на бумаге, лучше с автоматической записью (стр. 185).

Колонки для ректификации растворителей.

Резиновые перчатки.

Предохранительные маски с фильтром.

Холодильный шкаф.

Аналитические весы.

Колонки для ионообменников или прибор для обессоливания с помощью электролиза.

### Реактивы и бумага

Бумага подходящего качества (стр. 102 и далее).

Органические растворители для систем (стр. 121).

Реактивы для проявления пятен (стр. 167—172).

Комплекты стандартных веществ (в некоторых странах существуют в продаже целые серии образцов, например аминокислот, сахаров и стероидов).

С большинством указанных приборов можно работать в обычной лаборатории. Некоторые приборы, требующие затемненного помещения, или те, которые могут быть повреждены действием кислых паров, помещают в соседней комнате, которую можно затемнить. К ним относятся прежде всего аналитические весы, аналитическая ртутная лампа и регистрирующий колориметр. Устройство для работы с радиоактивными изотопами описывается на стр. 195.

### ЛИТЕРАТУРА

- Ackerman B. J., Cassidy H. G., *Anal. Chem.*, **26**, 1874 (1954).  
 Acland J. D., *Nature*, **176**, 694 (1955).  
 Airan J. W., *Current Sci.*, **22**, 51 (1953).  
 Alcock M., Cannel J. S., *Analyst*, **79**, 389 (1954).  
 Aronoff S., *Science*, **110**, 590 (1949).  
 Barrolier J., *Naturwissenschaften*, **42**, 486 (1955).  
 Bate-Smith E. C., Westall R. G., *Biochim. biophys. Acta*, **4**, 427 (1950).  
 Bayly B. J., Bourne E. J., Stacey M., *Nature*, **168**, 510 (1951).  
 Beck M. T., Ebreys P., *Biochim. biophys. Acta*, **20**, 393 (1956).  
 Berlingozzi S., Rapi G., Monti L., *Sperimentale*, **4**, № 3—4, 27 (1953).  
 Boscott R. J., *Biochem. J.*, **51**, xlv (1952).  
 Brenner M., Müller H. R., Lichtenberg E., *Helv. chim. Acta*, **35**, 217 (1952).  
 Burma D. P., *Nature*, **168**, 565 (1951). [1]  
 Burma D. P., Banerjee B., *J. Ind. chem. Soc.*, **28**, 135, 555 (1951). [2]  
 Burma D. P., Chakraborty H. C., *Anal. chim. Acta*, **13**, 248 (1955). [3]  
 Burton R. B., Zaffaroni A., Keutmann E. H., *J. biol. Chem.*, **188**, 763 (1951).  
 Charles J., *Bull. Soc. chim. biol.*, **37**, 521 (1955).  
 Conden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944).  
 Counsell J. N., Hough L., Wadman W. H., *Research*, **4**, 143 (1951).  
 Chakraborty H. C., Burma D. P., *Current Sci.*, **22**, 238 (1953).  
 Chu T. C., Green A. A., Chu E. I., *J. biol. Chem.*, **190**, 643 (1951).  
 Datta S. P., Dent C. E., Harris H., *Biochem. J.*, **45**, xliii (1950); *Science*, **112**, 621 (1950).  
 Decker P., Riffart W., Oberneder G., *Naturwissenschaften*, **38**, 288 (1951).  
 Dent C. E., *Biochem. J.*, **43**, 169 (1948).  
 Dirscherl W., Gerhards E., *Acta endocrinol.*, **19**, 233 (1955).  
 Douste-Blazy L., Polonovski J., Valdicque P., *Compt. rend.*, **234**, 1643 (1952).  
 Erbring H., Patt P., *Naturwissenschaften*, **41**, 217 (1954).

- Fischbach H., Levine J., *Science*, **121**, 602 (1955).  
 Franks F., *Analyst*, **81**, 384 (1956).  
 Ganguli N. C., *Nature*, **174**, 189 (1954). [1]  
 Ganguli N. C., *Anal. chim. Acta*, **12**, 335 (1955). [2]  
 Giri K. V., *Nature*, **173**, 1194 (1954). [1]  
 Giri K. V., Rao N. A. N., *Current Sci.*, **20**, 295 (1951). [2]  
 Hais I. M., Morávek L., *Biol. Listy*, **31**, 144 (1950). [1]  
 Hais I. M., Svobodová S., *Chem. Listy*, **45**, 25 (1951). [2]  
 Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature*, **164**, 1107 (1949).  
 Hassall C. H., Magnus K. E., *Experientia*, **10**, 425 (1954).  
 Head M. J., Canaway R. J., *Chemistry and Industry*, **1955**, 1472.  
 Hedén C. G., *Nature*, **166**, 999 (1950).  
 Hudeček S., *Chem. Listy*, **49**, 60 (1955).  
 Hunt E. C., Wells R. A., *Analyst*, **79**, 351 (1954).  
 Husband L. J. B., *Chemistry and Industry*, **1954**, 776.  
 Irreverre R., Martin W., *Anal. Chem.*, **26**, 257 (1954).  
 Jeanes A., Wise C. S., Dimler R. J., *Anal. Chem.*, **23**, 415 (1951).  
 Jirgensons B., *Univ. Texas Pubs.*, **5109**, 56 (1951).  
 Kácl K., Ledvina M., *Chem. Listy*, **47**, 242 (1953).  
 Kawerau E., *Biochem. J.*, **48**, 281 (1951).  
 Keil B., *Chem. Listy*, **48**, 725 (1954).  
 Koloušek J., Hartman J., *Chem. Listy*, **50**, 676 (1956).  
 Konop R., *Papír a Celulosa*, **7**, 183 (1952).  
 Košťál J. V., Rábek V., *Biochim. biophys. Acta*, **5**, 210 (1950).  
 Kowkabany G., Cassidy H. G., *Anal. Chem.*, **24**, 643 (1952).  
 Кузин А. М., Саенко Г. Н., *Биохимия*, **20**, 188 (1955).  
 Lakshminarayan K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 367 (1954).  
 Landua A. J., Fuerst R., Awapara J., *Anal. Chem.*, **23**, 163 (1951).  
 Lederer M., *Nature*, **172**, 727 (1953).  
 Léonis J., *Ann. Soc. roy. Sci. méd. et nat. Bruxelles*, **8**, 65 (1956).  
 Le Strange R. J., Müller R. H., *Anal. Chem.*, **26**, 953 (1954).  
 Liesegang R. E., *Naturwissenschaften*, **31**, 348 (1943).  
 Ma R. M., Fontaine T. D., *Science*, **110**, 232 (1949).  
 Macek K., *Chem. Listy*, **48**, 1181 (1954). [1]  
 Macek K., Tadra M., *Chem. Listy*, **46**, 450 (1952). [2]  
 Macek K., Vaněček S., *Pharmazie*, **10**, 422 (1955). [3]  
 Marchal J. G., Mittwer T., *Compt. rend.*, **145**, 417 (1951).  
 Matthias W., *Naturwissenschaften*, **41**, 17 (1954); *Züchter*, **24**, 313 (1954).  
 Mattu F., Comuzzi B., *Labor. Scientifico*, **3**, 11 (1955).  
 Meredith P., Sammons H. G., *Analyst*, **77**, 416 (1952).  
 Miettinen J. K., Virtanen A. I., *Acta chem. Scand.*, **3**, 459 (1949).  
 Mikeš O., Holeyšovský V., *Chem. Listy*, **51**, 1497 (1957).  
 Milletti M., *Ann. Chimica*, **43**, 438 (1953).  
 Mills J. S., Werner A. E. A., *Nature*, **169**, 1064 (1952).  
 Müller R. H., Clegg D. L., *Anal. Chem.*, **21**, 192, 1123 (1949). [1]  
 Müller R. H., Clegg D. L., *Anal. Chem.*, **21**, 1429 (1949); **23**, 408 (1951). [2]  
 Нейман М. Б., Левковский В. Н., Луковников А. Ф., *ДАН СССР*, **81**, 841 (1951).  
 Oertel G. W., *Naturwissenschaften*, **43**, 251 (1956).  
 Opieńska-Blauth J., *Przemysł chem.*, **10**, 574 (1954).  
 Paladini A. C., Leloir L. F., *Anal. Chem.*, **24**, 1024 (1952).  
 Partridge S. M., *Biochem. J.*, **42**, 238 (1948).  
 Phillips D. M. P., *Nature*, **162**, 29 (1948).  
 Pollard F. W., McOmie J. F. W., Elbeih I. I. M., *J. Chem. Soc.*, **1951**, 470.  
 Procházka Ž., *Chem. Listy*, **44**, 158 (1950). [1]  
 Procházka Ž., Kořístek S., *Chem. Listy*, **45**, 274 (1951); *Coll. Czech. chem. Commun.*, **16**, 65 (1951). [2]  
 Proom H., Woitwod A. J., *J. gen. Microbiol.*, **5**, 681 (1951).  
 Rábek V., *Naturwissenschaften*, **42**, 581 (1955).  
 Rao V. K. M., *Experientia*, **9**, 151 (1953).  
 Rockland L. B., Blatt J. L., Dunn M. S., *Anal. Chem.*, **23**, 1142 (1951). [1]  
 Rockland L. B., Dunn M. S., *Science*, **109**, 539 (1949). [2]  
 Rockland L. B., Dunn M. S., *Science*, **111**, 332 (1950). [3]  
 Rutter L., *Nature*, **161**, 435 (1948); *Analyst*, **75**, 37 (1950).  
 Saifer A., Oreskes I., *Anal. Chem.*, **25**, 1539 (1953).  
 Северин С. Е., Федорова В. Н., *ДАН СССР*, **82**, 443 (1952).

- Schlögl K., Siegel A., Z. physiol. Chem., 292, 263 (1953).  
 Schute J. B., Pharm. Weekblad, 86, 33 (1951). [1]  
 Schute J. B., Mededel. Vlaamse chem. Veren., 15, 1 (1953). [2]  
 Schwerdtfeger E., Naturwissenschaften, 40, 201 (1953). [1]  
 Schwerdtfeger E., Naturwissenschaften, 41, 18 (1954). [2]  
 Starke K., Deutsche Apotheker-Ztg., 94, 1097 (1954).  
 Svobodová S., Hais I. M., Koštíř J. V., Chem. Listy, 47, 205 (1953).  
 Шамрай Е. Ф., Гаврилова Е. А., Кравченко В. В., Биохимия, 16, 604 (1951).  
 Šimek J., Chem. Průmysl., 4, 56 (1954).  
 Thompson A. R., Austral. J. sci. Research., biol. Sci., 4, 180 (1950).  
 Töppel O., Angew. Chem., 66, 555 (1954).  
 Vacek J., Skorkovská A., Votava Z., Horáková Z., Matoušková H., Českoslov. Farmacie, 2, 185 (1953).  
 Weil H., Kolloid Z., 132, 159 (1953).  
 West G. B., Riley J. F., Nature, 174, 882 (1954).  
 Williams R. H., Kirby H., Science, 107, 481 (1948).  
 Winteringham F. P. W., Nature, 172, 727 (1953). [1]  
 Winteringham F. P. W., Bridges P. M., Hellyer G. C., Biochem. J., 59, 13 (1955). [2]  
 Wolfsson W. Q., Cohn C., Devaney W. A., Science, 109, 541 (1949).  
 Wunderly Ch., Nature, 173, 267 (1954).  
 Yamaguchi M., Howard F. D., Anal. Chem., 27, 332 (1955).  
 Zimmermann G., Z. anal. Chem., 138, 321 (1953). [1]  
 Zimmermann G., Nehring K., Angew. Chem., 63, 556 (1951). [2]

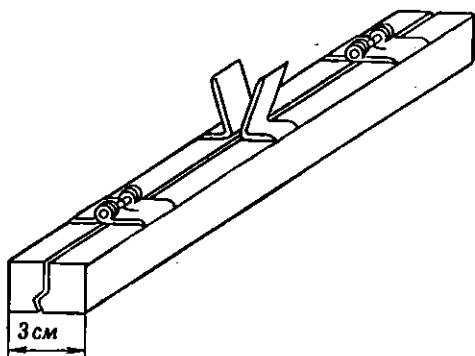
# ОБНАРУЖЕНИЕ (ПРОЯВЛЕНИЕ) И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗДЕЛЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

И. М. Хайс

## СУШКА ХРОМАТОГРАММ

Некоторые методы обнаружения (проявления)<sup>1)</sup> не требуют полного удаления избытка растворителя из бумаги, для других это обязательно. Хроматограммы, содержащие термолабильные вещества, обычно сушат в вытяжном шкафу в токе воздуха.

Растворители, кипящие при высоких температурах, удаляют в сушильном шкафу при автоматически регулируемой (чаще всего в пределах 60—120°) температуре.



Р и с. 83. Длинный зажим для хроматограмм (Химический институт Чехословацкой Академии наук).

Обе планки снабжены выступом. Весь зажим можно боком ввести в специальную стойку.

Через сушильный шкаф должен проходить ток воздуха, чтобы атмосфера в нем не оставалась насыщенной парами растворителя. При этом можно пропускать через шкаф горячий воздух или нагревать стенки шкафа и отсасывать воздух, например вентилятором (Олбон и Гросс). Остатки некоторых веществ, например летучие органические кислоты, можно удалять с хроматограмм водяным паром.

Размер сушильного шкафа определяется размерами хроматограммы. Удобны, например, следующие размеры: высота 75 см, ширина 65 см, глубина 60 см. Для сушки бумагу подвешивают обычно с помощью зажимов для белья или фотографических скрепок на шнуре или на стержне. Специальный длинный зажим показан на рис. 83. Удобны также съемные вешалки, на которые помещают стержни с хроматограммами; эти вешалки затем вставляют в шкаф. Пользуясь приборами Датта (рис. 60) или Маттиаса (рис. 56), в шкаф можно помещать сразу целый блок хроматограмм.

<sup>1)</sup> См. прим. ред. на стр. 41.

## Методы обнаружения

### ФИЗИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

Мы не будем здесь рассматривать значительное число физических и физико-химических методов, которыми можно пользоваться для исследования элюатов из вырезок хроматограмм. Ограничимся лишь теми способами, которые применяют *in situ* на самих пятнах. Сюда преимущественно относятся методы, основанные на оптических свойствах разделяемых веществ, т. е. на поглощении света и флуоресценции. Методы, предназначенные для радиоактивных изотопов, будут рассмотрены в другом разделе (стр. 195). Ряд способов, основанных на физических свойствах (адсорбции, концентрации водородных ионов), но в которых для проявления пользуются химическими реактивами, отнесен к химическим методам, описанным в следующей главе; там же будет упомянуто и о спектрах испускания (реакции в пламени).

Многие из методов, в которых для обнаружения пользуются измерительными приборами, и особенно автоматической регистрацией измеряемых величин, позволяют одновременно с обнаружением проводить также и определение веществ или хотя бы приблизительно устанавливать их концентрации. Поэтому такие методы подробно будут рассмотрены в разделе, посвященном количественным определениям (стр. 180—192). Там же будут рассмотрены все методы, основанные на электрических свойствах, даже те, которые из-за своей небольшой точности имеют значения скорее как качественные.

#### ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА

О практическом использовании  $\beta$ -излучения (Мюллер и Уайз [2]) и рентгеновских лучей для обнаружения пятен на хроматограммах в литературе пока известны лишь немногие данные; поглощение инфракрасных лучей применяется также очень редко; Гарвалик применял электронный конденсор (см. также стр. 186).

Если вещество поглощает в видимой области, то окрашенные пятна можно наблюдать визуально в отраженном и проходящем свете. Первый из этих способов обычно позволяет точнее определять интенсивность окраски, так как изъяны, имеющиеся в бумаге, в этом случае не оказывают влияния; второй, однако, чувствительнее. О фотометрии отраженного и проходящего света см. ниже (стр. 183).

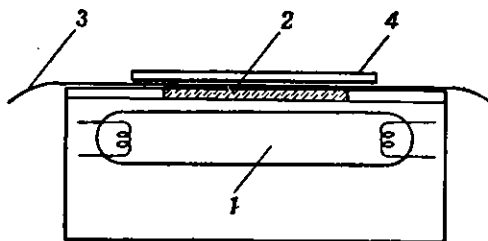
#### Поглощение в ультрафиолетовой области

Ультрафиолетовые лучи, прошедшие через бумагу, можно наблюдать тремя способами: фотографическим путем, при помощи флуоресценции и фотометрически. При фотографическом обнаружении можно либо получить контактный оттиск на фотобумаге (см. стр. 511), либо воспользоваться фотокамерой; через стеклянную оптику проходит также излучение, близкое к ультрафиолетовой области, поэтому проявление на снимке может оказаться нередко чувствительнее, нежели при визуальном просмотре хроматограммы. Флуоресценцию можно наблюдать как на экране (для чего может служить фильтровальная бумага, смоченная флуоресцирующим веществом), так и непосредственно на бумаге. Обычно химически не вполне

чистая бумага также флуоресцирует; эту флуоресценцию можно погасить добавлением веществ, поглощающих ультрафиолетовый свет. Хроматограмму также можно обработать флуоресцирующим веществом. Явления гашения, при которых происходит не только поглощение света, зависят от степени влажности бумаги, температурных условий и т. д. О фотометрии см. ниже (стр. 186).

*Сужение диапазона длин волн.* Для того чтобы сделать заметными даже слабые пятна, необходимо сузить диапазон длин волн до области, в которой рассматриваемые вещества обладают значительным поглощением. Этого можно добиться в принципе тремя способами:

1. Источник со специфической эмиссией. Ртутная разрядная трубка, снабженная фильтром из стекла Вуда (филора HPW, лума HgU), для флуоресцентных наблюдений обычно расширенная,



Р и с. 84. Ультрахемископ по Брумбергу.

1 — вакуумная люминесцентная лампа; 2 — фильтр, поглощающий видимое излучение; 3 — хроматограмма; 4, — пластинка, снабженная на нижней плоскости тремя флуоресцирующими слоями с различными спектрами возбуждения и испускания.

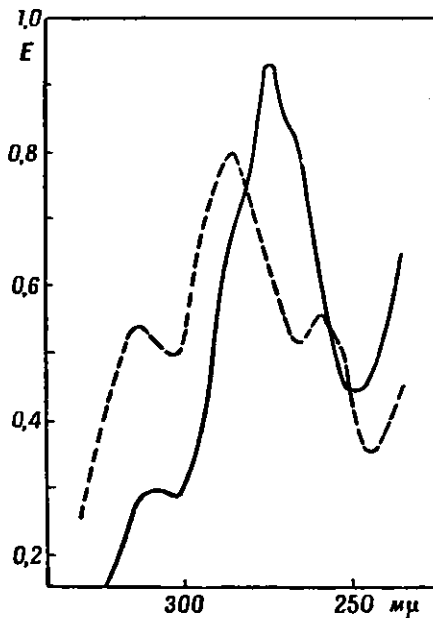
испускает свет с максимумом около 360 мμ (рис. 86). Значительное число биохимически важных веществ обладает поглощением между 240 и 260 мμ (например, Δ<sup>4</sup>-3-кетостероиды, составные части нуклеиновых кислот и т. п.). Для их открытия пригодна ртутная разрядная трубка низкого давления (например, минералайт), в некоторых случаях обычное горное солнце с кварцевой трубкой и с фильтрами (Маркгам и Смит).

2. Фильтры (см. рис. 201). Более подробное обсуждение приведено на стр. 510. Многие авторы пользуются монохроматором кварцевого спектрофотометра. Поскольку эти методы имеют значение для количественных определений, мы упомянем о них на стр. 186.

3. Флуоресцирующий материал специфической чувствительности. В «ультрахемископе» Брумберга, где проходящее ультрафиолетовое излучение обнаруживают по видимой флуоресценции экрана, для изготовления последнего выбран светящийся состав, который можно возбудить излучением лишь в ограниченной спектральной области (рис. 84). Остроумно сконструированное устройство позволяет осуществить «цветное видение» в ультрафиолетовой области. Порядок расположения следующий: источник света; фильтр, поглощающий видимые лучи; бумажная хроматограмма; флуоресцирующий слой, возбуждаемый излучением с длинами волн короче 270 мμ и испускающий красные лучи; слой, возбуждаемый излучением 270—320 мμ и испускающий зеленые лучи; слой, возбуждаемый лучами 320—400 мμ и испускающий синие лучи. Хейнс и Дрейк комбинируют фильтр со светящимся составом с фильтром из силиката цинка, который излучает при возбуждении лучами с длиной волны 2537 Å.

### Спектры поглощения непосредственно на бумаге

Уже Гоппельсредер наблюдал при помощи спектроскопа зоны синтетических красителей на капиллярограмме, предварительно пропитанной маслом для прозрачности. Современные спектрофотометры позволяют измерить точный ход кривой поглощения и расширить область наблюдения за пределы видимой области (рис. 85). При использовании прежней модели Цейсса с вращающимся сектором (Хайс и сотрудники [1]) фотографируют попеременно спектры излучения, прошедшего через чистую бумагу и через пятно исследуемого вещества. Хроматограмму помещают между двумя катушками (вместо кюветы). На проявленных пластинках можно затем измерить разность в степени почернения при различных длинах волн, а если необходимо, то и более точно проследить ход спектраль-



Р и с. 85. Сравнение спектра поглощения апоморфина в этанольном растворе (2,5 мг%, толщина слоя 0,5 см, —) и непосредственно на бумаге (in situ, -----).

Применялся универсальный спектрофотометр Цейсса с вращающимся сектором. Хроматограмму для прозрачности пропитывали парафиновым маслом, затем натягивали между двумя катушками специального держателя (Какач).

ной кривой, фотографируя спектр чистой бумаги при разной ширине экранирующего сектора. Удобнее измерять спектры на фотометрах с фотоэлектрическим приспособлением (Брадфилд и Флуд и др.), например на приборе Бекмана. Описание дополнительного устройства см. на стр. 186. Результаты опытов показывают, что получаемые спектры подобны спектрам тех же веществ в растворах (рис. 85 по Какачу, частное сообщение). Точного сходства ожидать не приходится ввиду того, что в растворе может иметь место взаимодействие молекул вещества с растворителем, тогда как в высушенной бумаге вещество находится в твердом состоянии, а частично также адсорбционно связано с целлюлозой.

### ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Значительное число веществ обладает видимой флуоресценцией в ультрафиолетовом свете ртутной лампы, снабженной фильтром Вуда (филора HPW). Для некоторых веществ следует пользоваться лампой с фильтром, излучающей в другой области; например, для некоторых птеридинов — около 265 мμ. Обнаружение будет наиболее чувствительным, если глазу дать привыкнуть к темноте и вести наблюдения тогда, когда лампа разгорится (спустя 2—5 мин после включения). Устройство для наблюдения хроматограмм в ультрафиолетовом свете показано на рис. 86.

Цветной оттенок флуоресценции нередко является удобным вспомогательным средством для идентификации. Поскольку обычная оценка цветных оттенков весьма относительна и на нее оказывают значительное влияние контрасты, нередко между наблюдениями отдельных исследователей при обозначении оттенков обнаруживаются значительные расхождения. Поэтому рекомендуется, особенно если речь идет о данных для публикации, оценивать оттенок в помещении, освещенном слабым дневным светом, или сравнивать его с тонами окрасок, исходящих из калиброванного монохроматора (спектрофотометра). Эмиссионный спектр флуоресценции пятен можно наблюдать при помощи обычного спектроскопа (Хайс и Педакова).

Фотографирование флуоресцирующих пятен на обычном фотографическом материале (чувствительном к ультрафиолетовым лучам) возможно, если между хроматограммой и светочувствительным материалом ввести фильтр, поглощающий ультрафиолетовые лучи, например свинцовое стекло или желтый фильтр (Вольф). Через фильтр можно также производить фотометрическое измерение флуоресценции. Изображение цветов флуоресценции на цветной фотобумаге (для дневного света, с обращением) требует устранения ультрафиолетовых лучей желтым фильтром и сравнительно большого времени экспозиции (частное сообщение, Рост).

#### ДРУГИЕ ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Классон предложил пользоваться изменением минимального угла полного внутреннего отражения в местах с повышенным показателем преломления для обнаружения пятен на хроматограмме, которую для этого увлажняют и вкладывают между двумя стеклами. Такой способ не получил распространения.

Для микроскопических наблюдений Матту и Комуцци рекомендуют сделать хроматограмму прозрачной; согласно их данным, лучше, чем хроматограмма на бумаге, оказывается хроматограмма на хлопчатобумажной нити, на которой можно наблюдать кристаллы и в отдельных случаях определять их температуру плавления в блоке Кофлера.

### ОБНАРУЖЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

#### ОБЩИЕ СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ РЕАКТИВОВ

*Пары и газы.* При этом способе отсутствует опасность размывания пятен; иногда, однако, неудобство состоит в том, что концентрацию проявляющего агента в атмосфере трудно удержать на постоянном уровне. Если необходима продолжительная экспозиция или действие повышенной температуры, бумагу следует поместить в какой-либо сосуд (например, большой эксикатор), который заполняют парами или газом и плотно закрывают. Бумагу подвешивают или ставят, свернув в виде цилиндра, так, чтобы она не соприкасалась со стенками.

*Погружение в раствор реактива.* Если при реакции образуются продукты, малорастворимые в применяемом растворе, то хроматограмму можно погружать прямо в реактив; последний при этом используется более равномерно и не распыляется напрасно. Выбирая подходящий рас-

творитель для многих реактивов, применявшихся ранее с помощью распыления, можно пользоваться последними и при способе погружения, обладающем многими преимуществами. В некоторых случаях проявление напоминает гистологическое окрашивание, где повторным погружением смывают избыток красителя со свободных участков бумаги.

*Нанесение реактива кисточкой.* Этот способ также пригоден лишь в тех случаях, когда образуются малорастворимые продукты реакции. Способ применялся лишь в некоторых случаях, когда требовалось осуществить проявление лишь на ограниченном участке хроматограммы, а остальную часть либо оставляли непроявленной, либо проявляли другим реактивом. Можно также наносить реактив на хроматограмму по каплям, применяя микропипетки или микробюретки.

*Наложение бумаги на пластинку, смоченную реактивом.* Этим способом удобно пользоваться тогда, когда реактив действует на бумагу разрушающе, как, например, концентрированная серная кислота. Можно, кроме того, нанести реактив по каплям еще и сверху и закрыть другой пластинкой; это целесообразно тогда, когда свободный доступ воздуха во время проявления нежелателен. Из соображений безопасности проявление серной кислотой рекомендуется проводить в больших пластмассовых кюветах.

*Снятие отпечатков.* Возможны различные варианты способа. В одном из них хроматограмму увлажняют и прикладывают к другой полосе бумаги; полученные на последней отпечатки проявляют опрыскиванием. Благодаря этому в большинстве случаев разделенные пятна сохраняются на хроматограмме в неизменной форме для дальнейшей обработки. Другую модификацию метода отпечатков представляет собой пропись Д 124. Бебер прикладывает к хроматограмме, содержащей летучие основания, индикаторную бумажку и проводит утюгом; в тех местах, где находятся основания, происходит изменение окраски индикатора.

*Точечное проявление по Буассона.* По этому мало распространенному способу на хроматограмму наносят мелкие точки реактива, выдавливая его из полых игл, укрепленных на специальном штампе. Затруднение состоит в том, чтобы большую часть веществ в пятнах оставить неизменной для дальнейшей элюции и количественного определения.

*Введение реактива в разделяющую систему растворителей.* В этом случае реактив отдельно не применяется. Реакция протекает после высушивания или нагревания хроматограммы. Можно также предварительно пропитать бумагу реактивом.

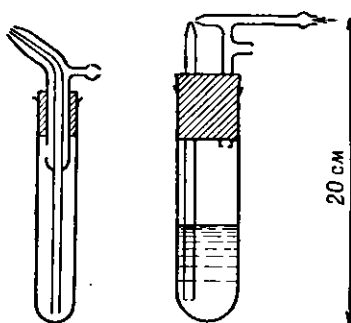
*Проявление с помощью электрического тока.* По способу Кумэ и сотрудников и Отосаи соли щелочных металлов проявляют, опрыскивая хроматограмму фенолфталеином и вкладывая ее между двумя плоскими графитовыми электродами. После пропускания тока (6 в в течение 5 сек) места, содержащие соли сильных оснований, приобретают щелочную реакцию.

*Опрыскивание из пульверизатора.* Этот способ пока наиболее распространен. Чтобы не происходило размывания или растекания пятен растворимых производных, необходимо, чтобы распыляемые капельки были достаточно малы. Опрыскивать нужно лишь до такой степени, чтобы бумага была только увлажнена. Однако орошение должно быть достаточно обильным, чтобы реактив проникал на другую сторону бумаги. У большинства распылителей имеется сопло, в которое жидкость подается из расположенного ниже сосуда при помощи тока воздуха (так же, как в обычном пульверизаторе). Для того чтобы поток распыленной жидкости был достаточно обильным, некоторые типы пульверизаторов конструируются так, чтобы

одновременно повышалось давление на поверхность жидкости в резервуаре (рис. 87). Однако ряд авторов не считает такое повышение давления необходимым (Грюнвальд).

Источники сжатого воздуха могут быть различными. Можно просто дуть через присоединенную каучуковую трубку, однако при этом трудно избежать перерывов в подаче воздуха, что во многих случаях нежелательно. Удобно пользоваться сжатым воздухом из баллона, снабженного редуктором. Если применять воздухоудвку (например, масляным вакуум-насосом с нагнетательной стороны), то удобно, чтобы поблизости был расположен кран, присоединенный сбоку нагнетательного патрубку насоса, для того чтобы можно было регулировать интенсивность распыления; можно также снабдить пульверизатор отверстием, которое закрывают пальцем.

Растворы (или тонкие эмульсии) в органических растворителях удобнее для распы-



Р и с. 87. Пульверизаторы для опрыскивания хроматограмм.

ления, нежели водные растворы, поэтому нередко водный раствор реактива, известный по пробирочной реакции, заменяют для хроматограмм раствором в органическом растворителе. Иногда достаточно лишь прибавить к реактиву этанол, чтобы улучшить качество распыления. Равномерное и притом слабое распыление особенно необходимо в случае образования негативных светлых пятен на цветном фоне. В этих случаях реактив не должен проникать на другую сторону бумаги.

### Нагревание

При проведении многих реакций хроматограмму необходимо нагревать. Опишем здесь несколько способов.

Нагревание в термостате или сушильном шкафу, отрегулированном на заданную температуру, наиболее распространено. Сушильный шкаф с двойными дверцами, из которых внутренние прозрачны, позволяет наблюдать за появлением окраски и избежать перегрева. Равномерность температуры во всем объеме шкафа, особенно необходимую при количественном сравнении пятен, обеспечивают с помощью специального устройства (Олбон и Гросс). Можно подогревать также на фотографическом глянцеваальном станочке, снабженном электрическим обогревом; бумагу укрепляют на станке, следя за ходом реакции визуально. Иногда нагревают, проводя по бумаге теплым утюгом или вкладывая бумагу между двумя предварительно нагретыми стеклянными пластинками, а также инфракрасной лампой или, наконец, стеклянным нагревателем (Фецер и Оу).

При действии повышенной температуры бумага приобретает флуоресценцию или обугливается с неодинаковой скоростью в тех местах, где расположены различные пятна. Этим также можно воспользоваться для проявления (Раттер, Колдуэлл) (см. рис. 222).

Реакциями в пламени пользовался уже Гоппельсредер для проявления зон элементов, дающих характерное окрашивание пламени. Мы также

успешно применяли этот способ для проявления калия (наблюдая через кобальтовое стекло). Благодаря высокой чувствительности достаточно сжигать очень небольшие пробы.

### Множественное проявление

Некоторыми реактивами можно пользоваться последовательно, друг за другом, так что на одной и той же хроматограмме можно проявлять различные типы веществ, а в некоторых случаях в одном и том же веществе доказывать наличие различных хромогенных групп. Вудворд и Рабидо, например, проявляют последовательно нингидрином (аминокислоты), метиловым красным (кислоты) и 3,5-динитросалициловой кислотой (сахара).

## ПРИНЦИПЫ НЕКОТОРЫХ ЦВЕТНЫХ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ РЕАКЦИЙ

Цветные и флуоресцентные реакции служат наиболее распространенным способом проявления веществ, разделенных на хроматограмме. Реакции, применяемые для отдельных групп веществ, будут описаны в специальной части книги. Мы считаем уместным дополнить классификацию по характеру разделяемых веществ кратким обзором принципов реакций, не претендуя при этом на полноту изложения. Главным образом мы хотим указать на различные возможности, особенно если необходимо проявлять вещества, до настоящего времени не подвергавшиеся анализу с помощью хроматографии на бумаге. Более подробные сведения можно найти в монографиях Файгля или Пезэ и Пуарье. В своем обзоре мы пользуемся некоторыми принципами классификации этих авторов. Химизм многих реакций, однако, большей частью сложнее, нежели можно ожидать из этого обзора; именно хроматографирование на бумаге продуктов реакции часто оказывается пригодным для доказательства неоднородности получаемой смеси (Шемакин).

Из нижеперечисленных принципов обнаружения первые два по существу не относятся к химическим реакциям, так как здесь речь идет скорее о физико-химических явлениях. Обнаружение неорганических веществ рассматривается в соответствующей главе (стр. 673 и далее), поэтому здесь мы о нем не упоминаем.

### Кислотно-основные индикаторы

Этот принцип проявления применяется весьма широко. Таким способом можно проявлять кислоты, основания, амфотерные соединения, буферные соли. В некоторых случаях, помещая окрашенную хроматограмму в пары кислоты или аммиака, удается повысить контрастность. Иногда к раствору индикатора прибавляют вещества, взаимодействующие с проявляемыми соединениями и этим улучшающие возможность их проявления, например формальдегид в случае аминокислот, бораты в случае сахаров (см. соответствующий раздел). Иногда удобно пользоваться универсальными индикаторными смесями. Вместо цветных индикаторов можно применять также весьма чувствительные флуоресцентные индикаторы, например некоторые кумарины.

На локальном изменении значения рН в пятнах основано проявление орцином и серной кислотой (Порат и Флодин, *Д 117*); в тех местах, где

обладающие буферным действием вещества или щелочи не препятствуют гидролитическому действию серной кислоты на целлюлозу бумаги, протекает цветная реакция орцина с образующимися сахарами.

### Адсорбция и распределение

На адсорбционном связывании молекул кислых органических красителей на поверхности белковых веществ основано окрашивание последних, чем широко пользуются для качественных и количественных определений при электрофорезе на бумаге. Избыток красителя необходимо вымыть из бумаги, так чтобы окрашенными оставались только белковые вещества; следует выдерживать стандартные условия. На адсорбционных явлениях основано, по-видимому, так называемое контрастное окрашивание липоидных веществ, предложенное Кауфманом.

Распределение молекул красителя между жидкой фазой раствора реактива и слоем веществ в пятне лежит, по-видимому, в основе окрашивания липидов и липопротеинов водно-спиртовым раствором судана и аналогичных липофильных гистологических красителей.

### Окисление и восстановление

На процессах окисления и восстановления основано значительное число реакций проявления. Цветные или флуоресцирующие продукты при этом могут образовываться как из самих веществ, так и из реактивов. Этим способом можно проявлять вещества, окисляющиеся или восстанавливающиеся реактивом, а также вещества, катализирующие окислительно-восстановительные процессы между составными частями реактива.

*Окисление проявляемого вещества и восстановление реактива.* К восстанавливающим веществам относятся альдегиды, кетоспирты (особенно стероидные), сахара, некоторые ненасыщенные соединения, фенолы (особенно полифенолы), сульфгидрильные производные, аскорбиновая кислота, муравьиная кислота, мочевиная кислота, токоферолы и др. Некоторые из них реагируют на холоду, другие — лишь при нагревании. Из неорганических солей, восстанавливаемых открываемыми веществами в окрашенные продукты, применяют азотнокислое серебро, фосфорномолибденовую и арсеномолибденовую кислоты и др. Для фенолов специфическим является реактив Фолина, содержащий фосфорновольфрамовую и фосфорномолибденовую кислоты. В присутствии фенолов железосинеродистый калий и соль окиси железа дают синее окрашивание, хотя восстановление и не происходит. Восстановление перманганата в сернокислой среде (Д 3а) применяется именно вследствие его неспецифичности, так как перманганат может быть восстановлен значительным числом соединений, особенно алифатических. Результаты проявления следует быстро обозначать карандашом, так как розовое окрашивание бледнеет, поскольку целлюлоза окисляется.

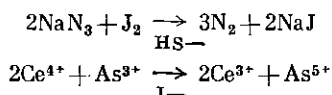
К органическим реактивам относятся различные полинитросоединения (см. стр. 266). Очень удобным оказалось проявление солями трифенилтетразолия и его производных в щелочной среде. Аскорбиновую кислоту можно проявить при помощи дихлорфенолиндифенола.

Некоторые вещества при окислении сами дают окрашивание или флуоресценцию, как, например, адреналин, который окислением может быть превращен в адренохром и далее в интенсивно флуоресцирующие

продукты — тиамин или триптофан <sup>1)</sup>. Окисление играет также известную роль при реакции Сакагути с однозамещенными гуанидинами (см. стр. 387).

*Окисление реактива и восстановление проявляемого вещества.* Сюда можно отнести различные реакции с бензидином, который при окислении дает синее окрашивание.

*Катализ.* Укажем лишь на две известные, чувствительные и широко применяемые реакции, а именно на восстановление йода азидом, катализируемое сульфидами и некоторыми органическими производными, содержащими серу, и на восстановление солей четырехвалентного церия солями мышьяковистой кислоты, катализируемое йодидами и некоторыми органическими йодпроизводными (Боуден и сотрудники, *Д* 124);



Обязательными условиями проведения этих реакций являются чистота атмосферы, бумаги и растворителей.

### Реакции с неорганическими веществами

Здесь мы не приводим реакций, основанных на окислении и восстановлении, о которых упоминалось выше. Значительная часть этой неоднородной группы реакций относится к образованию комплексных соединений, особенно внутренних комплексов; эти реакции пригодны для проявления не только неорганических ионов (стр. 674), но иногда также и для проявления органических веществ. Так, например, тиосемикарбазоны можно проявить, опрыскивая хроматограмму слабым раствором никелевой соли (желтые пятна); контрастность можно повысить последующим опрыскиванием аммиачным раствором диметилглиоксима, который с избытком никеля дает розовый фон (Хайс, не опубликовано).

Соли трехвалентного железа дают хорошо известные окраски с фенолами (см. стр. 303), енолами,  $\alpha$ -оксикислотами и с гидроксамовыми кислотами (см. стр. 235, 237, 643). Две известные цветные реакции, проводимые в щелочной среде, а именно реакция барбитуровых кислот с солями кобальта и биуретовая реакция пептидов с медной солью, на бумаге оказываются сравнительно мало чувствительными.

Действием раствора соли и последующим вымыванием избытка реактива можно получить плохо растворимые комплексы и соли; если они бесцветны или лишь слабо окрашены, их можно проявить действием реактива, разлагающего соль или комплекс (см. «Жирные кислоты», стр. 236, «Пурин», стр. 509).

Интересны реакции, которые дает нитропруссид натрия или некоторые другие цианистые комплексы железа с аминами (Лист, см. также *Д* 95), карбонильными соединениями (*Д* 282), сероводородом и органическими сульфгидрильными производными (*Д* 162). Пентацианоаквоферроат натрия  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ , содержащийся в реактиве Гроте (*Д* 11), при pH 6 дает с веществами, содержащими тионовые группировки, синее окраши-

<sup>1)</sup> В случае адреналина и тиамина (см. стр. 606) возникают гетероциклы. Окрашенные или флуоресцирующие продукты образуются и при других реакциях циклизации, не относящихся к окислительно-восстановительным процессам. Укажем, например, на проявление N-метиламиноокислот *n*-нитробензоилхлоридом с образованием 2-(4'-нитрофенил)-3-метил-4-алкил-5-оксазолонов (см. стр. 416).

вание, а при pH 10 с веществами, содержащими сульфгидрильные группировки, — пурпурное окрашивание, как и с дисульфидами, после восстановления цианидом.

Значительное число неорганических реактивов включает несколько соединений, служащих осадителями алкалоидов; они удобны для целей хроматографии на бумаге тем, что образующиеся осадки окрашены. Чаще всего пользуются йодовисмутатом, или реактивом Драгендорфа; он дает разнообразные оттенки с четвертичными аммонийными основаниями, третичными и иногда также вторичными аминами, а также некоторыми сульфониевыми солями. Однако применимость реактива Драгендорфа и других осадителей (например, кремневольфрамовой кислоты) значительно шире; они взаимодействуют, например, со стероидами (см. стр. 341). Если же осадок с реактивом не обладает четкой окраской, то избыток реактива можно вымыть и провести в пятне реакцию с подходящим реактивом (например, восстановить фосфомолибдат).

*Реакции с хлоридами кислого характера. Галохромия и галофлуория.* Различные хлориды кислого характера, например  $\text{SbCl}_3$ ,  $\text{SbCl}_5$ ,  $\text{ZnCl}_2$ , дают окрашивание с полиенами (например, с каротиноидами, витамином А и др.) и многими другими веществами, особенно стероидами (см. стр. 334). Механизм реакции, вероятно, родственен галохромии и галофлуории, т. е. окрашиванию или флуоресценции в растворах сильных кислот, обычно исчезающему при разбавлении. По-видимому, здесь играют роль двойные связи, уже имеющиеся в соединении или образующиеся путем дегидратации. В некоторых способах вместе с кислотами добавляют альдегиды.

*Реакции с галогенами.* С веществами, содержащими группы  $-\text{NH}_2$  или  $-\text{NH}-$ , хлор реагирует с образованием хлораминов. Хлор в этих соединениях связан лабильно, поэтому может выделять йод из йодидов (см. стр. 413). Более избирательной является реакция Фучика и Коржистека, основанная на хлорировании кумаринов и других соединений с последующим подщелачиванием (см. стр. 328).

Наибольшее значение, однако, имеют реакции с йодом, которые в зависимости от способа проведения и возникающего окрашивания могут относиться и к реакциям неспецифичным, и к реакциям весьма специфичным. Значительное число органических соединений можно проявлять при помощи паров йода или бензинового или спиртового раствора йода; при этом образуются пятна с окраской от желтой до коричневой (Брант; Марини-Беттоло-Маркони и Гуарино). Такие вещества, как тиамин или холин, дают особенно интенсивное краснокоричневое окрашивание. Удобство проявления с помощью йода заключается в том, что в большинстве случаев происходит лишь обратимое образование адсорбционного соединения, так что после улетучивания йода можно воспользоваться еще каким-либо иным способом проявления; однако некоторые вещества дают устойчивые соединения. Пятна с лабильно связанным йодом можно сделать еще лучше видимыми при помощи опрыскивания раствором крахмала. Несколько веществ самой разнообразной химической природы дают с йодом синее окрашивание. Например, наряду с крахмалом, окраску дают некоторые стероиды (см. стр. 340).

### Образование азокрасителей

Проявляемое вещество может представлять собой активный или пассивный компонент в азосочетании. Первичные ароматические амины можно диазотировать на бумаге, нитросоединения можно подвергнуть такой же

обработке после восстановления и удаления избытка восстановителя. Сочетание затем можно провести с нафтолами, нафтиламинами или лучше всего с *N*-1-нафтилэтилендиамином (*Д* 108).

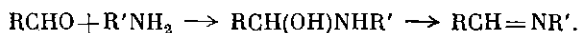
Опрыскивание раствором диазониевой соли особенно пригодно для проявления фенолов и производных имидазола. В то время как для сочетания соли диазония с ароматическим амином оптимальные значения pH составляют 3,5—7,0, фенолы и имидазолы образуют азокрасители скорее в щелочной среде, которую чаще всего создают с помощью раствора соды или буферных растворов. К наиболее часто применяемым для диазотирования аминам относятся *n*-нитроанилин, сульфаниловая кислота и сульфаниламид (реактив Паули), *n*-броманилин и бензидин. Можно пользоваться также готовыми стабилизированными солями диазония, имеющимися в продаже. Азокрасители — производные бис-диазотированного бензидина нередко отличаются интенсивной флуоресценцией (*Д* 52; Витек). Алифатические амины хотя и конденсируются с солями диазония в диазоимины (Витек), однако не обладают четко выраженной окраской.

Для того чтобы имидазольное производное могло вступать в сочетание, должно быть свободным положение  $N_1$ . Меркантогруппа в положении  $S_2$  способствует интенсивности окраски (эрготионейн).

Мы не касаемся здесь ближе вопроса о структурных особенностях, обуславливающих возможность сочетания и окраски образующихся красителей, так как подробные сведения можно найти в руководствах по химии красящих веществ.

### Образование шиффовых оснований и индофенолов

Реакция между первичным амином и альдегидами обычно протекает следующим образом:



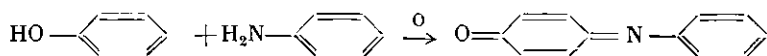
На образовании шиффовых оснований основано значительное число способов проявления аминов с помощью ароматических альдегидов, особенно *n*-диметиламинобензальдегида (реактив Эрлиха). Нитросоединения предварительно восстанавливают на бумаге (например, хлористым оловом). Особый пример реакции индола с формальдегидом или с *n*-диметиламинобензальдегидом обсуждается ниже (см. стр. 572).

Альдегиды и кетоны можно проявлять с помощью арилгидразинов или перед хроматографированием переводить в гидразоны. Чаще всего пользуются 2,4-динитрофенилгидразонами (стр. 227).

Два весьма важных способа открытия основываются на образовании шиффовых оснований, но альдегидная группа при этом образуется лишь в процессе реакции. Это — проявление сахаров при помощи ароматических аминов в кислой среде (см. стр. 268) и реакция Кенига для проявления пиридиновых оснований (см. стр. 562). Реакции, аналогичные образованию шиффовых оснований, лежат также в основе проявления аминокислот нингидрином, аллоксаном и изатином (см. стр. 407). Во многих случаях при конденсации аминов с карбонильными соединениями образуются устойчивые гетероциклы, например из дикетонов или  $\alpha$ -кетокислот и *o*-фенилендиамина получаются флуоресцирующие производные хиноксалина (см. стр. 251).

Фенолы со свободным *пара*-положением и ароматические амины при совместном окислении в растворе дают индофенолы (обычно окрашенные

в синий цвет в кислой и в красный цвет в щелочной среде):

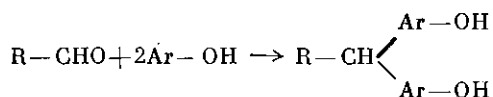


В качестве амина можно использовать 4-аминоантипирин. До некоторой степени родственная реакция протекает при образовании красного окрашивания, которое 1-нитрозо-2-нафтол дает в азотнокислой среде с фенолами, замещенными в положении 4 (см. стр. 303 и 415). Подобный же механизм можно предполагать и для реактива Миллона на фенолы, содержащего ионы ртути и нитрита.

Для хроматографии на бумаге имеют значение те реакции, при которых окислительный реактив не применяют, но одно из конденсирующихся веществ вводят уже в окисленной форме. Сюда относятся реактив Гиббса на фенолы, т. е. 2,6-дихлорхинон-4-хлоримин и его аналог с двумя атомами брома (см. стр. 303). Для проявления аминов можно применять хиноны, например хлоранил (2,3,5,6-тетрахлорбензохинон; Криппа) или 1,2-нафтохинон-4-сульфонат, который реагирует с ароматическими аминами и в щелочной среде с аминокислотами с отщеплением сульфогруппы.

### Образование арилметанов

При конденсации альдегидов с фенолами возникают окрашенные соединения. Предполагается, что первичной реакцией является образование диарилметанов, которые далее окисляются в производные хинона:



В хроматографии на бумаге особое значение приобрели реакции фенолов (например, нафторезорцина и др.) с фурфуролом и его производными, образующимися при дегидратации сахаров в кислой среде.

### Реакции активной метиленовой группы

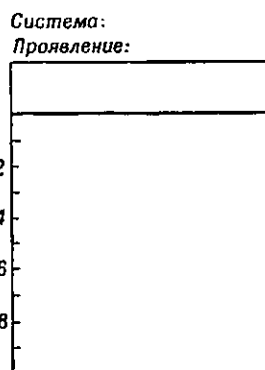
Из значительного числа реакций, в которых участвуют соединения, содержащие группу  $\text{CH}_2\text{CO}-$  или  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ , для хроматографии на бумаге особенное значение приобрела пока реакция с *m*-динитробензолом, специально обсуждаемая в разделе, посвященном стероидам (см. стр. 341 и 367). Для проявления кетонов применяли также реакцию активной метиленовой группы с ароматическими альдегидами. Хроматографированию были подвергнуты образующиеся продукты (Ментцер и сотрудики).

### ХРАНЕНИЕ ХРОМАТОГРАММ НА БУМАГЕ И ЗАПИСЬ ДАННЫХ

Хроматография на бумаге с применением регистрирующих методов, например полярографии, обладает тем преимуществом, что бумагу, на которой был проведен анализ, можно сохранять. Это может иметь значение для возможной более поздней интерпретации данных. При серийных анализах, где сохранение всех хроматограмм занимало бы слишком много места, обычно достаточно прочесть и записать результат и в случае

необходимости внести в протокол эскиз хроматограммы (рис. 88). При методах проявления, связанных с разрушением хроматограммы (например, при проявлении с помощью концентрированной серной кислоты), или при наличии летучих продуктов хроматограмму, разумеется, сохранить нельзя. Хроматограммы, которые с течением времени бледнеют, иногда удается сохранять окрашенными дольше, предохраняя их слоем лака (см., например, работы Адамса и Стюарта или Барроллье) или пропитывая парафином; в некоторых случаях окраску можно зафиксировать химическими способами (см. Д 113).

Фотографируя хроматограмму и сохраняя фотографии, удается сэкономить место и использовать фотографии для возможной последующей



Р и с. 88. Бланк для протоколирования вида хроматограмм (Мацек).

количественной оценки даже в случае очень летучих веществ (Прохазка; Теннис и Кольб). Автоматическая фотометрическая запись (см. стр. 185 и рис. 227) также очень удобна для сохранения.

Точное обозначение оттенков пятен можно осуществить сравнением с печатными таблицами цветов или атласами (Фиалова).

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ПРОЯВЛЕНИЯ

Для проявления можно пользоваться ферментативными реакциями, а также жизненными отправлениями целых организмов или их органов. В принципе возможны три методики: а) проявление пятен *in situ* непосредственно на бумаге, б) проявление после перенесения отпечатка или после диффузии содержимого пятна в пористую среду или гель, в) анализ элюата.

### ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ

*Исследование субстрата.* Опрыскивая хроматограмму препаратом фермента и выдерживая ее в присутствии влаги и при подходящей температуре, можно проявлять те вещества, которые при действии фермента переходят в хромогенные или флуоресцирующие вещества. Оклэр и Паттон таким способом доказали наличие *D*-аминокислоты действием специфической оксидазы и реакцией на образовавшуюся кетокислоту. В литературе чаще встречается обратный способ применения ферментов, когда после воздействия специфического фермента пятна исчезают, что и является доказательством их природы. Для подтверждения правильности идентификации пятна можно определять содержание в нем вещества манометрически с применением специфических ферментов.

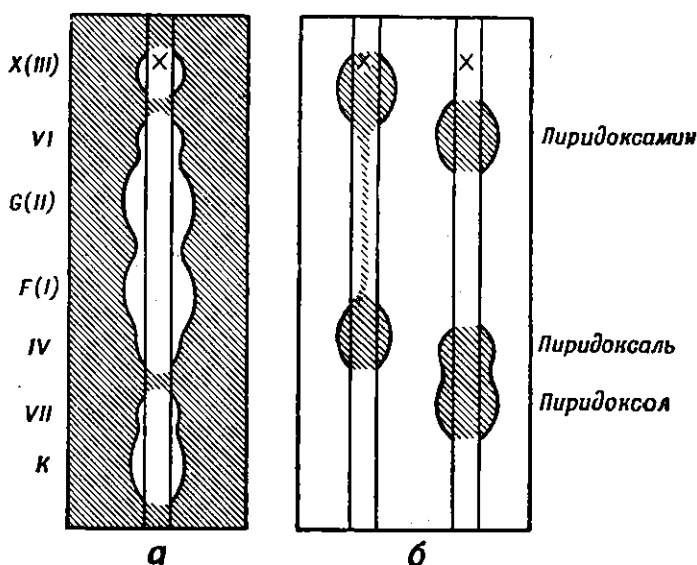
*Проявление ферментов.* Инкубацию проводят либо непосредственно на увлажненной бумаге, либо на подложенном агаре, либо, наконец, в элюате (см. стр. 500). Если пытаются манометрически установить нали-

чие ферментативной или коферментной активности в элюатах из поперечных вырезок, сделанных вслепую, обычно нет необходимости в предварительной элюции, так как при основательном встряхивании в сосудах прибора Варбурга вымывание происходит весьма полно.

*Проявление коферментов, активаторов и ингибиторов.* Примером может служить открытие ингибиторов холинэстеразы (Гейдж); см. также стр. 657.

### БИОАВТОГРАФИЯ НА ОСНОВЕ РОСТА ИЛИ ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА <sup>1)</sup>

Ростовой пробой (тестом) можно пользоваться для тех веществ, которые стимулируют или подавляют рост организмов, особенно бактерий и дрожжевых грибов, некоторых видов плесеней (см., например, работу



Р и с. 89. Примеры биоавтографического проявления.

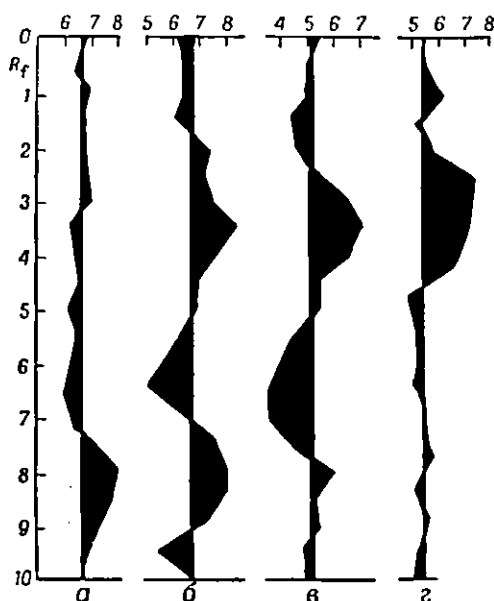
*а* — обнаружение ингибирующих веществ: увлажненную полоску хроматограммы прикладывают к засеянной агаровой пластинке. После инкубации можно видеть, что микробы не развивались около тех мест, где расположены пятна пенициллина.  
*б* — обнаружение ростовых факторов: хроматограмму витамина  $B_6$  прикладывают к агаровой пластинке, не содержащей исследуемого витамина и засеянной дрожжами, требующими для своего роста витамина  $B_6$ . На месте пятен витамина  $B_6$  обнаруживается рост грибка.

Дальстрёма и сотрудников) или высших растений. Биоавтографический метод был разработан Гудоллом и Леви для разделения пенициллинов; для ростовых факторов его предложили Уинстен и Эйген и др. Принцип биоавтографического метода показан на рис. 89. Биоавтографическое проявление и определение применяют преимущественно для тех веществ, для которых цветные реакции слишком мало чувствительны либо отсутствуют вообще. Комбинация хроматографии на бумаге с биоавтографией

<sup>1)</sup> В основу этого раздела положен текст, написанный для первого издания В. Шухом.

имеет также большое вспомогательное значение для проявления неидентифицированных веществ.

Для проявления ростовых факторов (например, витаминов) хроматограмму накладывают на агаровую подложку, на которой посеян чувствительный микроб и которая содержит питательные вещества. Микроорганизмы вырастут лишь в тех местах, где расположены пятна витаминов и в непосредственной близости от них. В случае ингибирующих веществ (например, антибиотиков) чувствительный микроб не будет развиваться в местах, соответствующих пятнам таких веществ.



Р и с. 90. Хроматография растительных ростовых и ингибирующих факторов (Лук-вилл).

Ось абсцисс — длины колеоптиля в миллиметрах. Подавление роста показано слева, стимулирование — справа. а — водная вытяжка эндосперма; б — эфирная вытяжка спаржевой капусты; в — водная вытяжка плода спаржи; г — индолилуксусная кислота, взятая в качестве эталона.

Для агара можно воспользоваться чашками Петри, хотя их малая величина является неудобством. Поэтому пользуются специальными чашками или рамкой с пластинкой, например прибором, изображенным на рис. 232 (стр. 641). Рецепты подложек для биоавтографии указаны здесь лишь на отдельных примерах (Д 170 и Д 176), поэтому приводятся ссылки на оригинальную литературу и на монографию Дьёрдя, посвященную микробиологическому определению витаминов. Отливание пластины из агара следует проводить при такой температуре, чтобы микроорганизмы не утратили жизнеспособности, но чтобы агар был достаточно текуч. Некоторые авторы рекомендуют отливать двуслойные пластины, верхний, более тонкий слой которых содержит микроорганизмы. Хроматограммы обычно могут быть нестерильными, особенно в случае подложки, на которой некоторые организмы развиваются плохо. Для медленно растущих стандартных микроорганизмов, например *Mycobacterium tuberculosis*, стерильность необходима. Стерилизовать можно окисью этилена (Чериотти и сотрудини).

Целесообразно накладывать на агар узкие полоски, вырезанные из хроматограмм в продольном направлении, так как на больших поверхностях колонии загрязняющих микробов могут вызывать нарушения. Некоторые авторы оставляют бумагу на агаре лишь в течение 5—10 мин, другие — более длительное время, иногда в течение всего времени инкубации. Второй способ хотя и кажется более чувствительным, однако на агаровой пластинке может наблюдаться рост микроорганизмов. Для количественных определений необходимо, чтобы в термостате, в котором проводят инкубацию, не возникали местные разности температур.

Форму пятен на агаре можно перерисовать на бумагу или сфотографировать. Контраст удается повысить, фотографируя при косом заднем освещении или в падающем поляризованном свете (Дрейк) на черном фоне, прибавляя иногда к питательной среде индикатор — соли тетразолия (Найкол и сотрудники) и другие вещества, меняющие окраску при действии микроорганизмов.

Следует упомянуть также о количественной оценке биоавтограмм. Самый простой и наиболее часто применяемый способ заключается в расчете по диаметру зон торможения, который приблизительно пропорционален количеству вещества в пятне. Количество вещества можно также установить с помощью ростовой пробы в жидкой среде после вырезания из хроматограммы и помещения в пробирку (Харрисон); хроматограмму разрезают на полоски одинаковой ширины или проявляют половину хроматограммы на агаровой пластине и по результатам проявления вырезают пятна из другой половины. Более подробно см. в главе, посвященной антибиотикам и витаминам. Об испытании ростовых и ингибирующих факторов упоминается также в главе об индолах (см. стр. 573 и рис. 90).

#### ДРУГИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

Пятна или зоны, в которых сосредоточена гормональная активность, можно обнаружить с помощью биологической пробы после извлечения из хроматограммы. На этом принципе было основано определение положения веществ, обладающих адренокортикотропной активностью, на хроматограмме препарата АКГГ или пептидных продуктов его расщепления. Альдостерон также был обнаружен при помощи чувствительного изотопного метода (Гранди и сотрудники).

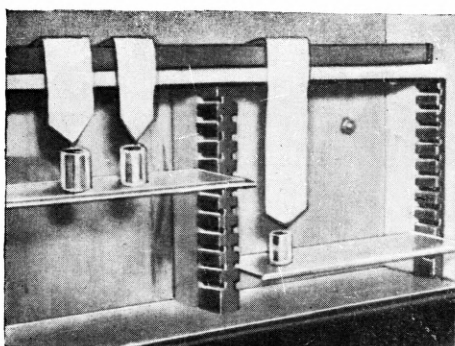
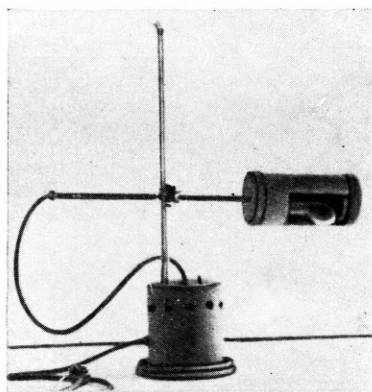
Чувствительная биологическая проба позволяет также обнаружить присутствие посредников вегетативной нервной системы и родственных веществ, например ацетилхолина (спинная мышца пиявки, брюшная мышца лягушки), гистамина и брадикинина (кишечник морской свинки), адреналина.

Биологически были исследованы также хроматограммы, на которых пытались найти составные части экстрактов из растений, способствующие развитию глиста *Heterodera rostochiensis*, паразитирующего на картофеле (Масси и Нил) и прорастанию незеленого растения заразики *Orobanchе minor* (Браун и сотрудники).

Подобно тому как ранее при колоночной хроматографии, при помощи хроматографии на бумаге были определены биологически активные зоны, содержащие половые приманки, выделенные из самок бабочки: хроматограмму перемещали в продольном направлении мимо сидящего самца и наблюдали его реакцию (Макино и сотрудники). Вещества, обладающие запахом, можно также определять на хроматограммах с помощью обоня-

Р и с. 86. Устройство для изучения хроматограмм в ультрафиолетовом свете.

В нижней части штатива помещена катушка, в качестве источника света использована ртутная разрядная трубка Филора НРВ.

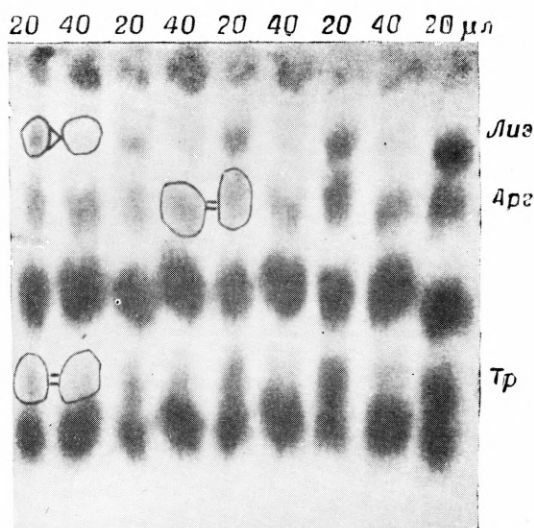


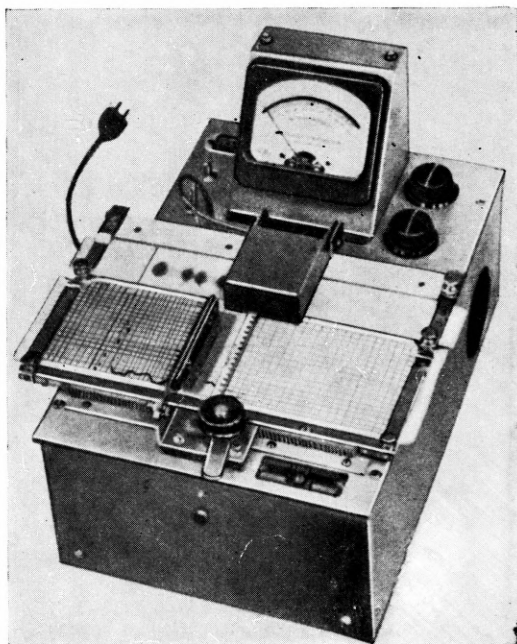
Р и с. 92. Шкаф для элюирования вырезов из хроматограмм (по Мелону).

Спереди шкаф закрывается задвижными стеклянными дверцами. Желоба изготовлены из винида, приемниками служат обрезанные ампулки, помещенные на полочке, высоту которой можно изменять в зависимости от длины вырезки.

Р и с. 96. Количественный анализ модифицированным методом эталонных добавок (по Кирби-Берри и Кейну; Женишек).

На линию старта нанесены поочередно пробы пота в 20 и 40  $\mu$ л. К пробам в 20  $\mu$ л добавлено по 1,2, 4, 6 и 8  $\mu$ г лизина, аргинина и треонина. Сравнивали интенсивность окраски и величину поверхности проб пота в 40  $\mu$ л и проб пота в 20  $\mu$ л, содержащих добавки аминокислот. Например, пятна аргинина в пробах 40  $\mu$ л приблизительно одинаковы с пятнами в пробах пота в 20  $\mu$ л с содержанием 4  $\mu$ г аргинина. Следовательно, в 20  $\mu$ л (40—20) пота содержится 4  $\mu$ г аргинина, или 200  $\mu$ г в 1 мл пота.



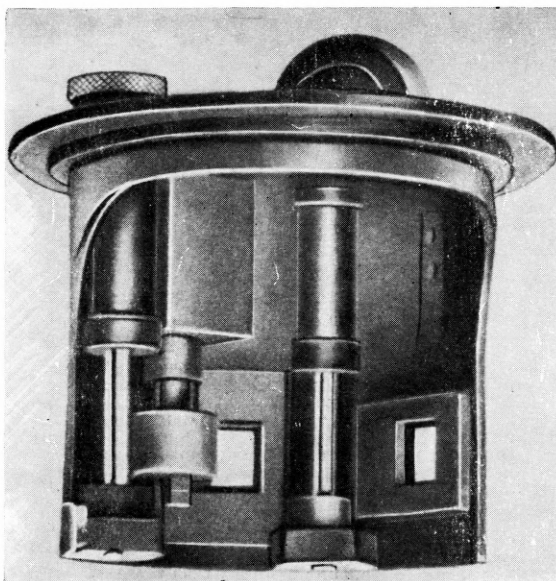


Р и с. 98. Прибор фирмы «Фото-  
вольт» для фотометрирования хро-  
матограмм и электроферограмм.

Полоску перемещают вдоль фотоэлемента  
вручную с помощью винта одновременно  
с перемещением миллиметровой бумаги.  
Поглощение, отсчитываемое на верхней  
шкале гальванометра, можно сразу при  
помощи линейки нанести на график.

Р и с. 99. Дополнительное устрой-  
ство к кварцевому спектрофотометру  
Бекмана для фотометрирования и  
измерения спектров непосредственно  
на хроматограмме (Эгер).

Латунную коробку (длина 14 см, высота  
9,5 см, ширина 9,5 см) помещают между  
монохроматором и фотоэлементом вместо  
кюветы. Коробка снабжена отверстиями  
спереди и сзади, а также отверстием на-  
верху, в которое вставлен цилиндр, пока-  
занный на рисунке. Хроматографическую  
бумагу натягивают между катушками и  
расщепленной осью и пропускают между  
ведущей рамкой и окошечком. Оси вра-  
щаются благодаря трению о резиновый  
валик. В окошечко для сравнения встав-  
лен кусок чистой бумаги. На верхнем  
конце валика находится рукоятка, две  
поворотных кнопки осей и индикаторная  
кнопка стержня.



ния. Производные паратиона были охарактеризованы по их токсичности для мух (Меткаф и Марч).

Для иммунологического обнаружения антигенов и антител можно воспользоваться способом образования осадочных линий в агаре, который особенно часто используется в электрофорезе на бумаге.

## Элюция с бумаги <sup>1)</sup>

И. М. Хайс

Раздел об элюции с бумаги мы помещаем в этой главе, поскольку элюция с бумаги часто предшествует количественному определению. Кроме того, вырезки из хроматограмм элюируют в тех случаях, когда необходима дальнейшая обработка (выделение веществ, повторное хроматографирование, гидролиз и т. п.). Если нежелательно разрезать хроматограмму вслепую на отрезки одинаковой длины, пытаются разрезать ее по окраске или флуоресценции пятен, либо проявляют

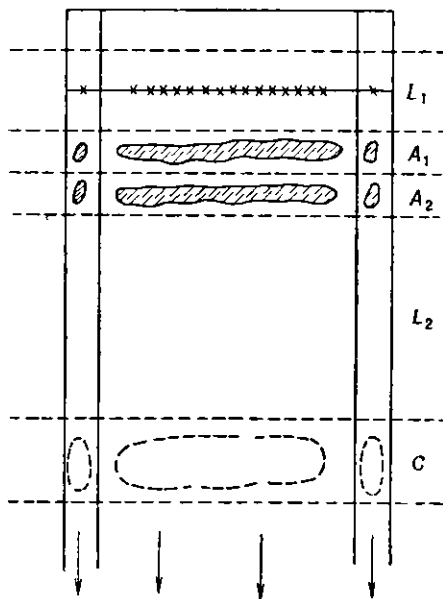


Рис. 91. Разметка хроматограммы для элюирования веществ из бумаги (Форсайт).

В первую очередь отрезают и проявляют крайние полоски; в зависимости от положения пятен вырезают срединные непроявленные пояса. В случае широких листов бумаги можно вырезать еще узкую полоску из середины. Флуоресцирующие или окрашенные вещества не требуют такого предварительного проявления. На рисунке приведен пример количественной хроматографии на бумаге экстракта бобов какао:  $L_1$  — комплексные лейкоцианидины;  $L_2$  — лейкоцианидин;  $A_1$  — моногликозид цианидина;  $A_2$  — арабиногликозид цианидина;  $C$  — эпикатехин.

хроматограмму или часть ее. Если проявляют всю хроматограмму целиком, то применяют такие способы, при которых вещество не разрушается или по крайней мере сохраняется хотя бы частично (фотографирование в ультрафиолетовых лучах, радиометрические методы, проявление разбавленными растворами реактивов). В противном случае чаще всего хроматограмму разрезают в продольном направлении, отрезанную полоску проявляют и, руководствуясь ею, разрезают остальную часть на соответствующие отрезки в поперечном направлении. Для выделения больших количеств веществ на стартовую линию бумаги наносят либо большое количество пятен исследуемой смеси, либо смесь наносят сплошной тонкой

<sup>1)</sup> Этот раздел основан на тексте, написанном для первого издания К. Славиком и В. Йирачеком.

чертой и проявляют только крайние полосы хроматограммы, как показано на рис. 91.

Для элюции выбирают такой растворитель, в котором разделенные вещества хорошо растворимы и устойчивы. Вода (если необходимо, с добавкой кислоты или аммиака) служит прекрасным растворителем, если только удовлетворяет обоим этим условиям. Если необходимо воспользоваться менее полярными растворителями, следует принимать во внимание адсорбцию вещества.

В большинстве случаев из бумаги вымывается много загрязняющих веществ; поэтому для микропрепаративных целей или для спектрального анализа следует бумагу перед хроматографированием промыть и притом именно тем растворителем, который предполагают применить для элюции (о промывании бумаги см. стр. 104). О полноте элюирования при всех способах судят, проявляя отрезки промытой хроматограммы.

Наиболее простой способ элюции заключается в погружении отрезка хроматограммы в элюирующий раствор. Спустя несколько часов жидкость сливают. Для улучшения диффузии раствор необходимо время от времени перемешивать, а в некоторых случаях и взбалтывать на трясушке, отделяя затем волокна бумаги центрифугированием. После этого бумагу экстрагируют дополнительным объемом элюирующей жидкости по крайней мере еще один раз.

В то время как при описанной методике объем элюирующего раствора может оказаться значительным, «хроматографическое» капиллярное элюирование пропусканием жидкости вдоль бумаги сверху вниз позволяет ограничиваться меньшим объемом. Вырезку помещают верхним концом в сосуд с растворителем. Вырезку можно зажать между двумя стеклянными пластинками или прикрепить к бумаге, которая в таком случае будет погружена в сосуд с растворителем. Элюат можно собирать с нижнего заостренного конца в подставленный сосуд либо прямо в капилляр, соприкасающийся с кончиком бумаги. Если течение растворителя по вырезке правильное (что выполняется не всегда) и если вещество вымывается с фронтом растворителя, для элюции достаточен небольшой объем растворителя. Славик (частное сообщение) вкладывает острия полосок в небольшие воронки, вытянутые из стеклянной трубки диаметром около 7 мм и помещенные над часовыми стеклами. Полоска бумаги должна пропитаться элюирующим растворителем, затем на нее накапывают еще немного растворителя из пипетки. Некоторые авторы свертывают вырезку и элюируют, помещая в трубочку, наполненную ватой (Накабаяси). Если подвергаемая промыванию полоска длинна или если растворитель летуч, элюцию следует проводить в плотно закрывающемся сосуде, чтобы ограничить испарение.

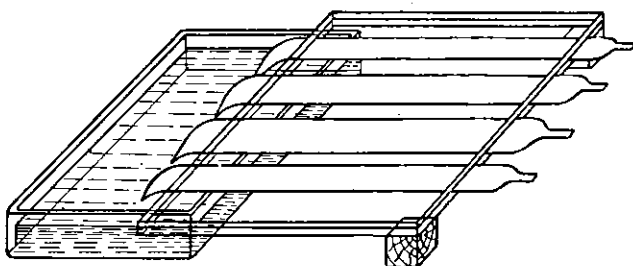
Для элюирования удобен шкаф с полками, которые можно устанавливать на разной высоте (Мелоун, частное сообщение) и одновременно элюировать значительное число вырезок различной длины (рис. 92).

В еще более эффективном способе вырезку зажимают между двумя пластинками или помещают в сосуд, закрываемый крышкой так, чтобы кончик бумаги выступал наружу. Растворитель испаряется с кончика бумаги, и элюат концентрируется. По окончании кончик бумаги отрезают и промывают небольшим объемом растворителя (рис. 93, по Деккеру).

Если вещества достаточно устойчивы к повышенной температуре, элюцию можно проводить при нагревании. Для малых объемов достаточно укрепить вырезку в пробирке, снабженной обратным холодильником. Конденсирующаяся жидкость омывает вырезку (рис. 94, по Борелю с сотрудниками). Льюис рекомендует промывать током водяного пара, поме-

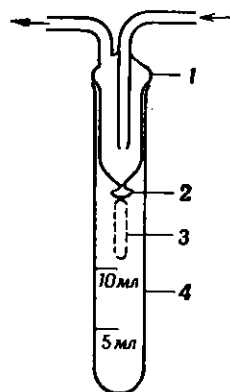
щая вырезку в коническую пробирку с доньшком из пористого стекла и собирая конденсат проникающих паров в маленькую пробирку.

Водные элюаты удобнее упаривать в сосудах с несмачивающимися стенками (политен, силиконированное стекло), с одной стороны, из-за того, что жидкость в процессе выпаривания концентрируется на постоянно



Р и с. 93. Элюирование из полосок бумаги (по Деккеру).

Извлекающая жидкость впитывается в полоски бумаги, расположенные между двумя стеклянными пластинками, испаряется на конце их и переносит к концам полосок содержащиеся вещества. Эти концы полосок обрезают и окончательно извлекают в маленьких воронках.



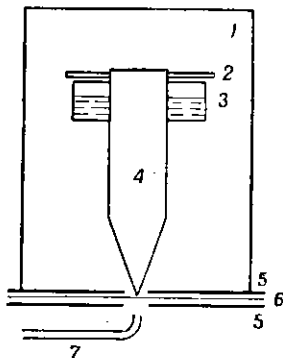
Р и с. 94. Экстрагирование из полосок бумаги при нагревании с обратным холодильником (Борель и сотрудники).

1 — водяной холодильник; 2 — стеклянный крючок; 3 — экстрагируемая бумага (не должна касаться стенок); 4 — пробирка, содержащая 4,5 мл воды.

уменьшающейся поверхности (не поднимаясь по стенкам), а с другой стороны, потому, что ограничивается адсорбция. Кроме того, удобными оказались чашечки, полученные при поперечном разрезании ампул для инъекций (см. рис. 92).

#### Непосредственное элюирование на другую хроматограмму

Элюирование с одной хроматограммы и нанесение на другую можно объединить, налагая вырезку непосредственно одним концом на стартовую линию второй хроматограммы и пропуская элюирующий растворитель. В месте соприкосновения испарение растворителя ускоряют сильным током воздуха, нагреванием (Гири и Рао) или и тем и другим одновременно. Этот способ был описан



Р и с. 95. Вымывание из одной полоски непосредственно на стартовую линию новой хроматограммы (Мур и Бойлен).

1 — камера для элюирования; 2 — стеклянные стерженьки; 3 — желоб с водой; 4 — полоска бумаги; 5 — стеклянные пластинки; 6 — новая фильтровальная бумага; 7 — подвод воздуха для ускорения испарения воды.

несколькими авторами независимо друг от друга. Устройство по Муру и Бойлену показано на рис. 95.

## Количественное определение

И. М. Хайс, П. Зуман

Число специфичных способов открытия веществ в сложных смесях ограничено. Поэтому в аналитической химии все большее значение приобретают те способы, в которых вещества сначала разделяют и тем самым обеспечивают возможность специфичного определения методом, который сам по себе не является достаточно избирательным. Среди всех таких методов хроматография на бумаге благодаря простоте оборудования и незначительным количествам используемых для анализа веществ обладает особым преимуществом.

Количественное определение веществ, предварительно разделенных хроматографированием на бумаге, можно проводить как после вымывания с бумаги, так и непосредственно в волокнах бумаги (*in situ*). В зависимости от этого в данном разделе будут рассмотрены принципы методов; конкретные примеры можно найти в специальной части книги. Среди методов определения веществ, вымытых с бумаги, несколько особое положение занимает проточная хроматография, которая вообще в хроматографии на бумаге применяется редко, но в этом случае в соединении, например, с непрерывным полярографическим контролем может приобрести определенное значение и притом даже как фронтальный анализ.

Основным условием для точного определения, выражаемого в абсолютных единицах, является точное отмеривание объемов пипеткой при нанесении. Об этом уже было упомянуто выше (см. стр. 98). Поскольку при работе с малыми объемами точность достигается лишь с большим трудом, в некоторых методах ограничиваются определением относительного количества веществ, соответственно рассчитывая абсолютные количества из результатов определения общего количества другим способом. При всех методах определения *in situ* результаты необходимо сравнивать с эталонными растворами, содержащими известные количества веществ, также подвергнутых хроматографированию. Иногда в качестве эталонов можно обойтись другими более доступными веществами, однако чаще всего оказывается необходимым сравнивать каждое пятно с пятном того же вещества в качестве эталона, что в случае редких веществ может оказаться неудобным. В тех способах, когда определяют вещество, вымытое из бумаги, в большинстве случаев также удобнее пользоваться эталонными образцами, так как при хроматографировании и элюировании могут наблюдаться потери. Поскольку условия, при которых протекает хроматографирование, проявление, а также элюирование, до некоторой степени меняются от хроматограммы к хроматограмме, оказывается необходимым сравнение с пятнами эталонных образцов, подвергнутых одновременному хроматографированию на том же листе бумаги. Если определению предшествовало проявление или оно являлось составной частью определения, то следует обращать внимание на равномерность распределения реактива на хроматограмме и на равномерность температуры в сушильном шкафу. Удобнее сравнивать образцы, хроматографированные на одном и том же листе, поэтому двумерная хроматография менее пригодна для количественных определений, чем одномерная.

Между измеряемой величиной (например, степенью пропускания света) и количеством вещества линейная зависимость имеет место лишь в редких

случаях. Поэтому удобнее строить калибровочные кривые, нанося различные количества эталонного вещества. Для того чтобы можно было сравнивать близкие друг к другу пробы, часто наносят также и несколько различных объемов раствора пробы.

Присутствие дополнительных компонентов в пробах из биологических материалов может обусловить изменения в разделении веществ или в ходе реакции, при помощи которой открывают или определяют данное вещество. Поэтому иногда оказывается необходимым использовать метод эталонных добавок. Поскольку, однако, как мы уже упоминали, между измеряемой величиной и количеством вещества нередко нет линейной зависимости, метод эталонных добавок приходится модифицировать, например способом, описанным на стр. 183 и показанным на рис. 96 (II 68).

Таблица 11

ОБЗОР МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Методы in situ	<div> <div>оптические<sup>а)</sup></div> <div> <div>поглощение излучения</div> <div>флуоресценция</div> </div> </div>	<div> <div>ультрафиолетового,</div> <div>видимого, инфракрасного</div> </div>
	<div> <div>электрохимические</div> <div> <div>кондуктометрия</div> <div>потенциометрия</div> <div>полярография</div> </div> </div>	
	радиометрические (см. стр. 198)	
Методы, использующие элюцию или минерализацию	<div> <div>химические, например</div> <div> <div>титрование</div> <div>ретенционный анализ</div> <div>обращенный ретенционный анализ</div> </div> </div>	
	ферментативные и биологические	

а) При использовании оптических методов измеряют:

Излучение	<div> <div>проходящее</div> <div>отраженное</div> <div>возбужденное (флуоресценцию)</div> </div>
Величина	<div> <div>интенсивность поглощения или флуоресценции</div> <div>размеры пятна</div> <div>то и другое</div> </div>
Способ	<div> <div>визуальная оценка</div> <div>объективная фотометрия с визуальным отсчетом</div> <div>автоматическая регистрация</div> </div>
Вещества	<div> <div>поглощают или флуоресцируют сами</div> <div>после проявления образуют поглощающие или флуоресцирующие продукты</div> </div>

В табл. 11 приводится обзор наиболее распространенных количественных методов. К некоторым из них необходимо дать примечания. Оценку концентрации по наблюдениям для ряда разбавлений мы считаем в лучшем случае полуколичественной и поэтому не уделяем ей особого внимания. Для того чтобы не распылять материал, в этот раздел включен ряд физических методов, которые, вероятно, могут иметь количественное значение, в то время как радиометрические и биологические методы помещены в другие разделы.

## МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ *in situ* (НЕПОСРЕДСТВЕННО НА ХРОМАТОГРАММЕ)

### ОЦЕНКА ПО РАЗМЕРАМ ПЯТНА

Уже Цвет указывал на возможность «хроматометрического» анализа при адсорбционной хроматографии на основании ширины зон. Метод не получил распространения, поскольку в колоночной хроматографии лишь в редких случаях удается выдержать стандартные условия настолько, чтобы подобное измерение было достаточно надежным. На бумаге можно одновременно хроматографировать на одном листе несколько анализируемых и эталонных проб. Если границы пятна или зоны выражены отчетливо, то по размерам пятна можно судить о количестве вещества; обычно измеряют длину или поверхность пятна. Границы размытых пятен часто лучше определять на их фотографии или фотокопии на контрастной бумаге. Мори [2] придает хроматограмме такую форму, чтобы пятно определяемого вещества приходилось на суженный участок бумаги («количественный мостик») и в этом месте измеряет длину пятна.

Некоторые затруднения при этом методе обусловлены тем, что фактическое распределение концентрации вещества в пятне не вполне соответствует вероятности распределения, но зависит также и от начального распределения в нанесенном пятне, чаще всего кольцеобразного вследствие испарения на периферии. Вытеснительное или размывающее влияние остальных составных частей пробы также изменяет распределение. Поэтому на распределение вещества в пятне хроматограммы влияет не только размер поверхности пятна на линии старта, но и объем наносимой пробы, содержание в ней балластных веществ и скорость нанесения. Поэтому все эти обстоятельства для сравниваемых случаев должны быть одинаковыми. Меры предосторожности особенно необходимы тогда, когда пятна в процессе хроматографирования остаются компактными, а для проявления берут реактив, который дает резко ограниченные пятна. Если по интенсивности окрашивания нельзя сразу судить о распределении вещества в пятне, то ошибиться очень легко. Анализ аскорбиновой кислоты по методу, предложенному Шандой (*II 136*), служит примером того, как повышается точность измерения поверхности пятна комбинированием с методом эталонных добавок.

Перед применением этого метода следует предварительно определить характер зависимости между количеством вещества и размером его пятна на хроматограмме. По Фишеру и Холмсу [1] логарифм количества вещества  $Q$  и площадь поверхности пятна  $A$  связаны приблизительно линейным соотношением  $\lg Q = kA$  ( $k$  — константа). Окерфельдт утверждает, что при повторном нанесении в одну и ту же точку имеет место соотношение  $Q = k_1A + k_2$ . Для сахаров Фаулер нашел линейную зависимость между логарифмом количества вещества и логарифмом длины пятна, которая при низких концентрациях переходит в приблизительно линейную зависимость между логарифмом количества вещества и длиной пятна. Мияки и сотрудники при подробном исследовании обнаружили, что пропорциональность между логарифмом количества вещества и логарифмом длины пятна является наиболее часто встречающейся зависимостью.

Вопреки оптимистическому взгляду Окерфельдта мы считаем определения с помощью этого метода на двумерных хроматограммах весьма неточными.

### ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА

Интенсивность окраски пятен можно приблизительно оценить визуально, сравнивая с соответствующими эталонными образцами. Удобнее сравнивать с пятнами эталонов, подвергнутых хроматографированию рядом с анализируемой пробой (Полсон и сотрудники; Браун). Наносимые точки должны быть по возможности одинаковой величины. Поэтому некоторые авторы наносят равные объемы различно разбавленных проб. Для сравнения близких друг к другу образцов можно рекомендовать метод возрастающих количеств пробы и убывающих количеств эталона, приведенный на стр. 435 (II 80).

Удобнее, если эталонная смесь будет возможно ближе по своему составу к анализируемой пробе как в отношении определяемых веществ, так и в отношении примесей, влияющих на результаты хроматографирования. Для сложных смесей, какими могут оказаться вытяжки из растительных или животных тканей, такого подобию достичь затруднительно. Поэтому был разработан модифицированный метод эталонных добавок (техасский), при котором сравнивают определенное количество анализируемой пробы с половинным количеством ее же, к которому добавляют известное количество эталона (Кирби-Берри и Кейн). В качестве примера можно привести определение креатинина в моче (II 68) или аминокислот в поте (рис. 96).

### ФОТОМЕТРИЯ

Удобно, если измеряемая величина пропорциональна количеству вещества в пятне. При фотометрии непосредственно на бумаге могут иметь место несколько причин нелинейности:

1) Относительные потери в процессе хроматографирования оказываются независимыми от количества пробы.

2) Реакция проявления протекает так, что количество продукта реакции непропорционально количеству вещества; причиной может служить относительный недостаток реактива.

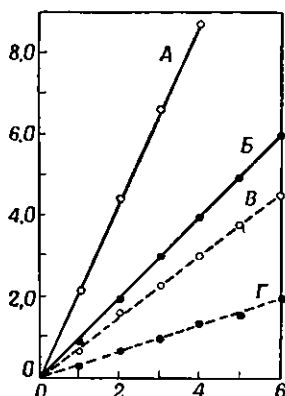
3) Между экстинкцией (оптической плотностью, поглощением,  $\lg \Phi_0/\Phi$ , где  $\Phi$  — световой поток), или логарифмом коэффициента отражения, и концентрацией поглощающего вещества нет линейного соотношения (см. далее).

4) Отклонения гальванометра обычно пропорциональны коэффициенту поглощения, но не его логарифму, т. е. экстинкции. Пока мы ограничиваемся узкой областью концентраций, этими причинами нелинейности можно пренебречь, однако всегда удобнее построить калибровочную кривую.

Для преломления и отражения в бумаге (Прайс [1, 3]) поглощение определенным количеством поглощающего вещества выше, нежели тогда, когда вещество распределено в гомогенной среде (гиперхромное поглощение). Отклонения от закона Ламберта — Бера обусловлены, кроме того, еще тем, что между толщиной слоя поглощающего вещества на волокнах и экстинкцией нет простого линейного соотношения. Для проходящего света оказалось удобным придавать бумаге прозрачность с помощью жидкости или лака с коэффициентом преломления, близким к коэффициенту преломления целлюлозы. В таком случае доля гиперхромной абсорбции понижается (рис. 97).

Результатом такого нелинейного соотношения между поверхностной концентрацией вещества и экстинкцией оказывается тот факт, что одно и то же количество вещества при распределении на большей поверхности поглощает сильнее, нежели на меньшей. Высокие поверхностные концентрации неблагоприятны для оценки.

Если путем непосредственного отсчета отклонений гальванометра получают кривую зависимости коэффициента поглощения (отношения  $\Phi_0/\Phi$ )



Р и с. 97. Влияние промасливания бумаги на отношение между светопоглощением бумаги, содержащей вещество, и чистой бумаги (Прайс и сотрудники).

Ось абсцисс: число слоев толстой бумаги ватман 11. Ось ординат: оптическая плотность. А — 0,016  $\mu$ молей адениловой кислоты на 1 см<sup>2</sup> в каждом слое сухой бумаги; В — чистая сухая бумага; В — то же, что и А, но бумага пропитана парафиновым маслом; Г — чистая бумага, пропитанная парафиновым маслом. Хотя разность поглощений В — Г меньше, нежели на сухих бумагах А — В (снижение гиперхромной абсорбции), однако отношение В : Г более выгодное. Одновременно кривая зависимости поглощения от концентрации приближается к линейной зависимости (на рисунке не показано).

от положения стрелки, ее следует превратить в зависимость экстинкции, измеряя по всем точкам и нанося на график логарифмы измеренных величин. В некоторых приборах можно получить непосредственно кривую зависимости экстинкции от положения стрелки (Лоуренс; Грубофер).

Общим недостатком всех методов, основанных на измерении поглощения проходящего света, является то обстоятельство, что бумага не обладает равномерной прозрачностью. Для отраженного света неравномерность влияет меньше, если, однако, поверхность бумаги не повреждена. Удобнее сатинированные бумаги (см. стр. 102). Некоторые авторы (Густавсон и сотрудники, Кейл) сначала фотографируют хроматограмму в проходящем свете и подвергают фотометрированию лишь негатив. В этом случае следует принимать во внимание соотношение между интенсивностью почернения и интенсивностью света, падающего на фотографическую пленку.

### Фотометрия всего пятна или его центральной части

Наложение непрозрачной черной «маски», закрывающей всю хроматограмму, за исключением отверстия, через которое можно рассматривать пятно определяемого вещества, позволяет измерить поглощение всего пятна (Боуден и сотрудники, Полсон и сотрудники). Подобный же метод в применении к отраженному свету при однородном рассеянном освещении позволяет по Гаспаричу (частное сообщение) достичь очень высокой точности.

Определение можно производить также, измеряя поглощение центральной частью пятна (Паладини и Лелуар). Разумеется, следует наносить точки одинаковой величины. Были получены, например, хроматограммы эквимолекулярной эталонной смеси аминокислот и исследуемой пробы при различных разбавлениях (Блок), рассчитана средняя плотность окраски (экстинкция) центральной части пятен анализируемых ами-

нокислот в эталонном ряду и отнесена к средней плотности окраски центров всех пятен эталонного ряда («цветовое отношение эталона»). Аналогично было рассчитано «цветовое отношение» анализируемого образца и его отношение к цветовому отношению эталона. Из последнего можно рассчитать долю соответствующей аминокислоты в анализируемой смеси.

### Постепенное измерение при передвижении вдоль щели

В этой группе методов полосу, вырезанную из хроматограммы, перемещают вдоль щели, длина которой должна быть больше ширины пятен. Слишком узкая щель излишне чувствительна к неоднородностям бумаги; напротив, слишком широкая щель не позволяет уловить детали. Интенсивность света, проходящего через щель, измеряют при помощи фотоэлемента. Величины измеряемой экстинкции наносят на график или регистрируют автоматически. Аналогично можно измерять интенсивность отраженного света или свет, прошедший через фотонегатив хроматограммы. Величину поверхности между участком кривой, соответствующим максимуму, и осью можно измерить планиметрически или оценить сравнением с калибровочной кривой. Если кривая выражает зависимость экстинкции от положения и если выполняется закон Ламберта — Бера, поверхность под максимумом кривой пропорциональна количеству вещества в пятне. Если эти условия не выполняются, следует либо скорректировать кривую и лишь после этого измерять поверхности, заключенные под отдельными максимумами, либо проводить сравнение с одновременно хроматографированными различными количествами эталонов, близкими к их концентрации в анализируемой пробе и обладающими аналогичной формой пятна. Совпадающие максимумы можно оценить, либо опуская перпендикуляры из точек минимума на основную ось, либо вписывая в максимумы колоколообразную кривую.

Фотометрированием (в видимой области) полоски бумаги, непрерывно перемещаемой с автоматической регистрацией, или измерением через правильные промежутки (без регистрации) в настоящее время пользуются особенно часто при электрофорезе на бумаге; в некоторых странах для этой цели промышленность выпускает фотометры (рис. 98). В литературе можно найти несколько десятков описаний различных приборов этого рода, из которых мы сошлемся хотя бы на работы следующих авторов: Булл с сотр., Фосдик и Блэкуэлл, Рокланд и Данн, Мюллер и Клегг [1], Феллеги и Слама, Зульзер и Хегль, Грюттер. Для автоматической регистрации можно воспользоваться, например, механической частью полярографа (Мпеттиен и Моисю; Дупал с сотрудниками) или частями электрокардиографа (Гаттнер). При отсчете в выбранных интервалах нередко можно измерять непосредственно экстинкцию. Здесь также не угрожает опасность запаздывания измерительной системы (как, например, при применении неудачно демпфированного гальванометра), способствующего тому, что в некоторых автоматических системах имеет место сглаживание максимумов. Преимущества автоматических устройств заключаются в том, что они дают аутентичную запись и позволяют экономить время. При автоматических и неавтоматических измерениях, однако, необходимо планиметрировать или взвешивать пятна. Для экономии времени при этом процессе были предложены приборы с автоматическим интегрированием (например, Дэrrум и Галфорд, Полиг и Пинтерик). Женишек и Лаутнер пользуются автоматической непрерывной подачей, но производят отсчеты визуально через правильные промежутки времени по звуковым сигналам.

В ультрафиолетовой области чаще всего пользуются дополнительным устройством к кварцевому спектрофотометру, которое позволяет осуществлять продвижение полоски бумаги в том месте, где обычно помещается кювета (Парк и Дэвис; Эджер, Трайбер и Корен; см. рис. 99). Измерения можно производить при произвольно выбранной длине волны. Другое устройство описано, например, Хасимото и Мори [1]; см. также Мори [3]. Менее удобно работать на приборе Цейсса с вращающимся сектором (Хайс и сотрудники [1]).

Для области длин волн 240—290 мμ вместо обычных фотоэлементов применяли также счетчик Гейгера — Мюллера со стальным анодом и полиэтиновым окошечком или пользовались флуоресценцией специального фосфора, для которого измеряли эмиссию в видимой области (Прайс и Хадсон [2], Валленфельс и Кристиан).

Неудобство фотометрической оценки веществ в инфракрасной области заключается главным образом в значительно более низком коэффициенте экстинкции для большинства веществ в сравнении с ультрафиолетовым поглощением, так что определение становится мало чувствительным. Поэтому неоднородности бумаги могут оказывать сильное влияние. При пропитке парафиновым маслом (Гоулден) применение ограничивается областью 2500—1500 см<sup>-1</sup>. Для количественной оценки лучше пользоваться высотами максимумов, нежели величинами поверхности между ними и осью абсцисс и производить отсчет с помощью калибровочной кривой. Можно рекомендовать двухлучевую систему (Калькварф и Фрост).

### ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

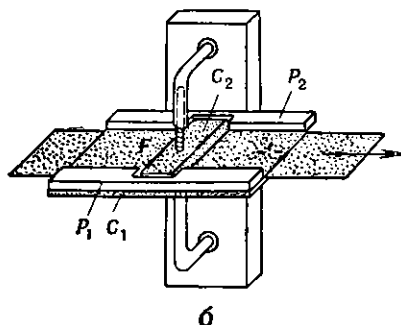
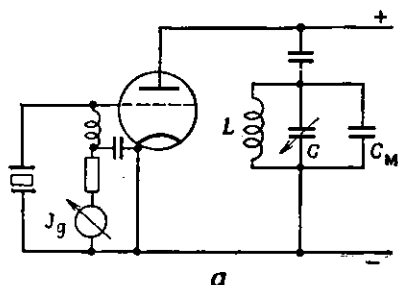
На основе флуоресценции пятен в подходящей (обычно ультрафиолетовой) области часто с достаточной точностью можно оценивать концентрацию визуально по размерам и интенсивности пятен, сравнивая со стандартом, как было упомянуто выше (см. стр. 183). При флуориметрическом определении веществ *in situ* полоску бумаги перемещают вдоль фотоэлемента, от которого она отделена фильтром, задерживающим ультрафиолетовые лучи, примененные для возбуждения видимой флуоресценции (например, Кюн). Можно также подвергнуть фотометрированию фотографии флуоресцирующих объектов (Зильберман и Торп).

### ВЫСОКОЧАСТОТНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Если полоску фильтровальной бумаги перемещать между двумя обкладками конденсатора, на которые подается переменное напряжение с частотой 3—30 Мгц, то при проходе пятен между обкладками происходит изменение сопротивления (Хасимото и Мори [2, 3], Мори [1]; Эме; Блейк). Если измерять это изменение электронными приборами, то высокочастотное измерение можно применить для оценки хроматограмм. При изменении измеряемого сопротивления можно использовать как изменение диэлектрической постоянной, так и электропроводности.

Метод удобен главным образом для определения электролитов (Эме). Для неэлектролитов, особенно для веществ с низкой диэлектрической постоянной, мало отличающейся от диэлектрической постоянной целлюлозы, изменения, обусловленные неоднородностью бумаги, делают измере-

ние невозможным (Эме). Из-за возможного изменения угла потерь необходимо поддерживать влажность бумаги постоянной. Можно легко осуществить регистрацию измерений, однако соотношение между концентрацией и измеряемым сопротивлением всегда необходимо проверять с помощью калибровочной кривой.



Р и с. 100. Прибор для высокочастотного промера хроматограмм на бумаге (Эме). а — принципиальная схема одноступенчатого кварцевого осциллятора;  $C_M$  — измерительный конденсатор,  $J_g$  — измеритель сеточного тока.

б — измерительный конденсатор  $C_M$ . Хроматограмма перемещается синхронно с регистрирующей бумагой между пластинками  $C_1$  и  $C_2$ , образующими емкостный измерительный контур.  $P_1$ ,  $P_2$  — ограничители движения полосок.  $F$  — прижимная пружина для  $C_2$ . Хроматограмму погружают в смесь метанол—глицерин (1 : 4), затем оставляют на 30 мин во влажной камере при относительной влажности 80%.

На границе между методами, основанными на измерении проводимости, и полярографическими измерениями, в которых играет роль перенос электричества движущимися ионами, находится метод де Фриза, который основан на перемещении высушенной полоски фильтровальной бумаги между двумя стальными цилиндрами, между которыми существует разность потенциалов от 4 до 80 в. Измеряя ток, проходящий между цилиндрами, можно определять электролиты, например литий, в присутствии натрия.

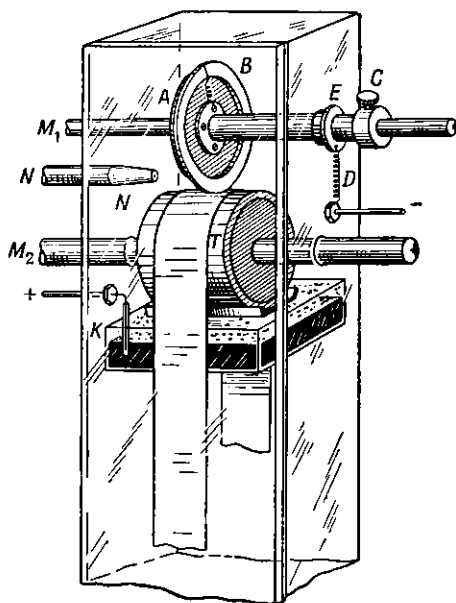
### ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Подобным же образом можно определять изменение потенциала металлического электрода, соприкасающегося с фильтровальной бумагой (Каменьский). Для измерения был использован квадрантный электрометр, однако можно применять и электронные потенциометры. Для измерения можно пользоваться металлическими электродами первого и второго рода, а также индифферентными электродами (платиной и др.) для измерения окислительно-восстановительных потенциалов. Удивительно, что до настоящего времени никто не воспользовался на практике изменениями рН, которые легко можно осуществить с помощью стеклянного электрода, хотя величина рН является известной простой функцией концентрации кислоты или основания.

### ПОЛЯРОГРАФИЯ

Применение полярографии для исследования хроматограмм *in situ* ограничено использованием твердых электродов. В приборе Лангера индикаторным электродом служит золотая проволока, навитая на цилиндр.

Бумагу прижимают к электроду другим цилиндром (рис. 101), изготовленным из неглазурованного фарфора, пропитанного раствором хлористого калия. Хлористый калий образует проводящее соединение (жидкостной мостик) с каломельным электродом сравнения. Ток, протекающий между золотом и электродом сравнения при некотором выбранном напряжении, отмечают в зависимости от смещения



Р и с. 101. Прибор для полярографии *in situ* (Лангер)

Полоску хроматографической бумаги пропускают между увлажнительным валиком Т и измерительным катодом А. Камера служит для предотвращения высыхания изготовлена из прозрачной пластмассы, спереди снабжена дверцей. А — поляризующий электрод, амальгамированная золотая проволока; В — пружина для натяжения электрода А; С — винт, позволяющий отделить диск с катодом от мотора; D — пружина, прижимающая А к Т и подводящая ток к А. Е — скользящий контакт; К — сосуд с ртутью и каломельным полуэлементом (анод); M<sub>1</sub> — ось, соединенная с мотором гибким сцеплением (около 1 об/мин); M<sub>2</sub> — ось, соединенная с мотором (около 0,2 об/мин); N — подача очищенного азота, насыщенного водяным паром; Т — фарфоровый цилиндр, насаженный на ось M<sub>2</sub> с помощью каучуковых пробок, увлажняемый из сосуда К с помощью стеклянной ваты и несущий полоску бумаги.

бумаги. Пехан и сотрудники применяли покрытую ртутью платиновую или амальгамированную серебряную или медную проволоку, а в качестве соляного мостика — хроматографическую бумагу. Для оценки пользовались осциллографической полярографией (кривыми  $dV/dt - V$ ), которую применяли для обнаружения аминокислот.

Полярографическим методом можно пользоваться в том случае, когда исследуемые вещества подвергаются восстановлению, окислению или образуют с материалом электрода нерастворимые соединения. Преимуществом полярографического метода является его чувствительность.

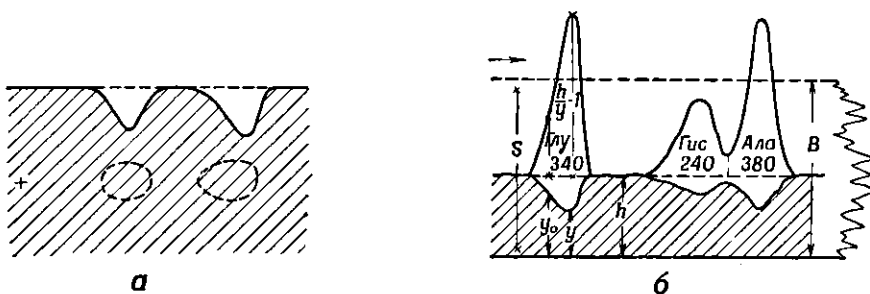
#### ТИТРОВАНИЕ БЕЗ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВЫМЫВАНИЯ

Лакур и сотрудники установили, что перед объемным определением нет необходимости вымывать определяемые вещества с бумаги. Вырезанное пятно суспендируют в том растворе, в котором производят титрование. Первоначально метод был предложен для титрования молибдена и ванадия нитратом свинца в присутствии дифенилкарбазида как индикатора. Таким путем хроматографическое определение значительно ускоряется.

#### РЕТЕНЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Через хроматограмму, на которой находятся пятна анализируемых веществ, пропускают ток раствора, содержащего реактив, который взаимодействует с исследуемыми веществами. Как только раствор дойдет до

пята, растворитель продолжает продвигаться равномерно, но молекулы реактива не перемещаются с ним, а взаимодействуют с веществом, образуя осадок или комплекс. Лишь по израсходовании всего количества определяемого вещества в месте пятна будет наблюдаться дальнейшее движение реактива. Образуется просвет, в котором нельзя открыть реактив, причем длина его пропорциональна количеству открываемого вещества в пятне (Виланд [1], рис. 102). Можно добиться улучшения разделения соседних



Р и с. 102. Принцип ретенционного анализа.

а — проба нанесена на хроматограмму в виде точки. Количества веществ пропорциональны площадям «ретенционных интервалов» (Виланд).  
б — проба нанесена в виде поперечной полоски в масштабе отрезка  $S$ . Точность метода при этом повышается, хотя глубину впадин (нижняя половина чертежа) следует пересчитать так, что в качестве ординат нанести  $h/y - 1$ , где  $h$  — высота, которой достигла медь во впитываемом растворе реактива в местах, не содержащих аминокислот,  $y$  — высота подъема меди в данной точке аминокислотной зоны (Виланд и Вирт).

пятен и увеличения точности, если вместо круглых точек наносить поперечные черточки (Виланд и Вирт [2]). Хотя пропорциональность между величиной ретенционного просвета и количеством вещества здесь не сохраняется, расчет достаточно прост (рис. 102, б). Если реактив окрашен, то дальнейшее проявление не требуется; в противном случае готовую ретенциогамму можно проявить другим реактивом. Кауфман и Будвиг определяли ретенциометрически йодное число жира при помощи 0,02 н. раствора брома.

Райхль и Леффлер предложили так называемую обращенную ретенцию, в которой и при нанесении образца в форме поперечной черты сохраняется пропорциональность между размером пятна и количеством определяемого вещества. Хроматографическую бумагу в продольном направлении разделяют барьером из дифенила. Ту часть, которая не является собственно хроматограммой, погружают в раствор реактива (для органических кислот — уксуснокислый свинец). По испарении дифенила растворителю, несущему со своим фронтом определяемое вещество, дают впитаться в направлении, перпендикулярном направлению хроматографического проявления. Вещество при этом образует осадок с реактивом. После проявления измеряют поверхность, занятую солями анализируемых кислот.

## МЕТОДЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЭЛЮИРОВАНИЯ

После элюирования, разумеется, можно пользоваться любым физическим, химическим или биологическим методом. О радиометрических методах см. стр. 198, о биологических — стр. 173. Из химических методов следует упомянуть микродиффузионный способ Конвея, хорошо дополняющий благодаря своей чувствительности хроматографию на бумаге (Батлер).

Вырезки из хроматограммы можно вкладывать без предварительного элюирования прямо в чашки, если присутствие бумаги не служит помехой.

Способы элюирования были уже описаны выше (см. стр. 177). Поскольку из бумаги одновременно вымываются загрязнения, иногда обуславливающие значительные и притом неодинаковые ошибки, при некоторых методах бумагу перед хроматографированием необходимо тщательно промыть.

Как указывают Якубец и Заградничек, при методах, требующих элюирования, удобнее пользоваться по крайней мере двумя одновременно хроматографируемыми эталонами (высшим и низшим), поскольку потери непропорциональны количествам веществ.

### ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Колориметрические методы можно разделить на две группы. В одной из них реакцию проводят насколько возможно более полно на бумаге, элюируют окрашенное соединение и затем его фотометрируют. В другой группе цветные реакции проводят в элюате. Если нет возможности предварительно проявить пятна таким способом, который не препятствовал бы дальнейшему определению в элюате, хроматограмму разрезают на узкие полоски одинаковой ширины и с каждой из них проводят элюирование и определение. Результаты наносят на график и производят расчет. Меньше времени будет затрачено, если удастся определить положение пятен на хроматограмме таким способом, который не разрушает определяемое вещество или разрушает лишь в такой степени, что этим можно пренебречь, и вырезанные пятна затем элюировать отдельно. Для обнаружения можно воспользоваться, например, ультрафиолетовой фотокопией, радиоавтографией или опрыскиванием очень слабым раствором реактива. Наконец, третья возможность заключается в определении положения пятен на параллельной полоске, например при помощи цветной реакции, и последующем разрезании хроматограммы, в которой будет производиться количественное определение.

К числу особенно распространенных методов, применяемых после элюирования, относится спектрофотометрическое определение пуриновых и пиримидиновых производных (см. стр. 517) в ультрафиолетовой области.

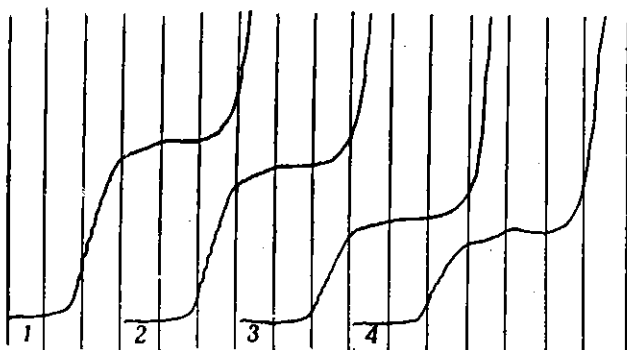
Примером флуорометрического определения, проводимого простым погружением вырезки в раствор реактива, служит определение эстрогенов реакцией с серной кислотой (Янда, неопубликованные данные).

### ПОЛЯРОГРАФИЯ

Для полярографического определения из хроматограммы вырезают по данным контрольной хроматограммы пятно определяемого вещества. В исследуемой части бумаги не пользуются никакими способами обнаружения, кроме флуоресцентного. Для элюирования можно применять способы, приведенные на стр. 178. Измельченная при элюировании бумага обычно не мешает полярографическому определению, и ее нет необходимости удалять. Нередко элюируют таким агентом, который непосредственно служит в качестве основного электролита при полярографии. Если элюирующий агент не является электролитом, то к нему можно добавить подходящий электролит. В случае неорганических веществ вырезку из хроматограммы

с пятном можно сжечь и золу подвергнуть элюции. Запись кривых производят обычным способом. Данные обрабатывают либо при помощи калибровочной кривой, либо методом эталонных добавок. Калибровочную кривую, которой пользуются для серийных определений, получают, нанося и хроматографируя ряд известных различных количеств определяемого вещества, так как элюирование не всегда совершенно, результатом чего могут быть довольно значительные потери при перемещении по бумаге.

В методе эталонных добавок в том случае, когда с образцом проводят химические операции еще перед нанесением на бумагу (например, депротеинизация крови), эталонную добавку следует вводить в самом начале.



Р и с. 103. Полярографическое определение морфина в крови (Зуман).

Кривые нитрозоморфина в щелочной среде. Кривые 2 и 4: две пробы морфина в крови (элюат хроматограммы подвергнут нитрозированию). Кривые 1 и 3: то же после добавления в пробу 50 мкг морфина. Кривые при 0,2 в, чувствительность 1 : 5, продолжительность капли  $t=2,2$  сек.

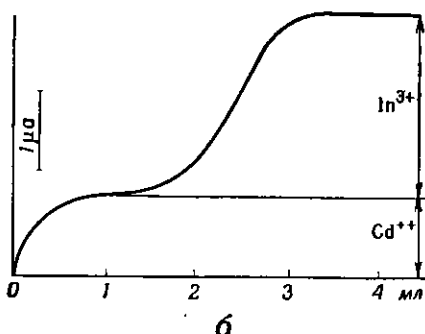
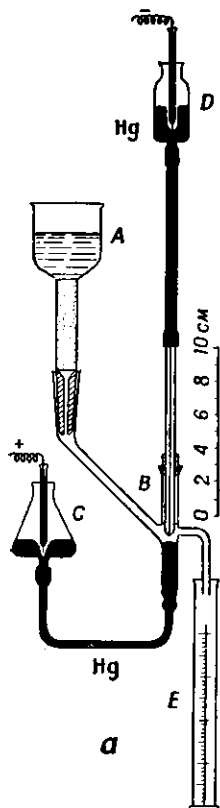
При этом потери образца и эталона будут одинаковыми, например при соосаждении, и возможная ошибка уменьшится (рис. 103). До настоящего времени уделялось сравнительно больше внимания полярографии при количественном определении хроматограмм неорганических веществ, нежели органических.

Комбинация хроматографии на бумаге с полярографией считается очень удобной. Для полярографической оценки хроматограмм большое значение имеет чувствительность полярографического метода и возможность работать с малыми объемами веществ. После разделения на бумаге полярографический анализ в высшей степени специфичен, и лишь в редких случаях может происходить интерференция. Полярографический граничный ток обычно является линейной функцией концентрации. Полярография может также служить для решения теоретических проблем хроматографии на бумаге. В свою очередь хроматография делает возможным применение полярографии для анализа сложных систем, особенно биологических, полярографический анализ которых без предварительного длительного процесса химического разделения был бы невозможен.

Для анализа веществ с близкими значениями потенциалов полувольт (в случае необходимости, с непрерывной записью) пригодна также проточная модификация хроматографического метода, предложенная Кемулой. Ионы различной валентности были подвергнуты разделению на непропитанной бумаге, ионы с одинаковым зарядом (например,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ ) — на бумаге, пропитанной, например,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Был приме-

нен фронтальный метод, причем ионы находились в 0,2 н. растворе  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Вследствие значительной концентрации индифферентного электролита изотермы исследованных веществ имели линейный ход и ступени после проведения фронтального анализа были аддитивными (рис. 104). В случае элюирования «пики» были бы симметричными. Предложено также вместо полярографического определения пользоваться кулометрическим (Прост и Кис), позволяющим непосредственно найти интеграл тока, соответствующий плоскости под кривой элюирования.

Прочие физические методы, как, например, абсорбциометрический, интерферометрический, высокочастотные измерения и т. п., также можно применять при проточном способе. Для простоты оценки, однако, желательно, чтобы был обусловлен линейный ход сорбционных изотерм, подобно тому, как это имеет место в хроматографическом методе.



Р и с. 104.

*a* — устройство для непрерывной полярографии элюата из хроматографической колонки (Кемула). *A* — резервуар с подвижной фазой; *B* — прибор для хроматографии; *C* — сосуд с ртутью, с помощью которого поддерживают постоянный уровень анода сравнения; *D* — резервуар с ртутью для капельного катода; *E* — цилиндр для замера протекшей фракции. Совершенно аналогичным устройством можно пользоваться и для жидкости, стекающей с бумажной хроматограммы, заменяющей колонку и помещенной в закрытую камеру.

*б* — результат хроматополярографического фронтального анализа.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Adams H. W., Stuart R. G., *Analyst*, **76**, 553 (1951).  
 Åkerfeldt S., *Acta chem. Scand.*, **8**, 521 (1954).  
 Albon N., Gross D., *Analyst*, **75**, 454 (1950).  
 Auclair J. L., Patton R. L., *Rev. canad. Biol.*, **9**, 3 (1950).  
 Barrolier J., *Naturwissenschaften*, **42**, 126 (1955).  
 Blake G. G., *Anal. chim. Acta*, **13**, 562 (1955); *Chem. Ind.*, 1955, 701; *Anal. chim. Acta*, **14**, 329 (1956).  
 Block R. J., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **72**, 337 (1949).  
 Boissonas R. A., *Helv. chim. Acta*, **33**, 1972 (1950).  
 Borel E., Hostettler F., Deuel H., *Helv. chim. Acta*, **35**, 115 (1952).  
 Bowden C. H., MacLagan N. F., Wilkinson J. H., *Biochem. J.*, **59**, 93 (1955).

- Bradfield A. E., Flood A. E., J. Chem. Soc., 1952, 4740.  
 Brante G., Nature, 163, 651 (1949).  
 Brown R., Greenwood A. D., Johnson A. W., Long A. G., Tyler G. J., Biochem. J., 48, 564 (1951).  
 Брымберг Е. М., ДАН СССР, 72, 885 (1950); C. A., 44, 9745 (1950).  
 Bull H. B., Hahn J., Baptist V. H., J. Am. Chem. Soc., 71, 550 (1949).  
 Butler G. V., Anal. Chem. 23, 1300 (1951).  
 Caldwell P. C., Biochem. J., 60, xii (1955).  
 Ceriotti G., DeFranceschi A., de Carneri I., Zamboni V., Brit. J. Pharmacol., 8, 359 (1953).  
 Claesson S., Nature, 159, 708 (1947).  
 Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Biochem. J., 38, 224 (1944).  
 Crippa A., Ist. botan. Univ., Lab. Crittogam., Pavia, Atti, 10, 173 (1953); C. A., 48, 3187 (1954).  
 Dahlstrom R. V., Hartwell W. V., Neal A. L., Federation Proc., 12, 192 (1953).  
 Datta S. P., Dent C. E., Harris H., Biochem. J., 46, xlii (1950); Science, 112, 621 (1950).  
 Decker P., Naturwissenschaften, 38, 287 (1951).  
 De Vries G., Nature, 173, 735 (1954). De Vries G., van Dalen E., Rec. trav. chim., 73, 1028 (1954).  
 Dupal J., Muchová M., Hais I. M., Schüze Českoslov. fysiolo. Spol., Praha, 12/VI—1952.  
 Durrum E. L., Gilford S. R., Rev. sci. Instr., 26, 51 (1955).  
 Eger Ch., Experientia, 12, 37 (1956).  
 Feigl F., Spot Tests, Vol. I, II, Elsevier, New York (1954).  
 Fetzer W. R., Ough L. D., Anal. Chem., 26, 1671 (1954).  
 Fellegi J., Sláma L., Chem. Zvesti, 10, 314 (1956).  
 Fialová Z., Disertace Karlovy University, Praha (1953).  
 Fisher R. B., Holmes R., Biochem. J., 44, liv (1949). [1]  
 Fisher R. B., Parsons D. S., Morrison G. A., Nature, 161, 764 (1948). [2]  
 Forsyth W. G. C., Biochem. J., 51, 511, 516 (1952).  
 Fosdick L. S., Blackwell R. Q., Science, 109, 314 (1949).  
 Fowler H. D., Nature, 168, 1123 (1951).  
 Fučík K., Kofístek S., Chem. Listy, 46, 190 (1952).  
 Gage J. C., Biochem. J., 54, 426 (1953).  
 Gattner H., Z. ges. inn. Med., 9, 306 (1954).  
 Giri K. V., Rao N. A. N., J. Ind. Inst. Sci., 35, 343 (1953).  
 Goodall R. R., Levi A. A., Nature, 158, 675 (1946); Analyst, 72, 277 (1947).  
 Goppelsröder F., Capillaranalyse, Birkhäuser, Basel (1901).  
 Goulden J. D. S., Nature, 173, 646 (1954).  
 Grubhofer N., Z. Naturforsch., 11b, 44 (1956).  
 Grundy H. M., Simpson S. A., Tait J. F., Nature, 169, 795 (1952).  
 Grunwald H. M., Chem. Listy, 49, 1235 (1955).  
 Grüttner R., Klin. Wochenschr., 32, 263 (1954).  
 Gustafsson C., Sundman J., Lindh T., Meddel. Industr. Centrallab. Finland № 96, 13 (1951); J. text. Inst. (Manchester), 43A, 196 (1952).  
 György P., Vitamin Methods. Acad. Press, New York (1950).  
 Haines W. Y., Drake N. A., Federation Proc., 6, 180 (1950).  
 Hais I. M., Kakáč B., Dupal J., Prac. konf. o chromatografii, Praha 16—18/VI—1954. [1]  
 Hais I. M., Pecáková L., Nature, 163, 768 (1949). [2]  
 Harrison J. S., Analyst, 76, 77 (1951).  
 Hashimoto Y., Mori L., Nature, 170, 1024 (1952). [1]  
 Hashimoto Y., Mori L., J. pharm. Soc. Japan, 72, 1532 (1952). [2]  
 Hashimoto Y., Mori L., Nature, 172, 542 (1953). [3]  
 Harvalik Z. V., Anal. Chem., 22, 1149 (1950).  
 Jakubec L., Zahradníček M., Chem. Listy, 50, 1459 (1956).  
 Kalkwarf D. R., Frost A. A., Anal. Chem., 26, 191 (1954).  
 Kamiński B., в книге Opieńska-Blauth J. и соавт., Chromatografia, Państw. wydawn. nauk, Warszawa, стр. 220—247 (1957).  
 Kaufmann H. P., Budwig J., Fette u. Seifen, 54, 7 (1952).  
 Keil B., Chem. Listy, 48, 725 (1954).  
 Kemula W., Roczniki Chem., 26, 694, 696 (1952).  
 Kirby-Berry H., Cain L., Univ. Texas Pubs., 5109, 80 (1951).  
 Kühn A., Naturwissenschaften, 42, 529 (1953).

- Kumé S., Otosai K., Watanabé H., *Nature*, **166**, 1076 (1950).  
 Lacourt A., Sommereyns G., Hoffmann J., Stadler A., Wautier G., *Compt. rend.*, **234**, 2365 (1952).  
 Langer A., *Anal. Chem.*, **28**, 426 (1956).  
 Laurence D. J. R., *J. Sci. Instr.*, **31**, 137 (1954); *C. A.*, **48**, 10817b (1954).  
 Lewis P. R., *Biochem. J.*, **52**, 330 (1952).  
 List P. H., *Z. physiol. Chem.*, **303**, 27 (1956).  
 Makino K., Satoh K., Inagami K., *Biochim. biophys. Acta*, **19**, 394 (1956).  
 Marini-Bettolo-Marconi C. B., Guarino S., *Experientia*, **6**, 309 (1950).  
 Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **45**, 294 (1949).  
 Massey J. L. M., Neal A. L., *Federation Proc.*, **10**, 222 (1951).  
 Mattu F., Comuzzi B., *Laboratorio scientifico*, **3**, № 3 (1955).  
 Mentzer C., Molho D., Molho-Lacroix L., *Bull. Soc. chim. France*, **1953**, 636.  
 Metcalf R. L., March R. B., *Science*, **117**, 527 (1953).  
 Miettinen J. K., Moisio T., *Acta chem. Scand.*, **7**, 1225 (1953).  
 Miyaki K., Satake K., Hayashi M., Momiyama H., *J. pharm. Soc. Japan*, **71**, 249 (1951).  
 Moore A. M., Boylen J. B., *Science*, **118**, 19 (1953).  
 Mori I., *J. pharm. Soc. Japan*, **73**, 958 (1953). [1]  
 Mori I., *Science*, **119**, 653 (1954); *J. pharm. Soc. Japan*, **74**, 525 (1954). [2]  
 Mori I., *J. pharm. Soc. Japan*, **75**, 1300 (1955). [3]  
 Müller R. H., Clegg D. L., *Anal. Chem.*, **21**, 192, 1123 (1949). [1]  
 Müller R. H., Wise E. N., *Anal. Chem.*, **23**, 207 (1951). [2]  
 Nakabashi T., *J. agr. chem. Soc. Japan*, **27**, 272 (1953).  
 Nichol C. A., Zakrzewski S. F., Welch A. D., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **83**, 272 (1953).  
 Oehme F., *Chem. Technik*, **7**, 704 (1955), *Z. anal. Chem.*, **150**, 93 (1956).  
 Otosai K., *Kagaku no Ryōiki*, **4**, 411 (1950).  
 Paladini A. C., Leloir L. F., *Anal. Chem.*, **24**, 1024 (1952).  
 Parke T. V., Davis W. W., *Anal. Chem.*, **24**, 2019 (1952).  
 Pechan Z., Kaláb D., Paleček E., *Pharmazie*, **10**, 526 (1955).  
 Pesze M., Poirier P., *Réactions colorées et fluorescences. В книге Velluz I. (red.), Méthodes et réactions de l'analyse organique, vol. III, Masson et Cie, Paris (1954).*  
 Polson A., van Rooy P. J., Marais E. J., *Onderstepoort J. vet. Research*, **25**, 31 (1951); *C. A.*, **46**, 3905g (1952).  
 Porath J., Flodin P., *Nature*, **168**, 202 (1951).  
 Poulig M. D., Pinteric L., *Nature*, **176**, 1226 (1955).  
 Price T. D., *Federation Proc.*, **14**, 264 (1955). [1]  
 Price T. D., Hudson P. B., *Anal. Chem.*, **26**, 1127 (1954). [2]  
 Price T. D., Hudson P. B., Ashman D. F., *Nature*, **175**, 45 (1955). [3]  
 Procházka Z., *Chemie (Praha)*, **6**, 49 (1950).  
 Proszt J., Kis J., *Acta chim. Acad. Sci. hung.*, **9**, 191 (1956).  
 Reichl E. R., Löffler J. E., *Mikrochim. Acta*, **1954**, 226.  
 Rockland L. B., Dunn M. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 4121 (1949).  
 Rutter L., *Analyst*, **75**, 37 (1950).  
 Sanger F., Tuppy H., *Biochem. J.*, **49**, 463, 481 (1951).  
 Silbermann H., Thorp R. H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **5**, 438 (1953).  
 Sulser H., Högl O., *Mitt. Geb. Lebensm.-Unters. Hygiene*, **44**, 21, 48 (1953).  
 Šanda V., *Českoslov. Farmacie*, **3**, 79 (1954).  
 Шемякин Ф. М., *Труды комиссии по аналитич. химии*, **6(9)**, 375 (1955).  
 Sorm F., Keil B., *Chem. Listy*, **45**, 278 (1951); *Collection Czechoslov. chem. Commun.*, **16**, 366 (1951).  
 Toennies G., Kolb J. J., *Anal. Chem.*, **23**, 823 (1951).  
 Treiber E., Koren H., *Monatsh. Chem.*, **84**, 478 (1953).  
 Vítek V., *Českoslov. Farmacie*, **1**, 252 (1952).  
 Wallenfels K., Christian W., *Angew. Chem.*, **65**, 459 (1953).  
 Weber R., *Helv. chim. Acta*, **34**, 2031 (1951).  
 Wieland T., *Angew. Chem.*, **60**, 313 (1948). [1]  
 Wieland T., Wirth L., *Angew. Chem.*, **63**, 171 (1951). [2]  
 Winsten W. A., Eigen E., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **67**, 513 (1948).  
 Wolff K., *Pharmazie*, **10**, 371 (1955).  
 Woodward C. C., Račideau G. S., *Anal. Chem.*, **26**, 248 (1954).  
 Ženíšek Z., Lautner V., *Sborník bs. Akad. zeměd. Věd. živoč. Vyr.*, **29**, 1 (1956).

# ХРОМАТОГРАФИЯ РАДИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА БУМАГЕ

---

*И. М. Хайс*

Применение метода изотопов в биохимии ознаменовало резкий поворот в возможностях изучения изменений, происходящих в живом организме. Вещества, в которые превращается в организме меченое соединение, необходимо выделить из смеси для того, чтобы их можно было идентифицировать и определить количественно. Из всех методов разделения именно хроматография оказывается неизбежным спутником изотопного метода. Хроматография на бумаге, предложенная для радиоактивных изотопов в 1947 г. Финком с сотрудниками, позволяет в ничтожном количестве образца доказать наличие ожидаемых веществ и установить их активность и, кроме того, может указать на наличие новых или не ожидаемых веществ.

Благодаря соединению метода хроматографии на бумаге и метода радиоактивных изотопов были достигнуты огромные успехи в ряде важных областей биохимии. Упомянем, например, изучение фотосинтеза школой Калвина и Бенсона, основанное на исследовании изменения во времени радиоактивности, обусловленной  $C^{14}O_2$ , в пятнах различных веществ на хроматограмме (рис. 105). Благодаря интенсивной работе по идентификации неизвестных пятен, изменению условий опыта и смелого полета мысли были предложены гипотетические реакции и циклы реакций, во многих случаях очень хорошо отражающие сложные реальные отношения в живом растении. Любопытную методику, позволяющую проследить весьма краткие экспозиции  $C^{14}O_2$ , разработал Доман. Широко были использованы также соединения, меченные  $C^{14}$  и некоторыми другими изотопами, при изучении судьбы посторонних веществ в организме (ядов и лекарственных препаратов). Радиоактивный фосфор позволил хроматографически изучить реакции фосфорилирования и трансфосфорилирования. Изучение пятен веществ, меченных  $J^{131}$ , привело к возникновению нового взгляда на биохимию щитовидной железы (см. стр. 447).

Наряду с этим хроматография на бумаге оказалась полезной также при анализе смесей радиоактивных элементов, возникающих при искусственных или природных превращениях (см., например, работы Фрайерсона и сотрудников), а также для точного анализа органических веществ

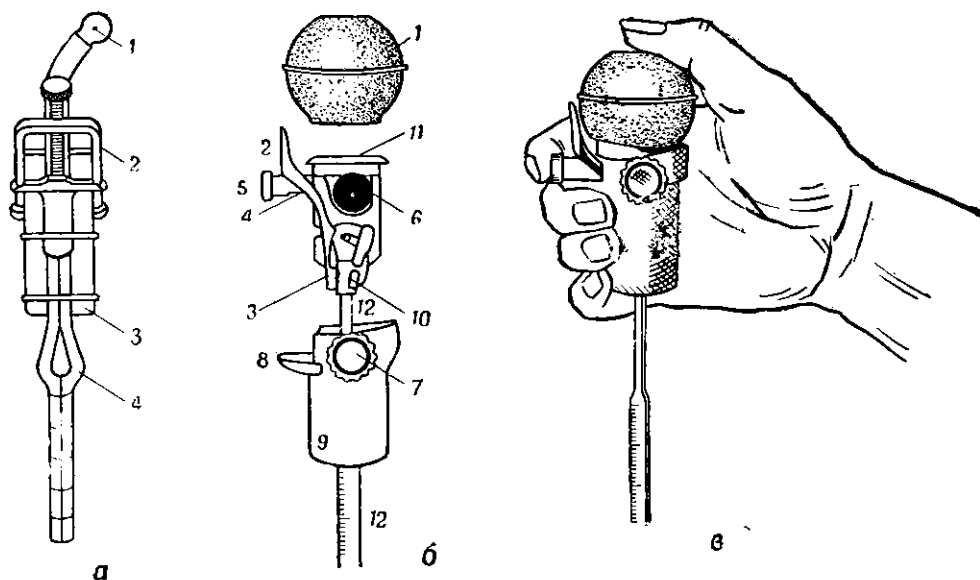
методом изотопных производных. Обзор хроматографии радиоактивных веществ на бумаге можно найти в статьях Хайса, Буссье и Ледерера, Лисицкого и Михеля, Санваля, а также в монографии Брода и Шенфельда.

При описании методик мы предполагаем, что читатель знаком с общими принципами работы с радиоактивными изотопами, и в частности с условиями работы с малыми объемами, обладающими низкой общей активностью, и не будет пренебрегать предписаниями техники безопасности. Особенно необходимо следить за тем, чтобы активные вещества не были занесены в организм и не оставались на измерительных приборах. Рекомендуется покрывать все рабочие поверхности бумагой, которую по окончании работы удаляют.

В образцах с высокой удельной активностью при хранении могут протекать радиохимические реакции не только в растворе, но и в твердых высушенных пробах с минимальным содержанием влаги. Об этом следует помнить, чтобы избежать ошибочных выводов. (Соплемся, например, на хроматографическое изучение метионина Колоушеком и сотрудниками.) Кроме того, необходимо убедиться, не произошли ли обменные реакции.

## НАНЕСЕНИЕ

Растворы можно всасывать в пипетки только при помощи шприца или груши, но ни в коем случае не ртом (рис. 106). Особенно удобна специальная надставка для пипеток («Pipette»).



Р и с. 106.

а — микропипетка по Борковскому (Опеньска-Блаут).

1 — стеклянная пробка в каучуковой трубке; 2 — винтовой зажим; 3 — пластинка; 4 — смеситель для лейкоцитов.

б и в — надставка для грубого и точного отмеривания растворов пипеткой.

Слева: 1 — груша из хирургического каучука; 2 — рычаг, с помощью которого указательным пальцем открывают губки патрона; 3 — патрон для пипетки; 4 — клапан для грубого отмеривания; 5 — отверстие для пуска воздуха; 6 — микробаллончик; 7 — винт для микрорегулирования; 8 — опора для пальцев; 9 — корпус из пластмассы; 10 — ложе для пипетки; 11 — контрольный каучуковый клапан; 12 — пипетка.

Справа — общий вид. Для нанесения проб микропипеткой наибольшее значение имеет микроустройство (6, 7).

При хроматографировании чистых образцов с высокой удельной активностью сложность может состоять в том, что значительную роль будет играть адсорбция на бумаге, снижающая подвижность вещества. Для идентификации следует провести смешанную хроматографию с неактивным носителем. Подобные случаи очень редки, значительно чаще приходится иметь дело с малыми концентрациями веществ, благоприятными для анализа (см., например, работу Фрайерсона и Джонса).

## АВТОРАДИОГРАФИЯ

Готовую хроматограмму прикладывают к рентгеновской пленке и оставляют для экспозиции в темноте (достаточно завернуть в черную бумагу). С рентгеновской пленкой можно работать при слабом желтом свете. Хроматограмма и пленка должны плотно прилегать друг к другу, особенно в случае малой проникающей способности излучения, поэтому применяют фотографическую рамку или мешочек с песком. Для того чтобы привести в соответствие одинаковые точки хроматограммы и авторадииграммы, пользуются либо специальной перфорацией, либо радиоактивными красками (Бенсон и сотрудники). Для того чтобы исключить химическое действие веществ с хроматограммы, некоторые авторы между хроматограммой и пленкой вкладывают лист целлофана. Это, однако, неприменимо в случае мягкого  $\beta$ -излучения, для которого и ничтожный воздушный слой обладает сильным поглощением; Вейль обсуждает даже возможность нанесения эмульсии непосредственно на хроматограмму.

Время экспозиции определяется активностью образца и чувствительностью пленки, а в некоторых случаях также и толщиной бумаги. Экспозицию лучше всего установить путем предварительного наблюдения; однако нехроматографированное пятно не позволяет точно решить этот вопрос, так как вещества при высыхании обычно концентрируются по периметру и поэтому поверхностная концентрация исходного пятна оказывается значительно более высокой, чем у диффузных пятен после хроматографирования. В литературе приводятся числа актов распада на  $1\text{ см}^2$ , необходимые для экспозиции:  $2 \cdot 10^6$ — $12 \cdot 10^7$  для  $\text{C}^{14}$ ,  $10^9$  для  $\text{Br}^{82}$ . В последнем столбце табл. 12 приведены минимальные открываемые количества источников излучения на хроматограммах; речь идет лишь о грубой оценке, дающей только приближенную ориентировку.

Степень почернения на авторадииграмме может служить основой количественного определения; контактный отпечаток одномерной хроматограммы можно перемещать вдоль освещенной щели и при помощи фотоэлемента измерять интенсивность проходящего света, как описано на стр. 185 (см. также рис. 98 и 99). Кроме того, следует принять во внимание возможность измерения поверхности экспонированных пятен (Ракузен, Аронов), что, однако, едва ли точно. Метод имеет значение главным образом для лабораторий, не имеющих счетчиков. Кроме того, основное значение фотографического обнаружения состоит в том, что оно дает более точный отпечаток пятна (положение и форму). Одновременно хроматограмму проявляют обычными способами — химическими реактивами, ультрафиолетовым поглощением и биоавтографией, чтобы получить представление о химическом поведении радиоактивных веществ (рис. 107). Если пользуются реакцией, при которой может происходить удаление меченой части молекулы (например, карбоксила при реакции аминокислот с нингидрином), или реагент взаимодействует с фотографической эмульсией, а изолирующая

Таблица 12

ХАРАКТЕРИСТИКА ИСКУССТВЕННЫХ РАДИОАКТИВНЫХ ИЗОТОПОВ,  
НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИИ

Изотоп	Период полураспада	Максимальная энергия $\beta$ -излучения <sup>а)</sup> , Мэв	Энергия $\gamma$ -излучения, Мэв	Приблизительный порог чувствительности после хроматографии на бумаге, мкюри	
				авторадио- графия б)	счетчик Гейгера— Мюллера в)
Na <sup>24</sup> <sub>11</sub>	15 час.	1,4	1,4—2,8		
K <sup>42</sup> <sub>19</sub>	12,4 часа	3,6—2,0	1,5		
Cu <sup>64</sup> <sub>29</sub>	12,9 «	{ 0,6 ( $e^-$ )	0,5		
		{ 0,7 ( $e^+$ )	1,4		
		K			
Co <sup>60</sup> <sub>27</sub>	5,3 года	0,3	1,1—1,3		
Fe <sup>59</sup> <sub>26</sub>	46 суток	0,3—0,5	1,1—1,3		
Br <sup>82</sup> <sub>35</sub>	36 час.	0,5	0,6—0,8—1,4		
J <sup>131</sup> <sub>53</sub>	8,14 суток	0,3—0,6—0,8	0,08—0,3—0,4—0,6	0,0005	0,005 г)
P <sup>32</sup> <sub>15</sub>	14,3 «	1,7		0,0005	0,001 г)
Ag <sup>111</sup> <sub>47</sub>	7,5 «	1,1			
S <sup>35</sup> <sub>16</sub>	87,1 «	0,17		0,002	0,002 г)
C <sup>14</sup> <sub>6</sub>	5700 лет	0,16		0,005	0,01 г)
H <sup>3</sup> <sub>1</sub>	12 лет (?)	0,02			

а)  $e^+$ —позитронное излучение, K—поглощение электронов K-слоя.

б) Экспозиция 6 суток; «Агфа лауэ фильм», «Вольфен» (без усилительного слоя); хроматография в системе *n*-бутанол—уксусная кислота—вода; расстояние пятна от стартовой линии 15—25 см.

в) Слюдяное окопешко (1,5 Г) или 3,5 Д) мг/см<sup>2</sup>; диафрагма со щелью 2×30 мм; за порог наблюдения принята утроенная высота холостого хода кривой; об условиях хроматографии см. примечание б).

прокладка не вложена, химическое проявление можно провести после авторадиографии. Точное совпадение пятна на радиоавтограмме в нескольких системах растворителей с пятном, проявленным другим способом, в том числе и в малейших случайных деталях пятна, делает весьма вероятным заключение, что оба пятна относятся к одному и тому же веществу. Если радиоактивное вещество присутствует в столь малой концентрации, что его нельзя открыть химическим способом, следует провести хроматографирование смеси с неактивным носителем.

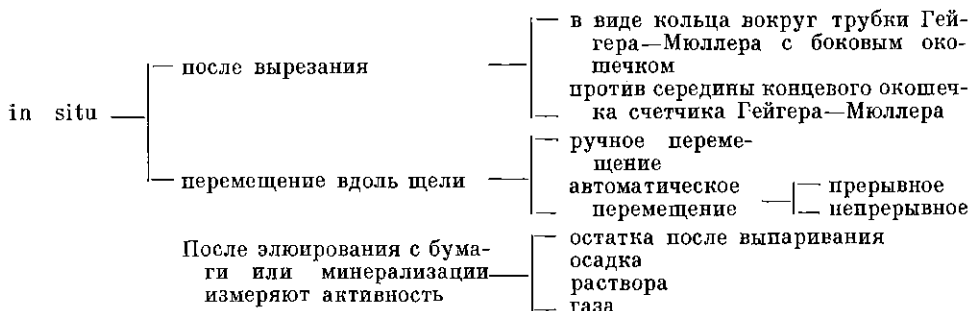
Радиометрическая техника в сравнении с авторадиографией обладает рядом преимуществ: большей чувствительностью, более точной количественной оценкой и большей скоростью выполнения. Авторы обычно пользуются обоими методами, получая взаимно дополняющую информацию.

### РАДИОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В принципе возможны два пути: либо после обнаружения (например, авторадиографического) изолируют все пятно (вырезая его или закрывая его границы непроницаемым для излучения материалом) и измеряют всю радиоактивность, либо промеряют постепенно всю хроматограмму и выражают радиоактивность графически как функцию расстояния от стартовой линии. Полная активность отдельных пятен пропорциональна поверхно-

стям, заключенным между дугами кривой активности в области максимумов и осью абсцисс, проведенной на уровне среднего положения холостого хода кривой.

Приводим схематически все применявшиеся до сих пор модификации измерения радиоактивных хроматограмм:



Для измерения источников  $\gamma$ -излучения и жесткого  $\beta$ -излучения в настоящее время пользуются закрытыми трубками Гейгера — Мюллера. Если счетчик Гейгера — Мюллера с очень тонким окошечком оказывается недостаточным, следует прибегнуть к другим методам. Для измерения  $\gamma$ -излучения применяют также сцинтилляционные измерительные приборы, а для  $\beta$ -излучения — проточные счетчики или (после элюирования или сжигания) жидкостные сцинтилляционные приборы. Обычно оказывается необходимым разрезать хроматограмму, если проводят измерение с помощью проточного счетчика (Фрейденберг и Райхерт). Однако и для таких случаев были сконструированы приборы, позволяющие производить постепенное промеривание неразрезанной хроматограммы (Деморест и Баскин; Бангэм). Харрисон и Уинтерингэм предложили устройство с рабочим пространством 4л: промеряемая хроматограмма проходит через середину сдвоенного счетчика Гейгера — Мюллера. Весь прибор вместе с катушками, между которыми натянута хроматограмма, заключен в герметическую оболочку.

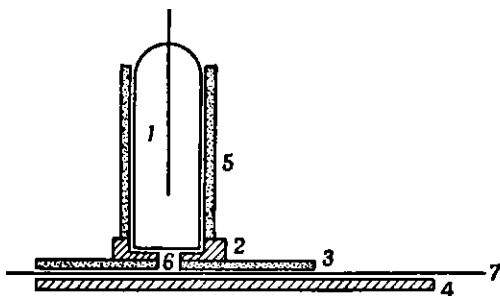
Измерение после элюирования удобно в тех случаях, когда элюат желательно использовать для других целей, например для определения полного количества исследуемого вещества химическим или биологическим методом. При измерении в чашечках к раствору рекомендуется прибавлять смачивающий агент, чтобы сухой остаток после упаривания образовывал слой равномерной толщины. Метод измерения непосредственно на бумаге (in situ) не менее точен, и некоторые авторы приводят близкие результаты обоих методов (например, Линдберг и Хуммель). Погрешностью, которая при измерении in situ могла бы быть обусловлена различием в поглощении излучения в разных местах одной и той же бумаги, можно вообще пренебречь даже для мягкого излучения  $C^{14}$  и  $S^{35}$ , и результаты оказываются достаточно точными (Уинтерингэм и сотрудники; Рокленд и сотрудники).

Напротив, значительная ошибка может возникнуть тогда, когда не обеспечивается точно одинаковое расстояние бумаги от окошечка счетчика (Боурснелл). Для того чтобы по измеренному числу импульсов можно было надежно судить об абсолютном количестве радиоактивного вещества в пятне, необходимо применить калибровку растворами того же изотопа известной радиоактивности, нанесенными пипеткой на бумагу

и измеренными в таких же условиях, лучше всего также после хроматографирования.

Измерение после разрезания (рис. 108) не требует никаких специальных устройств. Следует лишь предохранять окошечко счетчика от загрязнения при соприкосновении с бумагой. Принцип измерения неразрезанных хроматограмм показан на рис. 109, на котором не изображен лишь свинцовый футляр.

Автоматическое устройство для перемещения хроматограммы вдоль щели, позади которой находится счетчик, описали многие авторы. Мы не будем здесь подробно рассматривать конструкцию или схему; в случае необходимости можно обратиться к оригинальной статье. Кроме того, в настоящее время в продаже появилось значительное количество



Р и с. 109. Расположение хроматограммы перед счетчиком Гейгера — Мюллера (Лисицкий и Михель).

1 — счетчик Гейгера—Мюллера колоколообразной формы; 2 — свинцовая пластинка; 3 — алюминиевая пластинка; 4 — латунная пластинка; 5 — предохранительный алюминиевый кожух; 6 — щель; 7 — хроматограмма.

моделей, выпускаемых промышленностью, сведения о которых можно почерпнуть из фирменных проспектов. В основном можно различить следующие четыре типа, при этом некоторые приборы позволяют сделать выбор нескольких из этих возможностей:

а) Хроматограмма перемещается равномерно и частота импульсов регистрируется непрерывно (интенсиметр). Соответствующим подбором временной постоянной (произведение сопротивления и емкости) можно добиться того, чтобы прибор достаточно быстро регистрировал действительное распределение радиоактивности вдоль хроматограммы, но вместе с тем сглаживал бы неровности кривой, обусловленные статистическим характером измерения (Лерх и Нейкомм; Карлсон). В приборе Берте чувствительность автоматически изменяется в зависимости от активности проходящей зоны.

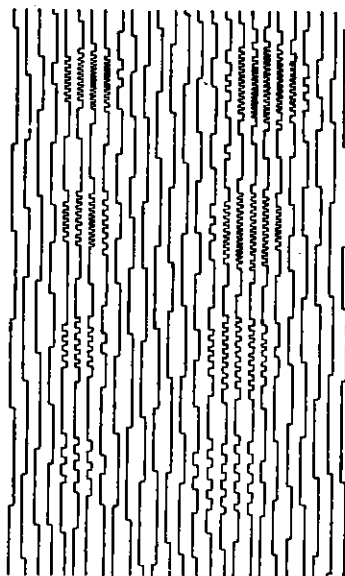
б) Хроматограмма перемещается равномерно, а отсчет импульсов регистрируется через заранее установленные промежутки времени или длины перемещений.

в) В принципе подобного же результата можно достичь и при прерывной подаче хроматограммы, если последняя в каждой позиции будет находиться в течение одинакового промежутка времени, причем измеряют либо полное число импульсов, либо их частоту (Уинтерингэм и сотрудники [3]).

г) Хроматограмма подается прерывно, причем в каждой позиции она находится столько времени, сколько необходимо для регистрации заранее установленного числа импульсов. Время остановки или соответственно обратная ему величина записывается (Рокланд и сотрудники). Удобство

подобного устройства состоит в том, что все измеряемые величины будут определены с одинаковой точностью, так как точность измерений пропорциональна квадратному корню из измеренного числа импульсов. Если величина, обратная времени, не записывается автоматически самим прибором, то отсчет нулевого хода будет несколько более сложным.

Отдельные модели отличаются, кроме того, измерительным устройством, подающим приспособлением (плоская линейка, намотка на катушки и т. п.), регистрирующим устройством. Можно пользоваться, например, полярографом (Вогноут и Релинг), электрокардиографом, молоточковым мультиграфом; кроме того, вместо графика можно печатать непосредственно



Р и с. 110. Автоматическая запись радиоактивности на двумерной хроматограмме (Уинго).

Хроматограмма, укрепленная на барабане, перемещается винтообразно перед счетчиком Гейгера—Мюллера с концевым оконцем, снабженным алюминиевым колпачком со щелью  $7 \times 3$  мм. Заранее установленное число импульсов фиксируется как отклонение от прямого направления (в сторону и обратно). Пятна, показанные на рисунке, содержали от 0,018  $\mu$  кюри (слева внизу) до 0,285  $\mu$  кюри (справа сверху)  $J^{131}$ .

числовые величины (Мюллер и Уайз, Хелльстрем). Расчет активности под каким-либо максимумом можно заменить автоматическим интегрированием.

Разработаны также устройства для промеривания двумерных хроматограмм (Уинтерингем [1]). Уинго помещает хроматограмму на барабан, на котором находится регистрирующая бумага. Барабан обладает винтовым движением; записываются группы импульсов в виде отклонений от прямой линии (рис. 110).

## ПРИМЕНЕНИЕ ФИЛЬТРОВ И ХАРАКТЕРИСТИК РАСПАДА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВЕЩЕСТВ

Нередко при одновременном применении двух различных радиоактивных изотопов можно получить важные биологические сведения; для этого необходимо выделить и отдельно определить излучение каждого из них. Для этой цели можно воспользоваться их различной проникающей способностью (табл. 12). Для того чтобы различить  $C^{14}$  и  $P^{32}$ , Бенсон применяет два слоя пленки, наложенные по одну сторону хроматограммы. На ближайшей эмульсии экспонируются оба излучения, на дальней — только  $P^{32}$ . В «писиловых» способах, о которых пойдет речь ниже, используют неодинаковое поглощение фильтром более жесткого излучения  $J^{131}$  и мягкого  $S^{35}$  или  $C^{14}$ . Фрайерсон и Джонс описывают способы отличия  $Na^{24}$  и  $K^{42}$  с помощью алюминиевых и свинцовых фильтров.

В смеси элементов, значительно отличающихся периодом полураспада, причем некоторые из них сравнительно недолговечны, для характеристики излучения на хроматограмме можно использовать различную степень убывания активности этих веществ во времени (Фрайерсон и Джонс). Например, в смеси  $Ni^{65}$ ,  $Fe^{59}$  и  $Zn^{69}$  постепенно убывают активности  $Ni^{65}$  и  $Zn^{69}$  и остается активность  $Fe^{59}$ . Иногда, наоборот, спустя некоторое время можно отчетливо обнаружить радиоактивность продуктов распада в том месте, где первоначально находился изотоп, обладавший более мягким излучением, например  $Pb^{210}$  (RaD) на бумаге превращается в  $Bi^{210}$  (RaE).

## ПРИМЕНЕНИЕ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Способы применения радиоактивных изотопов можно классифицировать согласно следующей схеме:

I. На хроматограмму наносят и подвергают разделению радиоактивные вещества:

- 1) разделяемые вещества сами являются радиоактивными;
- 2) к анализируемому образцу прибавляют радиоактивное вещество в качестве меченой добавки;
- 3) определяемые вещества превращают в радиоактивные с помощью подходящих реактивов:

- а) «пицциловый» и родственные ему методы;
- б) превращение в комплексы, содержащие  $Cu^{64}$ .

II. Хроматографированию подвергают неактивные вещества:

- 1) проявление ведут радиоактивным реагентом;
- 2) активируют облучением нейтронами.

## АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ВЕЩЕСТВА САМИ ЯВЛЯЮТСЯ РАДИОАКТИВНЫМИ

Сюда относятся все биохимические применения, о которых уже было упомянуто во введении. Кроме того, хроматография на бумаге применяется при выделении и контроле чистоты синтезированных органических соединений, а также в неорганической химии, особенно при исследовании смесей, образующихся при превращении элементов под действием облучения нейтронами или при делении урана (см. главу, касающуюся неорганических веществ; примером служит работа Фрайерсона и Джонса).

## ДОБАВКА МЕЧЕНОГО ВЕЩЕСТВА К АНАЛИЗИРУЕМОМУ ОБРАЗЦУ

Подобная добавка облегчает обнаружение пятен на хроматограмме и их идентификацию. Меченое вещество можно получить либо синтетически в лаборатории, либо биосинтезом (Тайтэс, Вейсс). Если после выделения определить удельную активность, то тем самым можно очень точно количественно определить вещество. Видоизменение определения этого типа приводит Квинке.

## МЕТОД ДВАЖДЫ МЕЧЕННЫХ ИЗОТОПНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Принцип можно пояснить следующей схемой на примере анализа аминокислоты А (пипсил = *n*-йодфенилсульфонил):

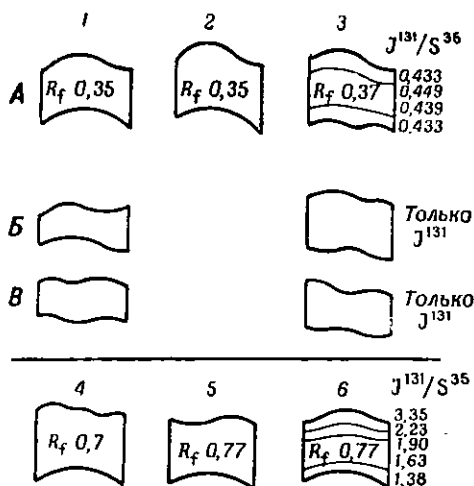
Аминокислоты меченой смеси (среди них находится А) J <sup>131</sup> - <i>n</i> -йодфенилсульфохлорид	}	Различные J <sup>131</sup> -пипсиламинокислоты (среди них также J <sup>131</sup> -пипсиламинокислота А)	}	Смешивают, выделяют пипсиламинокислоту А, не принимая во внимание выход, и устанавливают соотношение излучений J <sup>131</sup> /S <sup>35</sup>
Чистая S <sup>35</sup> -пипсиламинокислота А в известном количестве				

Активность фракций, содержащих пипсиламинокислоту А, измеряют без фильтра, а также с помощью алюминиевого фильтра толщиной 1,2 мм, поглощающего часть излучения S<sup>35</sup>, так что становится возможным рассчитывать отношение между излучениями J<sup>131</sup> и S<sup>35</sup> и из этого отношения — количество первоначально содержавшейся аминокислоты А. Для фракционирования,

Р и с. 111. Применение пипсильного метода для идентификации аминокислот.

Вверху: подтверждение идентичности J<sup>131</sup>-пипсил-γ-аминомасляной кислоты из головного мозга (1) с образцом синтетической S<sup>35</sup>-пипсил-γ-аминомасляной кислоты (2). 3 — смешанная хроматограмма обоих веществ, А — пипсил-γ-аминомасляная кислота, Б и В — J<sup>131</sup>-пипсильированные примеси в пробе (валин, пептид, ...).

Внизу: различие между J<sup>131</sup>-пипсильизолейцином (4) и S<sup>35</sup>-пипсильлейцином; 6 — смешанная хроматограмма обоих образцов.



о котором было сказано выше, хроматография на бумаге оказалась наиболее подходящей (Кестон и сотрудники [2]).

Метод можно также применить для контроля полноты фракционирования и более точной идентификации (Юденфренд; Велик и Юденфренд; рис. 111). Даже если пятна двух различных веществ, из которых одно мечено J<sup>131</sup>, а другое — S<sup>35</sup>, отличаются значениями R<sub>f</sub> лишь незначительно, отношение излучений J<sup>131</sup> и S<sup>35</sup> на верхнем и нижнем краях их общего пятна не остается одинаковым (см. нижнюю часть рис. 111).

Дальнейшее видоизменение метода заключается в применении вместо S<sup>35</sup>-пипсиламинокислот пипсильных производных C<sup>14</sup>-аминокислот (Кестон и Лоспаллито [1]). Было предложено также ацетилировать уксусным ангидридом, меченным H<sup>3</sup> и C<sup>14</sup> (Авиви и сотрудники).

Для разделения сложной смеси пипсиламинокислот необходимо проводить хроматографирование в нескольких системах растворителей. Несмотря на ряд преимуществ, неудобство метода «пипсильирования» для определения аминокислот состоит в его трудоемкости и непригодности вследствие этого для серийных анализов. Помимо аминокислот, метод был использован для пуринов и 5-окситриптамина.

### ХРОМАТОГРАФИЯ КОМПЛЕКСОВ С РАДИОАКТИВНОЙ МЕДЬЮ

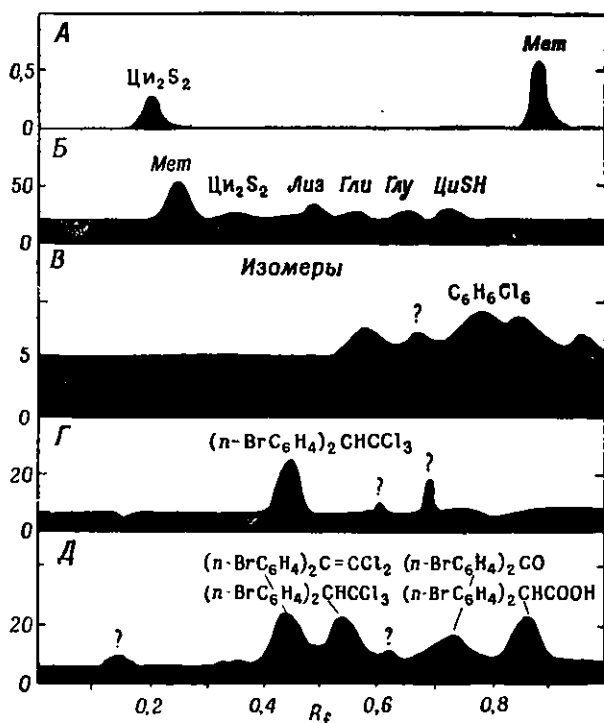
Этим способом можно разделить и определить незначительные количества аминокислот (Виланд и сотрудники; Блэкберн и Робсон). Метод мало распространен.

### ДЕЙСТВИЕ МЕЧЕНОГО РЕАКТИВА НА ХРОМАТОГРАММУ

Избыток радиоактивного реактива вымывают или дают ему испариться. На хроматограмме остается лишь часть реактива, эквивалентная определяемым веществам; ее активность измеряют. Примером могут служить применение  $\text{Cu}^{64}$  (Виланд и сотрудники) для аминокислот, радиометрическое определение йодного числа с помощью  $\text{I}^{131}\text{Br}$  (Кауфман и Будвиг), применение  $\text{I}^{131}$ -йодистого метила (Уинтерингэм [2]), открытие следов металлов при помощи  $\text{H}_2\text{S}^{35}$  (Ван Эркелен), определение сахаров восстановлением  $\text{Ag}^{110}$  (Яаарма).

### АКТИВАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРИ ПОМОЩИ ОБЛУЧЕНИЯ НЕЙТРОНАМИ

Готовую хроматограмму подвергают облучению нейтронами в атомном реакторе в течение достаточно долгого времени (Вейль; Уинтерингэм



Р и с. 112. Примеры различных способов применения радиоактивности в хроматографии на бумаге (Уинтерингэм).

Ось абсцисс: значения  $R_f$ . Ось ординат:  $\beta$ -активность (число импульсов в 1 сек). А — гидролизат белка пшеницы, выращенной на почве, содержащей  $\text{S}^{35}$ ; Б — пятна немеченых аминокислот, подвергнутые действию паров  $\text{CH}_3\text{I}^{131}$ , который метилировал аминокислоты с выделением радиоактивного йода; В — активированная нейтронной бомбардировкой хроматограмма изомеров гексахлорциклогексана [реакция  $\text{Cl}^{35}(\text{n}, \text{p})\text{S}^{35}$ ]; Г — активированная нейтронной бомбардировкой хроматограмма бромистого аналога ДДТ; Д — активированная нейтронной бомбардировкой хроматограмма бромистых аналогов производных ДДТ [реакция  $\text{Br}^{81}(\text{n}, \gamma)\text{Br}^{82}$ ].

и сотрудники [3]). Элементами, которые при этих обстоятельствах обладают эффективным сечением, достаточным для того, чтобы в процессе ядерной реакции превратиться в радиоактивные производные в обнаруживаемых количествах, являются, например, бром [реакция  $\text{Br}^{81}(n, \gamma) \text{Br}^{82}$ ] и хлор [реакция  $\text{Cl}^{35}(n, p) \text{S}^{35}$ ] (рис. 112). Радиоактивность фона «свободной» бумаги не столь велика, чтобы препятствовать определению соединений брома и хлора; иногда необходимо некоторое время, чтобы из фона исчезли кратковременно живущие изотопы. Условием применимости метода является, однако, то обстоятельство, что не должны возникать соединения, которые исчезали бы с бумаги. Интересную методику микроопределения неактивного  $\text{P}^{31}$  в присутствии  $\text{P}^{32}$  на хроматограммах разработали Уинтерингэм и сотрудники [2]: сначала измеряют на хроматограмме активность  $\text{P}^{32}$ , затем, спустя некоторое время, равное нескольким периодам полураспада, когда активность  $\text{P}^{32}$  на бумаге практически исчезнет, хроматограмму подвергают облучению нейтронами. С помощью реакции  $\text{P}^{31}(n, \gamma) \text{P}^{32}$  активируют неактивный до этого фосфор, который определяют по его активности и стандартному образцу. Излучение  $\text{S}^{35}$ , образовавшейся из хлора, поглощают алюминиевым фильтром.

## ЛИТЕРАТУРА

- Avivi P., Simpson S. A., Tait J. F., Whitehead J. K., Radioisotope Conf. (1954), Vol. I. Butterworths, London, стр. 313 (1954).  
 Bangham D. R., Biochem. J., 62, 550 (1956).  
 Benson A. A., Bassham J. A., Calvin M., Goodale T. C., Haas V. A., Stepka W., J. Am. Chem. Soc., 72, 1740 (1950).  
 Berthet J., Biochim. biophys. Acta, 15, 1 (1954).  
 Blackburn S., Robson A., Chemistry & Industry, 1950, 614.  
 Bouissière G., Lederer M., Bull. Soc. chim. France, 1952, 904.  
 Boulanger P., Montreuil J., Biochim. biophys. Acta, 9, 619 (1952).  
 Bourns J. V., Nature, 165, 399 (1950).  
 Broda E., Schönfeld T., Radiochemische Methoden der Mikrochemie. (Hdb. der mikrochemischen Methoden, Bd. II), Springer, Wien, стр. 1—250 (1955).  
 Calvin M., Bassham J. A., Proc. Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva, 1955, Vol. 12, United Nations, New York, стр. 347—357, 388—390 (1956).  
 Calvin M., Bassham J. A., Benson A. A., Federation Proc., 9, 524 (1950).  
 Carteson G., Acta Chem. Scand., 8, 1693 (1954).  
 Demorest H. L., Baskin R., Anal. Chem., 26, 1531 (1954).  
 Домая Н. Г., Труды комиссии по аналитич. химии, 6(9), 452 (1955).  
 Fink R. M., Dent C. E., Fink K., Nature, 160, 801 (1947).  
 Freudenberg K., Reichert M., Chem. Ber., 87, 1835 (1954).  
 Frierson W. J., Jones J. W., Anal. Chem., 23, 1447 (1951).  
 Hais I. M., Českoslov. Farmacie, 1, 681 (1952).  
 Harrison A., Winteringham F. P. W., Nucleonics, 13, № 3, 64 (1955).  
 Hellström B., Science Tools, 2, 1 (1955).  
 Jaarma M., Acta chem. Scand., 8, 860 (1954).  
 Kaufmann H. P., Budwig J., Fette u. Seifen, 53, 69 (1951).  
 Keston A., Lospalluto J., Federation Proc., 10, 207 (1951); 11, 239 (1952).  
 Keston A. S., Udenfriend S., Levy M., J. Am. Chem. Soc., 69, 3151 (1947).  
 Koloušek J., Liebster J., Babický A., Chem. Listy, 51, 154 (1957).  
 Lerch P., Neukomm S., Schweiz. med. Wschr., 84, 515 (1954).  
 Lindberg O., Hummel J. P., Arkiv Kemi, 1, № 2, 17 (1949).  
 Lissitzky S., Michel R., Bull. Soc. chim. France, 1951, 891.  
 Müller R. H., Wise E. M., Anal. Chem., 23, 207 (1951).  
 Quincke E., Biochem. Z., 327, 383 (1956).

- Racusen D. W., Aronoff S., Arch. Biochim. Biophys., 51, 68 (1954).  
Rockland L. B., Lieberman J., Dunn M. S., Anal. Chem., 24, 779 (1952).  
Roche J., Jutisz M., Lissitzky S., Michel R., Biochim. biophys. Acta, 7, 257 (1951).  
Sanwal B. D., в книге Linskens H. F. (red.), Papierchromatographie in der Botanik, Springer Verlag, Berlin, стр. 30 (1955).  
Titus E., Weiss H., J. biol. Chem., 214, 807 (1955).  
Udenfriend S., J. biol. Chem., 187, 65 (1950).  
van Erkelen P. C., Nature, 172, 357 (1953).  
Velick S. F., Udenfriend S., J. biol. Chem., 190, 721 (1951).  
Vohnout S., Röhling S., IV. celostát. sjezd českosl. fysiол., farmakol. a biochem., Starý Smokovec 13/6—1956.  
Weil H., Atomics (London), 1, 345 (1950), Weil H., Williams T. J., Angew. Chem., 63, 457 (1951).  
Wieland T., Schmeiser K., Fischer E., Maier-Leibniz H., Naturwissenschaften, 36, 280 (1949).  
Wingo W. J., Anal. Chem., 26, 1527 (1954).  
Winteringham F. P. W., Nature, 172, 727 (1953). [1]  
Winteringham F. P. W., Bridges P. M., Hellyer G. C., Biochem. J., 59, 13 (1955). [2]  
Winteringham F. P. W., Harrison A., Bridges R. G., Analyst, 77, 19 (1952). [3]

# ПРЕПАРАТИВНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ И НА ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ КОЛОНКАХ

---

*Ж. Прохазка, М. Кутачек*

Хроматография на бумаге пригодна для анализа ничтожных количеств сложных смесей веществ. Если, однако, целесообразно использовать принцип распределения, лежащий в основе хроматографии на бумаге, для препаративных целей, то обычная полоска фильтровальной бумаги оказывается уже недостаточной, и требуется специальная методика, отличающаяся от обычной.

## ПРЕПАРАТИВНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НА ЛИСТАХ БУМАГИ

Проще всего работать с толстыми хроматографическими бумагами, на которые можно наносить пробы в количествах, примерно в десять раз превышающих обычные.

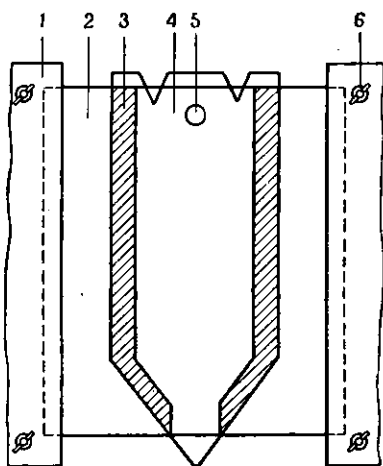
Часто пользуются бумагой ватман 3 толщиной около 0,3 мм, а также сатинированной бумагой ватман 3 ММ той же толщины. Бумага ватман 3 напоминает фильтровальный картон Ольшанских бумажных заводов (завод Вельке Лозины), который, однако, довольно загрязнен. Большей толщиной обладают бумаги и картоны фирмы «Итон — Дайкман» № 320 и бумага ватман 31 ЕТ. Наибольшей емкостью, однако, обладает бумага Шлейхер — Шюльц 2071, у которой на линию старта можно иногда нанести до 200 мг смеси (при диаметре пятна около 1,5 см) (см. также раздел, посвященный бумаге, стр. 105).

При восходящем методе работа с толстыми сортами бумаги не отличается от работы с обычными бумагами. При нисходящем способе у наиболее толстых бумаг над линией старта напивают более тонкую бумагу, обычно быструю бумагу ватман 4, чтобы ее было удобно поместить в желоб. Для бумаг тоньше 1 мм это, однако, не требуется, так как их можно легко изогнуть.

Фрайерсон применял вышеупомянутый картон фирмы «Итон — Дайкман», специально вырезанный и зажатый между стеклянными пластинками

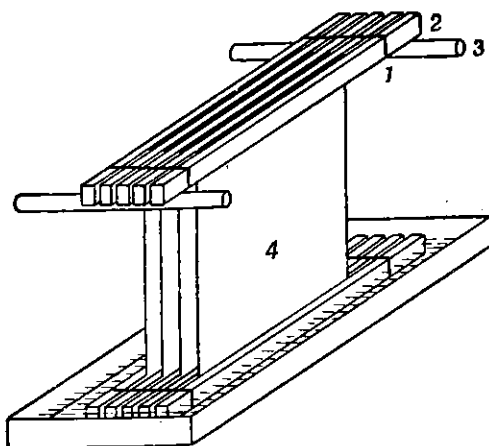
и платиновой фольгой, так что получалась своеобразная плоская колонка (рис. 113).

Значительно проще поступал Фишер, работавший с большим числом листов бумаги обычных сортов («мультипликативная» хроматография). Для экономии места, времени и растворителей он вкладывал между краями листов пластинки из пластмассы шириной 2 см и толщиной 2 мм, для того чтобы предотвратить соприкосновение листов. Пластинки выступали за боковые края листов и плотно стягивались на концах резиновыми



Р и с. 113. Препаративная хроматография на фильтровальном картоне, зажатом между стеклянными пластинками (Фрайерсон).

1 — фанерные листы, стягивающие стеклянные пластинки; 2 — стеклянные пластинки; 3 — платиновая фольга; 4 — фильтровальный картон; 5 — пятно нанесенной смеси; 6 — затяжные винты.



Р и с. 114. Хроматография на большом числе листов бумаги («мультипликативная» хроматография) (Фишер.)

Листы бумаги (1) отделены друг от друга планками из пластмассы (2), которые на концах стянуты резиновыми кольцами (3). Вся пачка листов вместе с планками подвешена на стеклянных стержнях (4), так, чтобы нижний конец был погружен в растворитель.

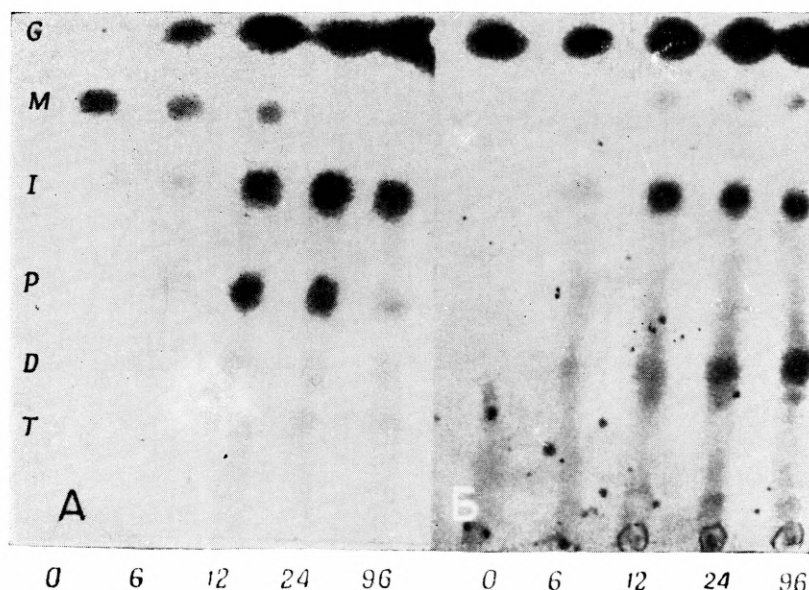
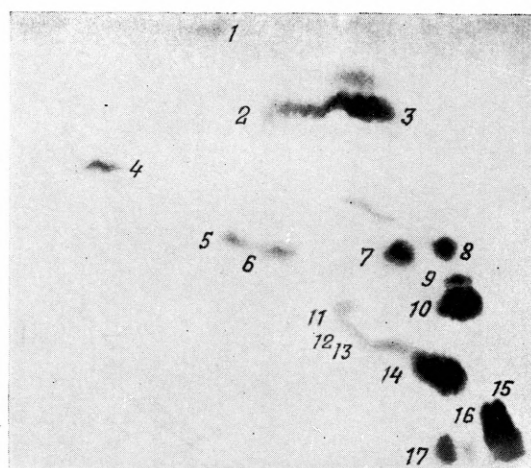
кольцами. Разделение проводилось восходящим способом (рис. 114). Одновременно можно хроматографировать на 50—100 листах в камере, лишь немного превышающей по размерам обычную хроматографическую камеру.

Количество вещества, которое можно разделить на одном листе, зависит не только от емкости бумаги, но и от емкости растворителя, т. е. от того, насколько хорошо вещество растворимо в данном растворителе. Показателем достаточной емкости растворителя служит то обстоятельство, что пятна и при нанесении большого количества вещества остаются круглыми. Известны случаи, когда на одном листе бумаги ватман 3 удавалось разделить до 200 мг смеси, а на бумаге Шлейхер — Шюль 2071 — количества порядка грамма.

Для элюирования поперечных полос разделенных веществ можно пользоваться методиками, описанными на стр. 177—179. Здесь мы упомянем лишь о методе Фишера, который измельчал вырезанные поперечные полосы в гомогенизаторе и затем экстрагировал в аппарате Сокслета.

Р и с. 105. Меченые соединения, образующиеся при фотосинтезе (продолжительность 60 сек) водорослью *Scenedesmus* в среде  $C^{14}O_2$  (Бенсон).

1 — гликолевая кислота; 2 — глицериновая кислота; 3 — яблочная кислота; 4 — аланин; 5 — гликокол; 6 — серин; 7 — аспарагиновая кислота; 8 — фосфопировиноградная кислота; 9 — фосфогликолевая кислота; 10 — фосфоглицериновая кислота; 11 — триозофосфат; 12 — пентозофосфат; 13 — маннозофосфат+фруктозофосфат; 14 — седогентулозофосфат; 15 — глюкозофосфат; 16 и 17 — уридиндифосфат глюкозы.

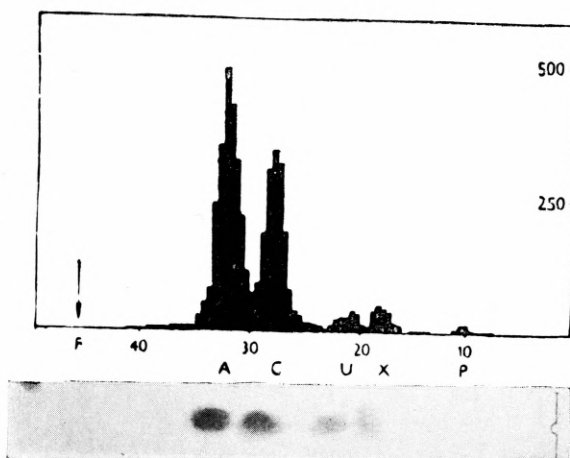


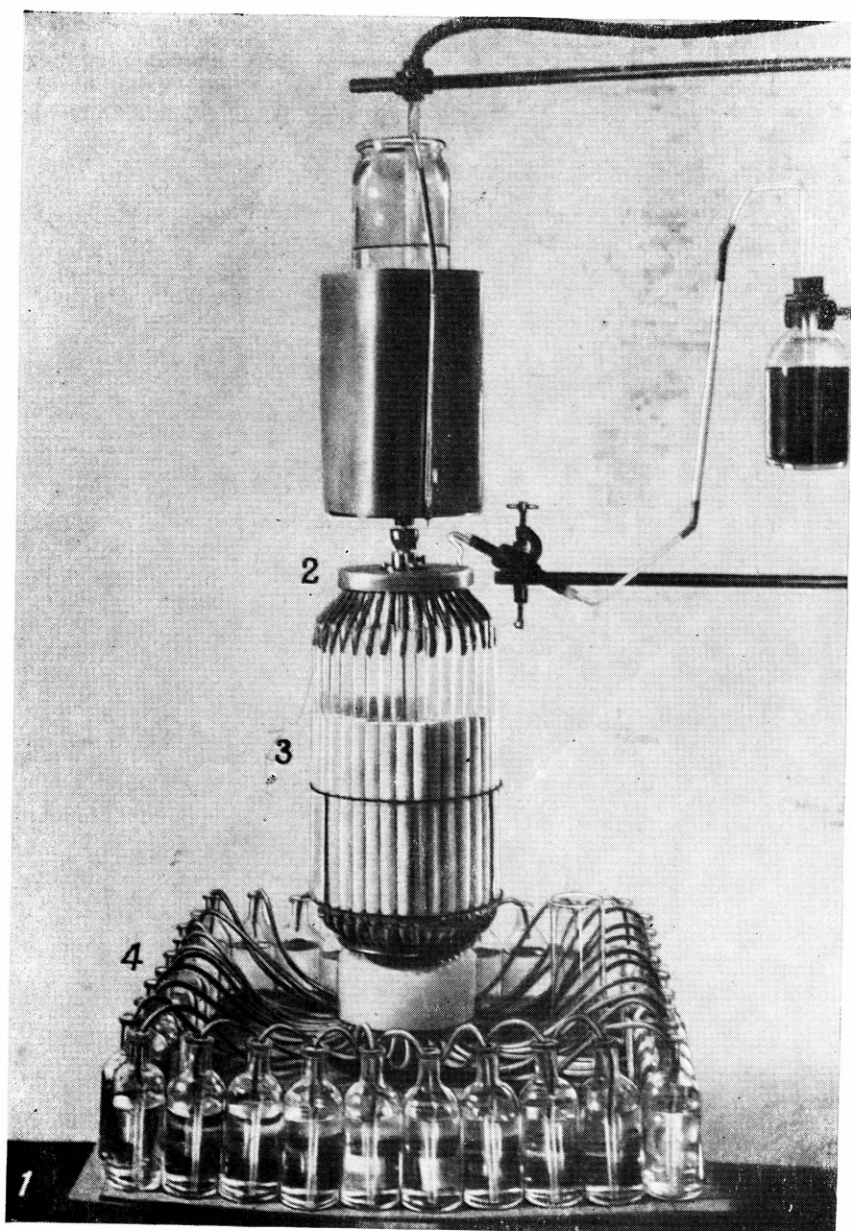
Р и с. 107. Авторадиография. Действие трансглюкозидазы *Aspergillus oryzae* на немеченую мальтозу и глюкозу, содержащую  $C^{14}$  (Пазур и Френч).

А — восстанавливающие вещества проявлены меднофосфомolibденовым реактивом. Б — авторадиография. На оси абсцисс приведено время отбора проб (в часах), на оси ординат перечислены сахара (от верхних значений  $R_f$  к нижним): G — глюкоза; M — мальтоза; I — изомальтоза; P — паноза; D — декстротриоза; T — тетрасахарид.

Р и с. 108. Внедрение  $P^{32}$  из неорганического фосфата в рибонуклеотиды печени (Буланже и Мюнье).

Хроматограмма одной из фракций, полученных из щелочного гидролизата. Вверху — радиоактивность (импульсы в 1 мин) отдельных вырезок из хроматограммы, внизу — авторадиограмма. Линия старта находится справа, фронт растворителя слева показан стрелкой. А — адениловая кислота; С — цитидиловая кислота; U — уридиловая кислота; X — неидентифицированное вещество; P — фосфорная кислота.





Р и с. 121. Непрерывная хроматография на колонках (Свенссон и сотрудники).  
 1 — деревянная рама, под которой расположены два синхронных мотора; 2 — устройство для подачи растворителя; 3 — круговая батарея медленно вращающихся хроматографических колонок; 4 — приемники для фракций.

## СТОЛБИКИ, ПАЧКИ И РУЛОНЫ ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ

### ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ В СТОЛБИКАХ БУМАГИ (ХРОМАТОПАЙЛ)

Митчелл и Хаскинс описали метод, названный хроматопайл. В этом методе используется большое количество кружков фильтровальной бумаги одинакового диаметра, сложенных столбиком. Последний с помощью стержней с винтовой нарезкой и гаек зажимают между двумя пластинками. Верхняя из них снабжена отверстиями для подачи растворителя. Кольцеобразная прокладка над ней образует углубление, закрываемое крышкой с трубкой для подачи растворителя. Трубка при помощи каучука соединена с бутылкой для растворителя (рис. 115). Несколько кружков бумаги пропитывают исследуемой пробой и высушивают. Перед началом разделения на верхнюю пластинку прибора, находящегося в перевернутом положении, помещают небольшое число кружков чистой бумаги (около 40 штук), затем кружки, пропитанные пробой, и, наконец, слой кружков чистой бумаги. Столбец стягивают гайками, переворачивают в нормальное положение и помещают в цилиндр,

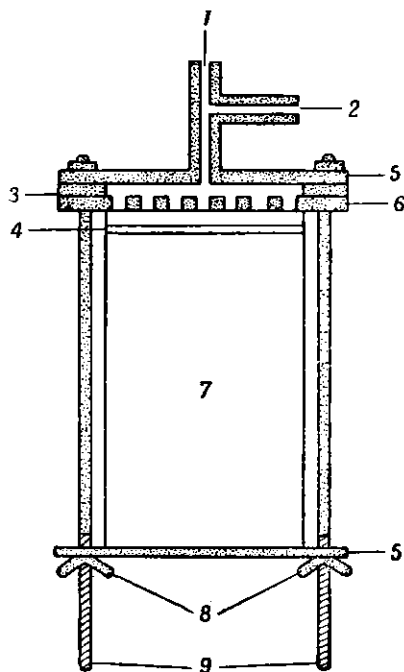


Рис. 115. Хроматопайл (хроматографический столбец) (Митчелл и Хаскинс).

1 и 2 — подача растворителя; 3 — каучуковая уплотнительная прокладка; 4 — кружки фильтровальной бумаги с нанесенным образцом; 5 — пластинка из нержавеющей стали; 6 — пластинка из нержавеющей стали с отверстиями для подвижной фазы; 7 — столбец из кружков фильтровальной бумаги; 8 — гайки для стягивания столбца; 9 — подставка с четырьмя ножками.

снабженный отверстием для подачи растворителя. В цилиндр заранее наливают около 200 мл растворителя для насыщения атмосферы его парами. Затем к прибору присоединяют бутылку с растворителем, уровень которого должен находиться на уровне верхней части столбика бумаги. Во время опыта бутылку поднимают. По окончании разделения столбик вынимают из камеры и разбирают. Проявление проводят непосредственно на отдельных кружках, либо после их элюирования. Обычно одновременно проявляют 6, 10 или 20 кружков и результат выражают графически (см. рис. 196).

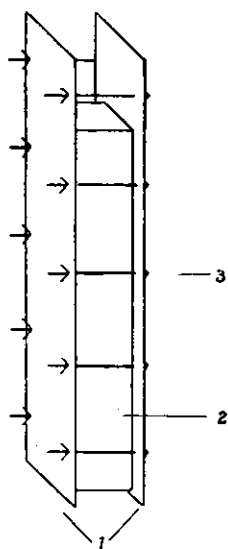
Проще выполняется разделение восходящим способом (Ван дер Вант и сотрудинки, Осима и Накабаяси), при котором можно не опасаться перетекания, так как по достижении верхних кружков подъем растворителя прекращается. Но и при восходящем способе необходимо следить за тем, чтобы столбец был надежно сжат (при помощи болтов или груза).

Удобство метода состоит в возможности нанесения значительного количества исследуемого образца и в возможности легкого перенесения образца вместе с кружком в другой столбец. При препаративной работе с помощью метода хроматопайл успех зависит от чистоты применяемого целлюлозного материала.

Некоторую аналогию с этим способом обнаруживает предложенная Цехмейстером колонка из кружков фильтровальной бумаги, вставленных в хроматографическую трубку. Способ, однако, не нашел широкого применения, так как необходимо, чтобы трубка и бумажные кружки имели совершенно одинаковые диаметры.

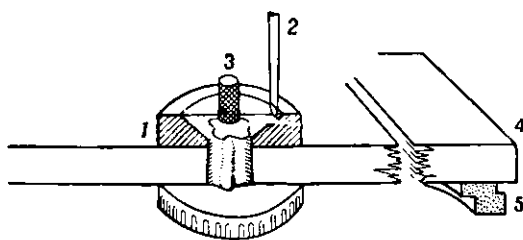
### ПАЧКИ БУМАГИ (ХРОМОПАК)

Портер подверг критике метод хроматопайл из-за образования конических зон и предложил новый способ, пригодный для препаративного разделения веществ, — способ хроматопак. Между двумя пластинками из нержавеющей стали при помощи болтов зажимают примерно 100 полос или листов бумаги (рис. 116). Образец наносят тонкой полоской вблизи нижнего края на одинаковой высоте на всех листах. Разделение проводят восходящим способом после погружения в цилиндр, на дно которого помещена чашка с растворителем. После разделения проявляют крайние и средний листы, и на основании результатов про-



Р и с. 116. Хроматопак (пачка хроматографической бумаги) (Портер).

1 — пластинки из нержавеющей стали; 2 — пачка фильтровальной бумаги; 3 — болты с гайками для стягивания пачки.



Р и с. 117. Препаративная круговая хроматография на пачке бумаги (Брокман и Патт).

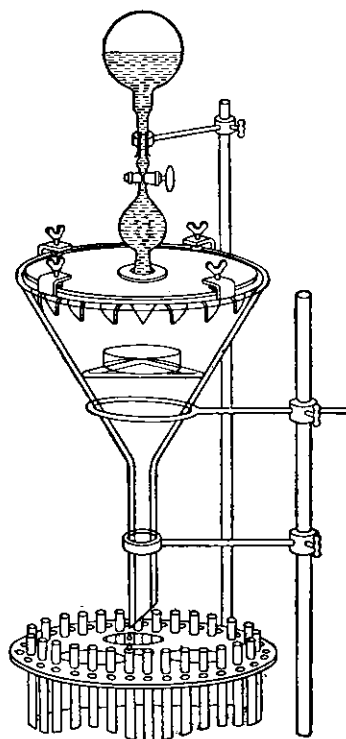
1 — воронка для подачи растворителя; 2 — нижний конец пипетки, с помощью которой подводят подвижную фазу (пипетка пропущена через крышку эксикатора); 3 — гайка, стягивающая пачку бумаги; 4 — пачка фильтровальной бумаги; 5 — фарфоровый диск. Все устройство помещено в эксикатор.

явления разрезают остальные листы и элюируют. По нашему мнению, «мультипликативная» хроматография Фишера обладает некоторыми преимуществами по сравнению с этим методом, хотя и имеет с ним много общего.

### Устройство для круговой хроматографии

Круговая хроматография на пачке бумаги по Брокману и Патту напоминает хроматографию с помощью хроматопака, показанного на рис. 116. В отличие от последнего пачка должна быть зажата только в центре, где

наносится образец и подводится растворитель, так как иначе вследствие капиллярности при движении подвижной фазы в отдельных слоях могут иметь место нарушения. Принцип способа ясен из рис. 117. 15 листов бумаги (например, Шлейхер — Шюльц 2043b) складывают вдвое и укладывают в пачку так, чтобы направление выработки совпадало во всех листах. Пачку в центре зажимают специальным устройством, которое одновременно играет роль сосуда для пропитывающего раствора и хроматографического растворителя и для нанесения пробы. Нижнее отверстие воронкообразного кольца, прижимающего пачку бумаги к нижнему диску с винтом (Parierpack), должно иметь такой же диаметр, как и отверстие, вырезанное в пачке. Сжатую пачку помещают, например, в широкий эксикатор, накрывают крышкой и через тубус в последней вставляют пипетку с краном наверху, позволяющую автоматически подавать растворитель, т. е. сначала буферный раствор. Когда отверстие в пачке и воронкообразное кольцо наполнятся жидкостью, приток из пипетки временно прекращают. После того как пачка пропитается буферным раствором, отверстие пипетки открывают и подают новую порцию жидкости. Скорость впитывания буферного раствора или растворителя можно регулировать натяжением гайки. После того как буферный раствор пропитает листы до краев, избыточную жидкость из



Р и с. 118. Прибор для проточной круговой хроматографии (Гири и Парихар).

Пачка бумажных кружков помещена между двумя стеклянными дисками (диаметр 28 см). В верхнем диске прорезано отверстие, снабженное пластмассовым кольцом. Подвижную фазу подводят из перевернутой капельной воронки, на которую насажена колба. Стеклянные диски вместе с пачкой бумаги помещены в стеклянную воронку (диаметр 31 см), в которую вложена чашка Петри, содержащая растворитель для насыщения атмосферы. Разделение проводят с перетеканием, и капли из воронки стекают в пробирки, размещенные на автоматическом сборнике фракций.

воронкообразного кольца удаляют, быстро перевортывая пачку. Затем таким же образом дают пачке пропитаться раствором разделяемой смеси, наиболее подходящую концентрацию которой следует установить в предварительном опыте. Когда большая часть раствора впитается, начинают приливать из автоматической пипетки растворитель, не допуская, чтобы в это время раствор смеси впитался полностью.

На пачке в шестьдесят листов размером примерно  $30 \times 30$  см авторам удалось разделить таким образом 600 мг сырой смеси родомицинов А и Б, причем потребовалось 400 мл *n*-бутанола. Для достижения такого же результата при разделении 680 мг смеси способом противоточного извлечения понадобилось 550 операций и 13,7 л *n*-бутанола.

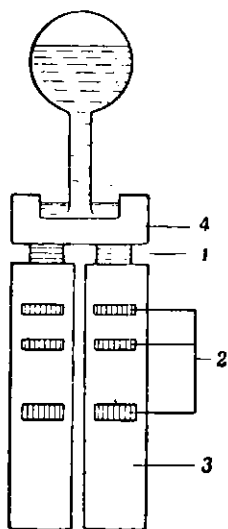
Комбинацию этого способа с проточной хроматографией представляет собой способ Гири и Парихара, которые, остроумно использовав пачку из 4 или 5 круговых хроматограмм на толстой бумаге ватман 3, добились

возможности фракционировать вытекающий раствор (рис. 118). Гири и Парихар зажимают пачку между стеклянными дисками, причем верхний из них снабжен отверстием диаметром 3,2 см, через которое вводят раствор пробы и приливают растворитель. Край круглой пачки снабжен бумажными зубцами, отогнутыми так, чтобы они касались воронки и облегчали стекание элюата.

### БУМАЖНЫЕ РУЛОНЫ

Восходящую хроматографию на плотно стянутом рулоне бумаги, вставленном в горло колбы Эрленмейера или в стеклянную трубку и зафиксированном каучуковой пробкой, предложил Фучик, а Прохазка и Коржистек [2] использовали ее для препаративных целей. Горак и Славик применяли для нисходящего разделения бумагу, плотно намотанную на стержень (неопубликованные данные).

Подобным, но значительно более совершенным устройством пользовались Хагдаль и Даниельссон. Рулон бумаги, намотанный на центральный стержень из инертного материала (изготовлено фирмой «Гриксбо Папперсбрук»), помещали в трубку из политена. После извлечения стержня внутреннюю полость заливали парафином для того, чтобы после хроматогра-



Р и с. 119. Препаративная хроматография на бумажном рулоне (Хагдаль и Даниельссон).

1 — кольца фильтровальной бумаги с нанесенным образцом; 2 — схематическое изображение полос разделенных веществ; 3 — бумажный рулон; 4 — резервуар из фильтровальной бумаги.

фирования рулон можно было разрезать. Перед началом разделения рулон пропитывают растворителем, благодаря чему он набухает и весьма плотно прилегает к стенкам трубки и стержню. Это способствует более равномерному протеканию растворителя, ровному его фронту, и более четкому разделению. Нанесение и элюирование показаны на рис. 119. Дальнейшее усовершенствование заключается в помещении рулона в рубашку для повышенного давления.

### КОЛОНКИ ИЗ ПОРОШКООБРАЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Наиболее часто применяемым способом является препаративное разделение с помощью распределительной хроматографии на колонках из целлюлозы. Можно пользоваться также гидратцеллюлозой, оксигидратцеллюлозой (которая функционирует, как катионит) и ацетилцеллюлозой. Для некоторых целей пригодны иониты, получаемые из целлюлозы введением диэтиламиноэтильных, карбоксиметильных и фосфатных групп (для хроматографии белков в сыворотках или соматотропного гормона; Петерсон и Совер; Эллис и Симпсон, см. стр. 107), а также целлюлоза, частично этерифицированная резорцином (Лерман), и др.

### ВЫБОР ЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА

Для работы на колонках пригодны различные виды целлюлозных материалов: измельченная или порошкообразная бумага, мелкие древесные опилки, целлюлозная мука различной дисперсности, растертая в порошок и просеянная вата и т. п. Волокнистые материалы непригодны. За исключением ваты, все упомянутые материалы не обладают достаточной чистотой, и перед употреблением их следует очистить. Для этого рекомендуется последовательная экстракция следующими растворителями: разбавленный аммиак, вода, разбавленная уксусная кислота, этанол и хлороформ. После экстракции промывают эфиром и высушивают. Практически столь же эффективна экстракция пиридином, водой и ацетоном. Экстракцию можно производить как в аппарате Сокслета, так и размешиванием целлюлозы с растворителем и отсасыванием на воронке Бюхнера.

Наиболее часто используется и вместе с тем наиболее чиста порошкообразная целлюлоза фирмы «Ватман». Часто пользуются также порошком фирмы «Браун компани» под названием «Солка-Флок». В Чехословакии порошкообразную целлюлозу различной степени измельчения выпускает Бельский бумажный завод (Бела под Бездезом). Она содержит значительные загрязнения, но после очистки обладает хорошими свойствами. В продаже также имеется гидратцеллюлоза (Табон и сотрудники). Ее можно изготовить из обычной фильтровальной бумаги действием соляной кислоты (Прохазка; частично гидролизованная бумага в сухом виде очень хрупка и легко может быть измельчена; ее можно также измельчить перемешиванием водной суспензии) или по способу Гирдза и сотрудников (II 16), которые применяли колонки из смеси целлюлозы и гидратцеллюлозы. Порошок ацетилцеллюлозы применял Боскотт; оксидцеллюлозу, хорошо зарекомендовавшую себя для препаративного разделения различных веществ, использовали Аствуд, Виланд и Берг и др.

Описание приготовления специально обработанных целлюлоз (карбосиметилцеллюлозы, фосфорилированной целлюлозы и т. п.) выходит за рамки этой книги, и мы отсылаем читателя к оригинальной литературе (Лерман, Петерсон и Совер, Эллис и Симпсон и др.). Ниже (II 17) мы приводим описание получения диэтиламиноэтилцеллюлозы (ДЭАЭ).

### НАПОЛНЕНИЕ КОЛОНОК

Наполнение колонок определяется способом разделения. Большую часть разделение проводят нисходящим способом (с перетеканием) в стеклянных трубках. Для восходящей хроматографии или в тех случаях, когда при нисходящем способе остаются неотмытыми отдельные зоны веществ, удобно пользоваться продольно разрезанной стеклянной трубкой (Голейшовский и сотрудники), которую плотно обматывают слоем целлофана. Последний после высушивания стягивает обе половины трубки так тесно, что при хроматографировании растворитель не будет вытекать из трубки. По окончании разделения и вытекании всего растворителя целлофановый пояс разматывают и разъединяют обе половины трубки. Освобожденный от оболочки столбик после проявления разрезают на соответствующие части и из последних экстрагируют чистые вещества.

Добиться равномерности наполнения колонки при работе с целлюлозными материалами труднее, нежели при применении неорганических адсорбентов. Поэтому наполнение целлюлозной колонки требует особого

внимания. Наполнять колонку можно как сухой целлюлозой, так и ее суспензией в каком-либо растворителе. При наполнении сухим материалом легче добиться правильности зон и, кроме того, удастся лучше приблизиться к условиям, имеющим место при хроматографии на бумаге, по крайней мере в смысле весового соотношения носителя и растворителя (см. ниже). Трубку заполняют малыми порциями порошка при непрерывном постукивании со всех сторон (вибратор), и после каждого добавления порошок хорошо утрамбовывают плотным, лучше дырчатым, поршнем. Наполненную таким способом трубку промывают сначала неподвижной, а затем подвижной фазой, вытесняющей избыток неподвижной; промывают до тех пор, пока из трубки не начнет вытекать только чистая подвижная фаза. Фишер наполнял трубку диаметром 15 см и высотой 40 см сухим порошком целлюлозы и проводил хроматографирование восходящим способом. Более подробно см. в оригинальной работе Фишера.

Часто хроматографические трубки наполняют суспензией порошкообразного материала в менее полярной подвижной фазе, насыщенной неподвижной (полярной) фазой. По осаждению порошок промывают тем же растворителем (менее полярной фазой). Равномерное осаждение обеспечивается использованием вибрационной мешалки.

Нередко трубку наполняют суспензией целлюлозы в неподвижной, чаще всего полярной (водной) фазе. После полного осаждения избыток неподвижной фазы вытесняют подвижной фазой. Можно также наполнять трубку суспензией целлюлозы в ацетоне, вытеснить ацетон водой или соответствующей неподвижной (более полярной) фазой, а эту последнюю — подвижной фазой.

Тщательно высушенной целлюлозой можно, как ни парадоксально это может показаться, пользоваться в качестве носителя неполярной фазы (бензина). Для этого колонку следует наполнять сухой целлюлозой и затем промывать петролейным эфиром или прямо наполнять суспензией сухой целлюлозы в петролейном эфире. Если затем вытеснить избыток петролейного эфира сильно полярными растворителями (лучше всего водным метанолом; Кучера и сотрудники), получим колонку с обращенными фазами. Такие колонки, однако, большей частью обладают малой емкостью.

Преимущество работы на целлюлозных колонках состоит в том, что можно пользоваться и сильно летучими растворителями (в том числе и для неполярной неподвижной фазы), которых приходится избегать при хроматографии на бумаге. Недостаток заключается в том, что разделение не бывает столь же четким, как на бумаге.

Упомянем еще о некоторых принципах, которые следует иметь в виду при работе на целлюлозных и аналогичных колонках:

а) Расход растворителя должен быть очень небольшим, чтобы между обеими фазами успевало установиться равновесие, которое осуществляется при помощи медленного процесса — диффузии.

б) Необходимо работать при постоянной температуре, в противном случае будет происходить нарушение равновесия между фазами, что нередко влечет за собой неприятные последствия.

в) Значения  $R_f$  на колонке оказываются значительно выше, чем на бумаге. Это обусловлено тем, что относительное количество подвижной фазы в колонке больше, чем на бумаге. Целлюлоза как бы плавает в протекающем растворителе, тогда как через бумагу он лишь просачивается.

Деккер и Сано вывели уравнение (34), на основании которого можно рассчитать условия выхода определенного вещества из колонки. Расчет

производят на основании данных, полученных для той же системы растворителей при хроматографировании на бумаге<sup>1)</sup>. После внесения вещества в колонку, содержащую  $G$  г целлюлозы, вещество пройдет через нее по истечении  $v_R$  мл растворителя:

$$v_R = G \left[ \gamma_p \left( \frac{1}{R_{fp}} - 1 \right) + \gamma_s \right], \quad (34)$$

где  $R_{fp}$  есть  $R_f$ , измеренное на бумаге;  $\gamma_p$  — количество растворителя на 1 г бумаги;  $\gamma_s$  — количество растворителя на 1 г порошкообразной целлюлозы. Значения  $\gamma_p$  и  $\gamma_s$  определяют весовым путем. Из уравнения (34) можно также вычислить значения  $R_{fs}$ , т. е.  $R_f$ , измеренное на колонке:

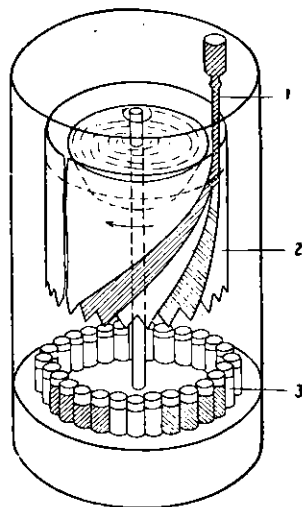
$$R_{fs} = \frac{G\gamma_s}{v_R} = \frac{1}{\frac{\gamma_p}{\gamma_s} \left( \frac{1}{R_{fp}} - 1 \right) + 1}. \quad (35)$$

Для хорошего разделения важно, чтобы значение  $R_{fs}$  было в пределах 0,2—0,5.

г) Последовательность перемещения веществ при хроматографировании на различных носителях не всегда одинакова. Даже для крахмала и целлюлозы она не всегда совпадает.

## НЕПРЕРЫВНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Впервые идею непрерывной хроматографии на бумаге осуществил Сольмс. Принцип этого способа наиболее ясен из рис. 120. Метод основывается на перемещении бумаги во время разделения в направлении, перпендикулярном движению растворителя. Для этого бумагу следует свернуть в цилиндр и верхний край ее, надрезанный в виде бахромы, погрузить в круглую лодочку (чашку). Нижний край делают зубчатым для облегчения стекания растворителя в сосуды для собирания фракций. Бумажный цилиндр с лодочкой равномерно вращается вокруг своей оси. Из закрепленной автоматически регулируемой



Р и с. 120. Непрерывная хроматография на бумаге (Сольмс).

Бумага накинута на круглую чашку, содержащую подвижную фазу, так, что образуется бумажный цилиндр (2). Разделяемую пробу подводят по прочно закрепленному капилляру (1). Чашка с цилиндром вращается, и отдельные фракции стекают по каплям в подставленные сосуды (3).

пипетки на бумажный цилиндр непрерывно поступает раствор разделяемой смеси. Таким образом, нанесенные вещества движутся в двух направлениях: все вместе с носителем (бумажным цилиндром) с одинаковой скоростью в горизонтальном направлении и вместе

<sup>1)</sup> Авторы предполагают, что количество неподвижной фазы, приходящееся на единицу веса целлюлозного носителя, одинаково для колонки и для бумаги. Поэтому уравнения (34) и (35) недействительны, если на колонке сначала задерживают водную фазу, что является наиболее частым случаем.

с просачивающимся растворителем с разной скоростью, пропорциональной соответствующим величинам  $R_f$ . Благодаря этому для каждой составной части получается свой собственный путь винтообразной формы. Наклон этих путей является функцией скорости вращения цилиндра и величин  $R_f$ . Разделенные компоненты стекают с зубчатого края бумаги в неподвижные сосуды для собирания элюата. Автор в своей работе сообщает, что скорость вращения цилиндра составляла 1,3 см/час. Он разделял, например, этим способом 37,2 мг смеси хлористого лития и хлористого калия за 50 час или 17 мг смеси ксилозы и галактозы за 21 час. Прибор, однако, мог оставаться в непрерывной эксплуатации лишь до 10 суток.

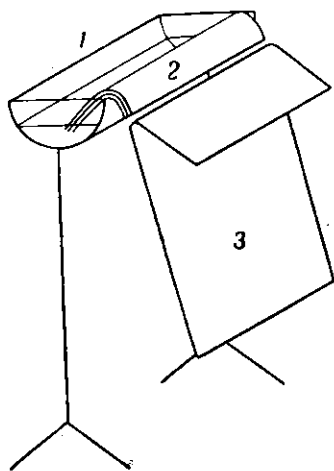
По данным Свенссона и сотрудников подобным же образом можно проводить непрерывную хроматографию на колонке (рис. 124), группируя 36 колонок, совершенно одинаковых и одинаково наполненных, по окружности так, чтобы они образовали как бы полый цилиндр. В качестве носителя можно использовать рулоны фирмы «Гриксбо Папперсбрук» (см. выше, стр. 212). Прочие детали мы не описываем, так как способ не получил широкого распространения.

Недостаток такого рода устройств заключается в том, что они позволяют разделять всего лишь 2—3 вещества, а также в сложности конструкции.

Выбор метода диктуется различными обстоятельствами, как, например, доступностью и дешевизной целлюлозного материала и аппаратуры, необходимостью и возможностью применять сборник фракций, степенью летучести растворителя, а главное, требуемой четкостью разделения.

### ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ДЛЯ НАНЕСЕНИЯ

При препаративной хроматографии с большим числом листов (хроматопок, мультипликативная хроматография, рулоны) нанесение представляет собой весьма длительную операцию, поэтому были предложены различные приспособления, позволившие ускорить ее. Новелли, например, предложил приспособление из толстой бумаги.



Через край желоба, содержащего раствор исследуемой смеси, свешивают 1—3 полосы толстой бумаги, которая впитывает анализируемый раствор. Хроматографическую бумагу перегибают на расстоянии 5 см от края и линию перегиба прикладывают к продольному краю полос, про-

Р и с. 122. Способ нанесения длинной полоски на стартовую линию хроматограммы (Новелли). 1 — желоб с раствором пробы; 2 — толстая фильтровальная бумага, служащая фитилем; 3 — лист хроматографической бумаги, на сгиб которого посредством соприкосновения с 2 наносят пробу.

питанных раствором образца. Хроматографическую бумагу удерживают между большим и указательным пальцами так, чтобы перегнутые части не соприкасались. По высыхании образца, нанесенного в виде полоски,

процесс повторяют столько раз, сколько требуется, затем хроматографируют (рис. 122). Был также описан способ нанесения больших количеств образца в форме широкой черты с помощью капилляра или медицинского шприца на хроматографическую бумагу, укрепленную на вращающемся барабане кимографа (Яновский и сотрудники). Быстро наносить смесь на несколько полос или листов можно с помощью кисточки. Однако такой способ нанесения не всегда приводит к достаточно равномерному распределению смеси по поверхности бумаги.

Другие способы нанесения значительных количеств образца опубликовали фон Эйлер и Элиассон, Партридж с сотрудниками и др. См. также главу, посвященную нанесению (стр. 96—100).

## ЛИТЕРАТУРА

- Astwood E. B., Raben M. S., Payne R. W., Grady A. B., J. Am. Chem. Soc., **73**, 2669 (1951).  
 Boscott R. J., Nature, **159**, 342 (1947).  
 Brockmann H., Patt P., Naturwissenschaften, **40**, 221 (1953).  
 Decker P., Sano I., Z. physiol. Chem., **300**, 252 (1955).  
 Ellis S., Simpson M. E., Federation Proc., **14**, 44 (1955).  
 Euler U. S. von, Eliasson R., Nature, **170**, 664 (1952).  
 Fischer A., Planta, **43**, 288 (1954).  
 Frierson W. J., Thomason P. F., Raaien H. P., Anal. Chem., **26**, 1210 (1954).  
 Geerdes J. D., Lewis B. A., Montgomery R., Smith F., Anal. Chem., **26**, 264 (1954).  
 Giri K. V., Parihar D. B., Nature, **175**, 304 (1955).  
 Hagdahl L., Danielsson C. E., Nature, **174**, 1062 (1954).  
 Holeyšovský V., Mikeš O., Šorm F., Českoslov. pat. přihláška PV-2481-55.  
 Kučera J., Procházka Ž., Vereš K., Chem. Listy, **51**, 97 (1957).  
 Lerman L. S., Nature, **172**, 635 (1953).  
 Mitchell H. K., Haskins F. A., Science, **110**, 278 (1949).  
 Novellie L., Nature, **169**, 672 (1952).  
 Oshima Y., Nakabayashi T., J. Agr. chem. Soc. Japan, **27**, 759 (1953).  
 Partridge C. W. H., Bonner D. M., Yanofsky C., J. biol. Chem., **194**, 269 (1952).  
 Peterson E. A., Sober H. A., Federation Proc., **13**, 273 (1954).  
 Porter W. L., Anal. Chem., **23**, 412 (1951).  
 Procházka Ž., Chem. Listy, **44**, 158 (1950). [1]  
 Procházka Ž., Kořístek S., Chem. Listy, **45**, 415 (1951). [2]  
 Solms J., Helv. chim. Acta, **38**, 1127 (1955).  
 Svensson H., Agrell C., Dehlén S., Hagdahl L., Science Tools, **2**, 17 (1955).  
 Tabone J., Mamounas N., Thomassey S., Bull. Soc. chim. biol., **33**, 1557 (1951).  
 Van der Want G. H., Peters H., Inklaar P., Recueil, **71**, 1221 (1952).  
 Wieland T., Berg A., Angew. Chem., **63**, 511 (1951).  
 Yanofsky C., Wassermann E., Bonner D. M., Science, **111**, 61 (1950).  
 Zechmeister L., Science, **113**, 35 (1951).



***СПЕЦИАЛЬНАЯ  
ЧАСТЬ***



# СПИРТЫ

---

К. М а ц е к

В этой главе рассматриваются методы хроматографии одноатомных алифатических спиртов, гликолей и алициклических спиртов. Хроматографирование многоатомных спиртов, кроме алициклических многоатомных спиртов и глицерина, приведено в главе об углеводах (стр. 278), в разделе о сахароспиртах.

## АЛИФАТИЧЕСКИЕ СПИРТЫ

### НИЗШИЕ ОДНОАТОМНЫЕ СПИРТЫ

Поскольку низшие одноатомные спирты летучи, прямое хроматографирование их невозможно. Спирты можно хроматографировать после окисления их в соответствующие кислоты (Томпсон) или, что чаще, после перевода в соответствующие производные.

При хроматографировании этой группы спиртов или их производных в системах с неподвижной полярной фазой имеет место следующее правило: удлинение углеводородной цепочки спирта увеличивает значение  $R_f$ , и, наоборот, разветвление, особенно циклизация цепи, снижает величину  $R_f$ . Разделение изомерных первичных спиртов невозможно из-за слишком близких величин  $R_f$ . Первичные спирты могут быть отделены от вторичных, так как последние, например в форме 3-нитрофталатов, имеют более низкие величины  $R_f$ , чем первичные. Однако по данным Мейгха вторичные спирты в форме 3,5-динитробензоатов характеризуются более высокими величинами  $R_f$ , чем первичные.

Большинство из нижеприведенных методов разделения низших спиртов дает сравнительно хорошие результаты; затруднен лишь выбор наиболее пригодного метода. Весьма хорошего разделения достигают при хроматографировании 3,6-динитрофталатов (Момосэ и Ямада). Ангидрид 3,6-динитрофталевой кислоты труднодоступен, поэтому Зигель и Шлёгль пытались хроматографировать полуэфиры 3-нитрофталевой кислоты.

Несмотря на приемлемые величины  $R_f$ , указанный метод не получил распространения, так как при этой реакции образуются два изомерных 3-нитрофталата с различными значениями  $R_f$ .

### Окисление спиртов в кислоты

Смесь спиртов, извлеченных из природного материала, первоначально обрабатывают 2,4-динитрофенилгидразином (для удаления соединений с карбонильной группой), затем из раствора отгоняют спирты и окисляют их хромовой кислотой (Томпсон). Образующиеся при этом кислоты вновь отгоняют, дистиллат нейтрализуют едким натром до pH 8 и выпаривают досуха. Натриевые соли кислот анализируют одним из методов, приведенных в разделе о низших жирных кислотах (стр. 232).

### 3,5-Динитробензоаты спиртов

Райц и сотрудники разработали метод разделения спиртов в форме 3,5-динитробензоатов (*П 18*); авторы приводят различные системы растворителей для разделения смесей двух известных спиртов. Более пригодным для этой цели может оказаться метод Мейгха, согласно которому разделение производных спиртов производят гептаном, насыщенным метанолом, в камере, насыщенной обоими растворителями.

По данным Черного этим методом можно разделять спирты только от метанола до пропанола. Наилучших результатов достигли Вечера с сотрудниками при разделении 3,5-динитробензоатов метанола — бутанола на бумаге, пропитанной диметилформамидом с циклогексаном в качестве подвижной фазы (рис. 123). Для проявления указанных производных спиртов применяют (Райс и сотрудники) 1-нафтиламин (*Д 8*). Черный проявляет эти соединения диэтиловым эфиром малоновой кислоты (*Д 9*). Вечера и сотрудники разработали интересный метод проявления 3,5-динитробензоатов; согласно этому методу, хроматограмму облучают нефльтрованным светом ртутной лампы; при этом в присутствии диметилформамида (в качестве неподвижной фазы) возникают пятна фиолетового цвета с красной флуоресценцией в ультрафиолетовом свете. По данным авторов чувствительность этого метода 2—3  $\mu\text{г}$ .

### 3,6-Динитрофталаты спиртов

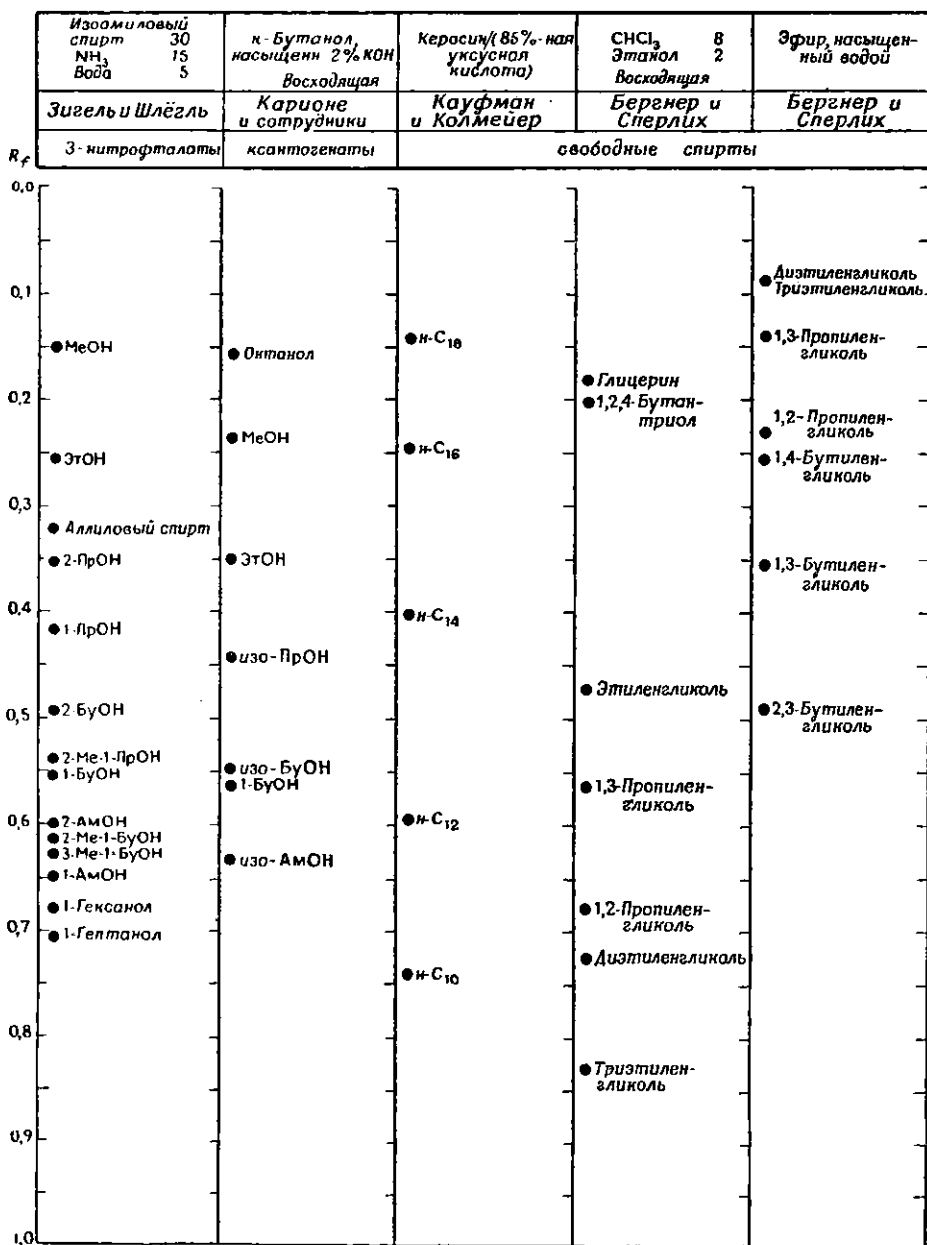
По методу Момосэ и Ямада эти производные (*П 19*) можно разделить при помощи системы растворителей *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5. Для проявления хроматограмм авторы используют цветные реакции этих производных со щелочами и эфирами кислот (*Д 10*).

### Моноэфиры дифеновой или 3-нитрофталевой кислот

Хроматографирование производных (*П 20*) проводят по Зигелю и Шлэглю с применением системы растворителей изоамиловый спирт — аммиак — вода в соотношении 30 : 15 : 5. Величины  $R_f$  приведены в табл. 13. Для проявления применяют 0,025%-ный водно-спиртовый раствор умбеллиферона; последний с вышеуказанными производными дает в ультрафиолетовом свете темные пятна на светлом флуоресцирующем фоне.

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  СПИРТОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Таблица 13



### Ксантогенаты

Сравнительно просто идентифицировать спирты по методу Карионе и сотрудников. Эти авторы хроматографируют ксантогенаты (II 21), применяя в качестве растворителя н-бутанол, насыщенный 2%-ным раствором едкого кали. Для проявления хроматограммы можно пользоваться

реактивом Гроте (*Д 11*) или непосредственно наблюдать коричневые пятна в ультрафиолетовом свете. Указанным методом авторы определили 0,4% метанола в этаноле.

### ВЫСШИЕ ОДНОАТОМНЫЕ СПИРТЫ

Спирты, содержащие от 10 до 18 атомов углерода, можно разделить по Кауфману и Колмейеру способом, аналогичным применяемому при разделении высших жирных кислот. Для проявления спиртов применяют родамин (*Д 16*) или после окисления их озоном проявляют соответствующие кислоты (стр. 232). Высшие одноатомные спирты мало летучи, и при хроматографическом анализе нет необходимости переводить их в какие-либо производные. Разделение указанных спиртов проводят 85%-ной уксусной кислотой на бумаге, пропитанной керосином (*П 12*). Величины  $R_f$  спиртов приведены в табл. 13.

### ГЛИКОЛИ

#### Приготовление пробы

Ввиду малой чувствительности реакций проявления гликолей для их хроматографирования иногда целесообразно пользоваться более концентрированными растворами. Поскольку гликоли летучи, концентрирование разбавленных растворов путем перегонки не рекомендуется. По Бергнеру и Сперлиху целесообразно водные растворы гликолей или природный материал подвергнуть экстракции эфиром с последующим упариванием раствора.

#### Проявление

Вопрос проявления гликолей все еще окончательно не решен. Для их проявления Хаф рекомендовал азотнокислое серебро (*Д 4в* с изменениями Бергнера и Сперлиха). Этот реактив получил наиболее широкое применение. Чувствительность проявления этим реактивом для  $\alpha$ -гликолей в десять раз меньше, чем для сахаров; для 1,3- или 1,4-диолов она еще в два раза меньше. Исходя из этого, на бумагу следует наносить от 100 до 500  $\mu$ г отдельных гликолей. Для проявления  $\alpha$ -гликолей можно также пользоваться реактивами, приведенными в главе о сахарах. По данным Бергнера и Сперлиха образование на бумаге производных гликолей и их проявление, как это имеет место при анализе одноатомных спиртов, не удалось.

Гликоэфиры (простые эфиры гликолей) с азотнокислым серебром не реагируют; поэтому для их проявления необходимо сначала провести гидролиз разбавленной соляной кислотой в капилляре при 200°.

#### Системы растворителей

Для разделения этиленгликоля, триметиленгликоля и глицерина пользуются обычными системами растворителей, содержащими *n*-бутанол (Хаф). Бергнер и Сперлих для разделения наиболее гидрофильных гликолей рекомендовали систему хлороформ — этанол в соотношении 8 : 2 (рис. 124), а для гликолей менее гидрофильных — эфир, насыщенный

водой (табл. 13). Наиболее полного разделения изомерных пропандиолов или бутандиолов достигают четырехкратным хроматографированием, применяя в качестве растворителя эфир, насыщенный водой. Преимущество указанных систем растворителей состоит в том, что при их применении содержащиеся в растворе обычные сахара остаются на линии старта.

### АЛИЦИКЛИЧЕСКИЕ МНОГОАТОМНЫЕ СПИРТЫ

Из веществ этой группы чаще всего подвергался хроматографированию инозит из-за его сходства с сахарами (Хаф и др.).

Результаты последних работ показывают, что методом хроматографии на бумаге можно разделить не только алициклические спирты, отличающиеся числом гидроксильных или эфирных групп, но и многие стереоизомеры и изомеры положения.

#### Проявление

Для проявления алициклических многоатомных спиртов чаще всего применяют аммиачный раствор азотнокислого серебра (*Д* 4 *г*), чувствительность которого обусловлена главным образом числом гидроксильных групп спирта. По данным Постернака и сотрудников чувствительность реактива для инозитов колеблется от 3 до 20  $\mu\text{г}$ , а для триолов, пинита и квебрахита — от 60 до 100  $\mu\text{г}$ .

#### Системы растворителей

Для разделения алициклических многоатомных спиртов применяют систему *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5. Эта система особенно пригодна для спиртов с различным числом кислородсодержащих функциональных групп; для разделения стереоизомеров Постернак и сотрудники рекомендовали в качестве растворителя фенол или коллидин с водой, а Баллоу и А. Андерсон — ацетон с 5% воды. Величины  $R_f$  в этих растворителях приведены в табл. 14.

#### Количественный анализ

Баллоу и А. Андерсон для количественного определения алициклических многоатомных спиртов рекомендуют элюирование их с бумаги с последующим окислением в элюате йодной кислотой (см. стр. 276).

### ФОСФОРНЫЕ ЭФИРЫ

Для проявления фосфорных эфиров наиболее пригодным является молибдатный реактив (*Д* 45). В качестве растворителя для продуктов частичного гидролиза фитина Г. Андерсон рекомендовал смесь метанол — 0,5 н. аммиак в соотношении 7 : 3. Автором установлено, что инозиты с меньшим числом фосфатных групп имеют более высокие величины  $R_f$ ; в приведенном растворителе величина  $R_f$  инозитгексафосфата равна 0,06, первого промежуточного продукта (очевидно, инозиттетрафосфат) — 0,17, второго продукта — 0,32, а ортофосфата — 0,48.

Таблица 14

ВЕЛИЧИНЫ  $R$ , НЕКОТОРЫХ АЛИЦИКЛИЧЕСКИХ  
МНОГОАТОМНЫХ СПИРТОВ  
(по данным Постернака и сотрудников)

Спирт	н-Бутанол 4	Фенол, насыщенный водой
	Уксусная кислота 1 Вода 5	
<i>мезо</i> -Инозит . . . . .	0,09	0,23
Сциллит . . . . .	0,09	0,18
<i>эпи</i> -Инозит . . . . .	0,11	0,38
(-)-Инозит . . . . .	0,12	0,20
Митилит . . . . .	0,11	—
Изомитилит . . . . .	0,14	0,31
Квебрахит . . . . .	0,18	0,43
Пинит . . . . .	—	0,39
(-)-Вябурнит . . . . .	0,17	0,40
(+)-Кверцит . . . . .	0,20	0,45
Циклогексантитролы . . . . .		
<i>dl</i> -1,2,3/4 . . . . .	0,37	0,66
<i>dl</i> -1,2,4/3 . . . . .	0,37	0,07
<i>dl</i> -1,3/2,4 . . . . .	0,36	—
<i>dl</i> -1,2/3,4 . . . . .	0,41	—
1,4/2,3 . . . . .	0,41	0,60
Кондурит . . . . .	0,37	0,54
Циклогексантринолы . . . . .		
<i>dl</i> -1,2/3 . . . . .	0,57	0,80
1,3/2 . . . . .	0,57	0,80
1,2,3- <i>цис</i> . . . . .	0,57	0,80

## ЛИТЕРАТУРА

- Anderson G., Nature, 175, 863 (1955).  
 Ballou C. E., Anderson A. B., J. Am. Chem. Soc., 75, 648 (1953).  
 Bergner K. G., Sperlich H., Z. Lebensm.—Unters.—Forsch., 97, 253 (1953).  
 Černý J., Chem. Listy, 49, 1899 (1955).  
 Hough L., Nature, 165, 400 (1950).  
 Kariyone T., Hashimoto Y., Kimura M., Nature, 168, 511 (1951).  
 Kaufmann H. P., Kohlmeyer H. G., Fette, Seifen, Anstr., 57, 231 (1955).  
 Meigh D. F., Nature, 169, 706 (1952).  
 Momose T., Yamada A., J. pharm. Soc. Japan, 71, 980 (1951); C. A., 46, 1921 (1952).  
 Posternak T., Raymond D., Haerdi W., Helv. chim. Acta, 38, 191 (1955).  
 Rice R. G., Keller G. J., Kirchner J. G., Anal. Chem., 23, 194 (1951).  
 Siegel A., Schlögl K., Mikrochem., 40, 383 (1953).  
 Thompson A. R., Austral. J. sci. Res., 4B, 283 (1951).  
 Večefaj M., Gasparič J., Spěvák A., Chem. Listy, 51, 1554 (1957).

# АЛЬДЕГИДЫ И КЕТОНЫ

---

**К. Мацен**

В этой главе приведены только алифатические альдегиды и кетоны. В других главах описаны сахара (стр. 254), ароматические альдегиды (стр. 330) и вещества терпенового характера (стр. 379). Поскольку алифатические альдегиды и кетоны представляют собой жидкости со сравнительно низкой температурой кипения, то хроматографированию подвергают их производные. Непосредственное разделение на бумаге возможно лишь для веществ с длинной углеводородной цепью (например, альдегиды, содержащие более 10 атомов углерода) (Шульте и Сторп).

## 2,4-ДИНИТРОФЕНИЛГИДРАЗОНЬ

### Обнаружение

2,4-Динитрофенилгидразоны (ниже ДНФГ, *II* 27) окрашены, и проявлять их на бумаге не требуется. В ультрафиолетовом свете ДНФГ подавляют флуоресценцию. Для увеличения чувствительности, а также для различения некоторых типов веществ хроматограмму опрыскивают 10%-ным раствором едкого натра (Коштирж и Славик), в результате чего изменяется цвет пятен ДНФГ с желтого на коричневый и фиолетовый. Шмитт и сотрудники предпочитают опрыскивать хроматограмму этилатом натрия (*D* 12). Этим методом можно обнаружить около 3 мкг ДНФГ; обычно же хроматографируют от 10 до 20 мкг.

### Системы растворителей

Для разделения ДНФГ альдегидов и кетонов, учитывая их незначительную гидрофильность, применяют метод обращенной фазы или пользуются бумагой, пропитанной полярным органическим растворителем. Системы первой группы были предложены Коштиржем и Славиком, применявшими ацетилированную бумагу, Кирхнером и Келлером, пропитывавшими бумагу силиконом. Метод Коштиржа и Славика в дальнейшем был разработан Нейманом и сотрудниками. Эти авторы для ускорения анализа и получения пятен круглой формы рекомендовали проводить разделение при температуре 40°. Более простым является метод Сикоры

и Прохазки. Согласно этому методу, разделение проводят 80%-ным этанолом на бумаге, пропитанной керосином (II 12). Аналогичных результатов достигли Зелигман и Эдмондс [1] при использовании бумаги, пропитанной 5%-ным раствором оливкового масла в четыреххлористом углероде. Для разделения низших альдегидов и кетонов пригодна система растворителей метилацетат — вода (10 : 7), а для высших альдегидов и кетонов — изопропанол — вода (3 : 1). Величины  $R_f$  производных альдегидов и кетонов приведены в табл. 15.

Таблица 15

ВЕЛИЧИНЫ  $R_f$  ПРОИЗВОДНЫХ АЛЬДЕГИДОВ И КЕТОНОВ

Соединение	2,4-Динитрофенилгидразоны			Гидразоны П Жирара
	диметил- формамид/ декалин	5,1%-ный рас- твор оливкового масла в $CCl_4$ / метилацетат 10 вода 7	5,1%-ный рас- твор оливкового масла в $CCl_4$ / изопропанол 2 вода 1	n-бутанол 27 этанол 3 вода 10
	Хорнер и Кирмсе	Зелигман и Эдмонс [1]		Зелигман и сотрудники [2]
Формальдегид . . . . .	0,18	0,65		0,00
Ацетальдегид . . . . .	0,28	0,59		0,19
Пропионовый альдегид . . . . .	0,46	0,49		0,29
n-Бутиральдегид . . . . .	0,60	0,35		0,38
изо-Бутиральдегид . . . . .	—	0,37		0,38
n-Гексана́л . . . . .	0,75	0,18		0,52
n-Гептана́л . . . . .	0,83			
n-Окта́нал . . . . .	0,86		0,69	
n-Дека́нал . . . . .	0,92		0,65	
n-Додека́нал . . . . .	0,94		0,39	
Ацетон . . . . .	0,44	0,60		0,19
Бутанол <sup>1</sup> . . . . .	0,63	0,45		0,29
3-Метилбутанон-2 . . . . .		0,40		
Пентанон-3 . . . . .	0,69	0,38		0,37
Гептанон-4 . . . . .		0,27		0,51
Нонанон-2 . . . . .		0,13		0,62
Ундеканон-2 . . . . .			0,47	
Тридеканон-2 . . . . .			0,33	
Гептадеканон-2 . . . . .			0,14	
Циклогексанон . . . . .	0,74			

Однако для разделения ДНФГ наиболее пригодны, очевидно, следующие два метода: метод Хорнера и Кирмсе, предусматривающий пропитку бумаги 50%-ным ацетоновым раствором диметилформамида и разделение циклогексаном (рис. 125); распределение веществ еще менее полярного характера (ароматические альдегиды или альдегиды, содержащие до 14 атомов углерода) авторы проводят декалином на бумаге, пропитанной 10%-ным ацетоновым раствором N-метилформанилида. По второму методу (Линн и сотрудники) разделение проводят гептаном, насыщенным фенилмоноэфиром этиленгликоля (фенилцеллозольвом), на бумаге, пропитанной 10%-ным ацетоновым раствором фенилмоноэфира этиленгликоля. Оба метода дают весьма близкие результаты. По данным Линна и сотрудников разделение ДНФГ является достаточно полным, так как при нанесении их даже в больших количествах (250  $\mu$ г) они не оставляют на бумаге грязных полос. Разделение этим методом изомерных производных невозможно.

В настоящее время менее применимы методы Мейгха или Гуелина, предусматривающие разделение при помощи безводной смеси метанол — гептан, где метанольный слой служит в качестве неподвижной фазы, а слой гептана в качестве подвижной.

## ДРУГИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

### *n*-НИТРОФЕНИЛГИДРАЗОНЫ

Для разделения альдегидов с числом атомов углерода от 8 до 14 Шульте и Сторп рекомендуют хроматографировать их в виде *n*-нитрофенилгидразонов, применяя в качестве растворителя смесь петролейный эфир — эфир в соотношении 95 : 5. Эти же производные, помимо ДНФГ, используются Шмиттом и сотрудниками для анализа низших альдегидов и кетонов. Для их разделения из испытанных автором 78 систем растворителей оказалась пригодной смесь дибутиловый эфир — диметилформамид — тетрагидрофуран в соотношении 85 : 15 : 4.

### ГИДРАЗОНЫ П ЖИРАРА

По методу Зелигмана и сотрудников низшие альдегиды и кетоны разделяют в виде гидразонов П Жирара (карбогидразидометил-пиридиний-хлорид), используя в качестве растворителя смесь *n*-бутанол — этанол — вода в соотношении 27 : 3 : 10. Для проявления хроматограммы приложен йодоплатинат калия (*D* 84). Величины *R<sub>f</sub>* для гидразонов Жирара приведены в табл. 15.

### ГИДРОКСАМОВЫЕ КИСЛОТЫ

Уно и Койама идентифицируют альдегиды с числом атомов углерода от 1 до 5 после превращения их в гидроксаматы действием бензолсульфогидроксамовой кислоты. Разделение последних проводят, используя в качестве растворителя смесь изоамиловый спирт — уксусная кислота — вода в соотношении 5 : 1 : 1. Этот метод неприменим для разделения высших альдегидов или их изомеров.

## ЛИТЕРАТУРА

- Horner L., Kirmse W., Ann., 597, 48 (1955).  
Huelin F. E., Austral. J. sci. Res., 5B, 328 (1952); C. A., 47, 172 (1953).  
Košíř J. V., Slavík K., Chem. Listy, 44, 17 (1950); Collection Czechoslov. chem. Commun., 15, 17 (1950).  
Lynn W. S., Jr., Steele L. A., Staple E., Anal. Chem., 28, 132 (1956).  
Meigh D. F., Nature, 170, 579 (1952).  
Нейман М. Б., Левковский В. Н., Луковников А. Ф., ДАН СССР, 81, 841 (1951).  
Seligman R. B., Edmonds M. D., Chemistry and Industry, 1955, 1406. [1]  
Seligman R. B., Edmonds M. D., O'Keeffe A. E., Lee L. A., Chemistry and Industry, 1954, 1195. [2]  
Schmitt W., Moriconi E., O'Connor W., Anal. Chem., 28, 249 (1956).  
Schulte K. E., Storp C. B., Fette, Seifen, Anstr., 57, 36 (1955).  
Sýkora V., Procházka Z., Chem. Listy, 47, 1674 (1953).  
Uno H., Koyama A., J. Ferment. Techn. (Japan), 29, 219 (1951); C. A., 47, 1008 (1953).

# АЛИФАТИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

---

К. Мацек, Ч. Михалец

В этой главе рассматриваются кислоты, не содержащие в своей молекуле азота или серы. Здесь же приведены эфиры жирных кислот с алифатическими спиртами и фосфолипиды. Аминокислотам посвящена отдельная глава; ароматические кислоты приведены в главе о фенолах.

Поскольку алифатические кислоты удобны для изучения соотношения между их строением и поведением при хроматографировании, то этому вопросу уделено особое внимание.

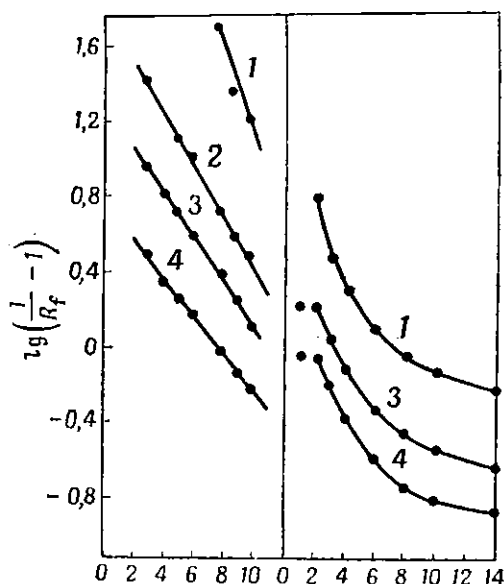
Большинство из этих исследований основано на предположении Мартина об аддитивном влиянии отдельных функциональных групп на коэффициент распределения и, стало быть, на величину  $R_f$  (см. стр. 76). Почти одновременно Халм и Суэйн опубликовали работы, в которых на основании сравнения величин  $\Delta R_M$  нескольких кислот охарактеризовали впервые обнаруженную алифатическую кислоту в яблочном соке; Опиенска-Блаут и сотрудники вычислили величины  $R_f$  для нескольких функциональных групп и, наконец, Лонг и сотрудники обнаружили для монокарбоновых кислот линейную зависимость между значением  $R_M$  и числом атомов углерода. Такую же линейную зависимость несколько позже выявил Вас между величиной  $R_M$  и числом гидроксильных групп. Все эти данные обобщены в работе Райхля [1] (см. стр. 80).

Ишервуд и Хейнс [2] на основании большого экспериментального материала доказали, что у монокарбоновых кислот линейная зависимость между величиной  $R_M$  и числом атомов углерода наблюдается лишь для небольшого интервала (рис. 126). Кальбе на основе исследований многих систем<sup>1</sup> подтвердил этот вывод и на примере дикарбоновых кислот. Однако определенные химические группы дают характерные кривые зависимости величин  $R_s$  (отнесено к себадиновой кислоте) от числа атомов углерода, что можно было бы использовать для идентификации этих кислот.

Уместно отметить влияние некоторых групп на величины  $R_f$ . Увеличение числа групп  $\text{CH}_2$  повышает величины  $R_f$ . Последние также возрастают при введении в молекулу кислоты галоидов. Наличие одного атома галоида весьма незначительно сказывается на увеличении величины  $R_f$ , но с увеличением числа атомов галоидов величина  $R_f$  заметно повышается.

Бром и фтор увеличивают липофильность больше, чем хлор. Все гидрофильные группы снижают величины  $R_f$  — при этом первичная гидроксильная группа в большей мере, чем вторичная или третичная; карбоксильная группа в кислых системах ведет себя подобно первичной гидроксильной группе, а в щелочных системах снижает величину  $R_f$  почти в два раза больше. Двойная связь немного снижает величину  $R_f$ , что, по мнению Шанды и сотрудников, объясняется большей адсорбцией кислоты бумагой. Эти же авторы приводят данные о влиянии разветвления углеводородной цепи дикарбоновых кислот на величину  $R_f$ ; разветвление в  $\alpha$ -положении по отношению к карбоксильной группе увеличивает значение  $R_f$  (что, очевидно, вызвано пространственными явлениями), а разветвление в других положениях — снижает.

Для проявления на бумаге органических кислот в большинстве случаев используют их карбоксильную группу, которая при



Р и с. 126. Зависимость между величиной  $R_M$  и числом атомов углерода дикарбоновых и монокрбоновых кислот (Ишервуд и Хейнс).

Система: *n*-пропанол — аммиак в соотношении 9 : 1 (1), 8 : 2 (2), 7 : 3 (3), 6 : 4 (4). Слева — дикарбоновые кислоты (по оси абсцисс — число атомов углерода). Справа — монокрбоновые кислоты (по оси абсцисс — число атомов углерода).

отсутствии в молекуле кислоты щелочных групп реагирует с кислотнo-основными индикаторами, изменяя их окраску.

Недостатками приведенного метода проявления являются сравнительно небольшая чувствительность реакции, влияние составных частей растворителя, нестойкость окраски. Поэтому там, где это только возможно, используют для проявления кислот другие функциональные группы (кетогруппу, фенольную гидроксильную группу и др.).

При разделении кислот на бумаге образуются «хвосты» и грязные полосы, вызванные летучестью низших жирных кислот, их димеризацией, адсорбцией на бумаге и возможной диссоциацией в нейтральных и кислых системах растворителей. Диссоциацию и адсорбцию кислот можно подавить применением для разделения сильноокислых систем растворителей, в которых кислоты передвигаются в недиссоциированной форме. Наоборот, диссоциацию низших жирных кислот повышают разделением в щелочных системах, так как при этом летучие кислоты переводятся в нелетучие соли. В некоторых случаях кислоты, в частности кетокислоты, более целесообразно хроматографировать в виде их производных. У высших жирных кислот диссоциация карбоксильной группы проявляется не столь резко; до недавнего времени затруднения при их разделении были вызваны лишь сильно липофильным характером этих кислот.

## Низшие жирные кислоты

В этом разделе рассматриваются незамещенные кислоты, алифатические галогенкислоты и алкоксикислоты жирного ряда, а также фосфорные эфиры жирных кислот.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБЫ И БУМАГИ

Для получения низших жирных кислот из природного материала последний тонко измельчают, подкисляют и кислоты отгоняют с водяным паром.

Отгон после перевода кислот в натриевые соли (для отделения от других летучих веществ) упаривают досуха. Полученные соли непосредственно используют для хроматографирования (Томпсон) или после подкисления раствора солей кислым сернокислым натрием кислоты экстрагируют бутанолом (Линдквист и Сторгардз). В экстракте путем нейтрализации (рН 7) кислоты переводят в аммонийные или этиламиновые соли. Однако по данным Швеппе при отгонке кислот могут иметь место потери, поэтому предпочитают экстрагировать их 2 н. раствором соды с последующей переработкой экстракта вышеприведенным способом. Для получения свободных жирных кислот из эфиров Томпсон рекомендует проводить гидролиз их 0,2 н. раствором едкого натра.

Жирные кислоты могут образовывать комплексные соединения с катионами, содержащимися в бумаге, что является причиной образования на хроматограмме грязных полос. В связи с этим рекомендуется, в частности для количественного анализа, промыть бумагу 2 н. раствором уксусной кислоты, водой, аммиаком, а затем еще раз водой (Томпсон). Такая предварительная обработка бумаги при качественном хроматографическом анализе излишня.

### ПРОЯВЛЕНИЕ

В большинстве случаев для проявления жирных кислот хроматограмму опрыскивают кислотнo-основными индикаторами. Для этой цели чаще всего применяют следующие индикаторы: бромфеноловый синий, бромкрезоловый пурпурный, бромтимоловый синий, универсальный индикатор ВДН или смесь индикаторов (Д 13, Дункан и Портеус). Приготовление всех указанных реактивов проводится по описанию, приведенному для бромфенолового синего (Д 6). При хроматографировании кислот в виде их натриевых солей наблюдается раздельное передвижение на бумаге их катионов и анионов; в этом случае для проявления кислот хроматограмму опрыскивают слабощелочным раствором бромфенолового синего, в результате чего образуются желтые пятна на синем фоне (Браун и Хэлл [2]).

Наоборот, при проявлении аммонийных или этиламиновых солей хроматограмму опрыскивают слабокислым раствором бромфенолового синего, проявляющего кислоты в виде синих пятен на желтом фоне. При этом большое значение имеет температура высушивания хроматограммы. По данным Гискокса и Бериджа в результате высушивания хроматограм-

мы при высоких температурах наблюдается разложение соли и улетучивание основания, что делает возможным проявление оставшейся кислоты соответствующим индикатором. В некоторых случаях (по Рейду и Леде-реру) целесообразно к проявителю добавить формальдегид, освобождающий из аммонийных солей свободные кислоты (аналогично Д 13). Чувствительность реакций проявления при помощи индикаторов сравнительно низка и колеблется в пределах от 10 до 20  $\mu\text{г}$ . На бумагу следует наносить от 50 до 100  $\mu\text{г}$  отдельных кислот.

Жирные кислоты с числом атомов углерода от 4 можно, по Голасеку и Винсауэру, окрасить родамином В (Д 16). Для определения муравьиной кислоты в присутствии уксусной (плохо разделяются при хроматографировании) в качестве проявителя применяют азотнокислое серебро (Д 4), восстанавливающееся муравьиной кислотой (Браун и Хэлл) [2]. В этом случае реакцию с азотнокислым серебром можно проводить и на хроматограмме, проявленной кислотно-основными индикаторами. Реакция проявления аммонийных солей жирных кислот нингидрином мало чувствительна (Лонг и сотрудники).

По Линдквисту и Сторгардзу с целью сохранения хроматограмм необходимо проявленную хроматограмму опрыскать 5%-ным раствором парафина в бензоле и после испарения бензола нагреть хроматограмму до покрытия всей поверхности ее парафином. Этим способом можно сохранить хроматограмму с интенсивно окрашенными пятнами; слабо окрашенные пятна и в этом случае с течением времени исчезают.

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Разделение низших жирных кислот с числом атомов углерода от 1 до 7, за исключением первых двух членов этого ряда, не представляет никаких трудностей.

Для разделения кислот применяют исключительно трехкомпонентные системы, содержащие низшие спирты, воду, органические или неорганические основания. Спирты по мере увеличения числа атомов углерода снижают величины  $R_f$ , а вода, наоборот, повышает. Кислоты, связанные с органическим основанием, передвигаются на хроматограмме быстрее, чем с неорганическим.

Лучшими системами для разделения кислот оказались *n*-бутанол, насыщенный 1,5 н. аммиаком (Браун и Хэлл [2]), и *n*-бутанол с этиламином (Гискок и Беридж). Последнюю систему лучше всего применять по способу Линдквиста и Сторгардза. Эти авторы разделяют кислоты *n*-бутанолом, насыщенным водой, в камере, насыщенной 0,1 н. раствором этиламина.

С успехом можно применить и круговое разделение (Перила [1]). Разделение морфолиновых солей по Гийому и Остё не дает, по-видимому, больших преимуществ.

Кислоты с числом атомов углерода от 6 до 10 в тех случаях, когда их хроматографируют не в виде гидроксаматов, наиболее выгодно разделять по методу Голасека и Винсауэра. Эти авторы для разделения кислот используют систему четыреххлористый углерод — метанол — аммиак в соотношении 81 : 18 : 1 на бумаге, пропитанной 0,5%-ным раствором алюминийаммонийсульфата.

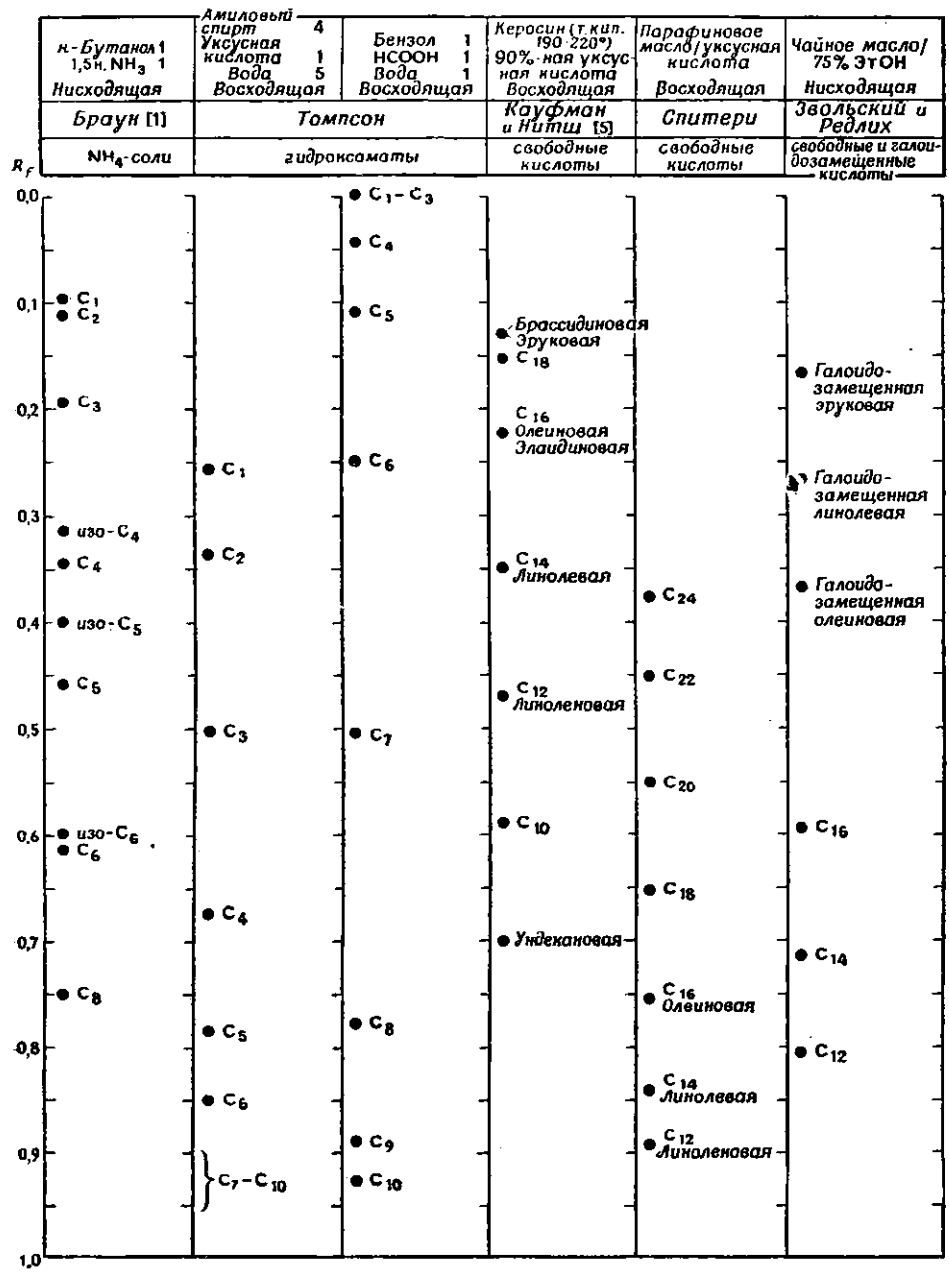
Алкокси-кислоты жирного ряда разделяют по Наиру в системе *n*-бутанол — 1,5 н. раствор аммиака. Для галоидозамещенных кислот наиболее

приемлемой системой является смесь этанол — аммиак — вода в соотношении 80 : 4 : 16 (Лонг и сотрудники).

Величины  $R_f$  для жирных кислот и их производных в некоторых из перечисленных систем приведены в табл. 16.

Таблица 16

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АЛИФАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ



## ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КИСЛОТ

### Гидроксамовые кислоты

Гидроксамовые кислоты образуются из эфиров, амидов, ангидридов или хлорангидридов кислот. Они нелетучи и обладают свойствами, удобными для хроматографирования. Свободные кислоты необходимо сначала перевести в эфиры (II 22). Проявление гидроксаматов основано на образовании с ионами  $\text{Fe}^{3+}$  комплексного соединения интенсивно красного цвета (Д 14). Поскольку гидроксаматы термолабильны, хроматограмму перед проявлением высушивают при комнатной температуре.

Метод разделения гидроксамовых кислот предложили Финк и Финк. Эти авторы для разделения кислот с числом атомов углерода от 1 до 6 применяли системы *n*-гексанол — вода или *n*-амиловый спирт — вода; по Томпсон для разделения гидроксаматов *n*-валериановой — каприновой кислот лучше пользоваться системой растворителей бензол — муравьиная кислота — вода в соотношении 1 : 1 : 1 (рис. 127). Величины  $R_f$  для гидроксаматов кислот приведены в табл. 16.

Метод хроматографирования гидроксаматов пригоден и для разделения ацилфосфорных эфиров (Стадтман и Баркер).

### Гидразиды кислот

Разделение гидразидов (II 23) проводят по методу, разработанному Сатакэ и Сэки. Этот метод аналогичен способу, применяемому при разделении гидроксаматов. Для хроматографирования применяют систему растворителей изоамиловый спирт — коллидин — вода в соотношении 10 : 2 : 1, а для проявления — азотнокислое серебро (Д 4).

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

При полуколичественном анализе кислот методом хроматографии на бумаге чаще всего пользуются зависимостью величины площади пятен от логарифма концентрации кислот (см. стр. 182). Для этой же цели Ишервуд и Хейнс применяют метод, основанный на изменении окраски предварительно нейтрализованного кислого индикатора анализируемой кислотой. В качестве индикатора авторы применяют тимоловый синий. При нанесении на бумагу 50 мкг анализируемого вещества точность метода составляет  $\pm 10\%$ . Гидроксамовые кислоты определяют по Стадтману и Баркеру фотометрией элюированных из бумаги комплексных соединений с  $\text{Fe}^{+3}$ .

## Высшие жирные кислоты

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБЫ

В большинстве случаев для приготовления пробы липоидную фракцию анализируемого материала подвергают щелочному гидролизу, затем гидролизат подкисляют и выделенные при этом высшие жирные кислоты экстрагируют органическим растворителем.

### ПРОЯВЛЕНИЕ

Для проявления высших жирных кислот используют образование на хроматограмме их солей с неорганическими катионами, главным образом с Ag, Pb, Cu. Особенно рекомендуется метод Кауфмана и Нитша [5]; эти авторы переводят кислоты на хроматограмме в медные мыла с последующим окрашиванием их ферроцианидом калия (Д 15). Сравнительно плохо воспроизводимыми и неспецифичными являются цветные реакции кислот с различными индикаторами (Д 6), а также с родаминами В и G (Д 16). Для отличия галогидных производных ненасыщенных кислот от насыщенных их проявляют азотнокислым серебром и эриохромцианином (Д 17), которые с обоими типами кислот дают различное окрашивание (Звольский и Редлих). Этанольный раствор дифенилкарбазона (Д 18) с продуктами присоединения метиловых эфиров ненасыщенных кислот и уксуснокислоты ртути(II) дает сине-красное окрашивание (Инойе и сотрудники) [4]. О проявлении гидроксамовых кислот см. Д 14.

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Гидрофобный характер высших жирных кислот исключает применение для их хроматографирования систем, содержащих воду в неподвижной фазе. Несмотря на то, что Кауфман и сотрудники [1—4] осуществили частичное разделение кислот на непропитанной бумаге, все же метод их разделения на пропитанной бумаге дает несравнимо лучшие результаты.

#### Прямое разделение кислот

Болдинг, а позднее Пустовалов разделяли этиловые эфиры жирных кислот с числом атомов углерода от 12 до 18 на бумаге, пропитанной каучуковым латексом. Этот метод не нашел широкого применения.

Более простым и удобным является метод Нунца и Спитери, усовершенствованный Кобрлом и Заградником. Эти авторы пропитывают бумагу раствором различных растительных масел в летучем растворителе; чаще всего для этой цели применяют оливковое масло. Для разделения высших жирных кислот в качестве подвижной фазы наиболее рационально применять водный раствор метанола или этанола (II 13).

Однако наилучшие результаты были достигнуты при хроматографировании кислот на бумаге, пропитанной углеводородами, чаще всего парафиновым маслом или фракцией керосина с температурой кипения 190—220°. Для разделения применяют водные растворы спиртов или уксусной кислоты. Четкое разделение и наилучшая форма пятен, как правило, достигаются при восходящем методе разделения с помощью ледяной или 90%-ной уксусной кислоты. Однако с увеличением содержания воды в подвижной фазе снижаются величины  $R_f$  кислот. Для хроматографирования наиболее пригодна бумага ватман 3 или Шлейхер — Шюль 2043b. Эти сорта бумаги более плотны и не рвутся при промывании хроматограмм. Бумагу, пропитанную парафиновым маслом, можно сохранять в течение нескольких недель без изменения ее разделяющей способности. Из различных модификаций пропитки бумаги наиболее пригодными оказались методы Кауфмана и Нитша [5] (II 14), а также Спитери (II 13) (рис. 128).

Из других менее часто применяемых способов следует отметить способ прямого хроматографирования кислот на бумаге, пропитанной силиконом;

получаемые при этом результаты не отличаются от результатов ранее описанных методов (Мангольд и сотрудники, Савари). Разделение средних и высших жирных кислот методом адсорбционной хроматографии на бумаге, пропитанной  $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2$ , приведено на стр. 233. Этот принцип, как и разделение на бумаге, пропитанной кремневой кислотой (Инойе и Нода [1]), нельзя рекомендовать из-за более сложного приготовления хорошо активированной бумаги, необходимости соблюдения безупречного насыщения атмосферы камеры и состава подвижной фазы. Незначительное изменение одного из приведенных факторов приводит к плохой воспроизводимости результатов.

### Разделение производных кислот

В природном материале высшие жирные кислоты часто содержатся в виде эфиров или легко могут быть переведены в них, поэтому в некоторых случаях разделение их проводят в виде гидроксамовых производных (см. стр. 235). Однако поскольку указанные производные на непропитанной бумаге передвигаются близко к фронту подвижного растворителя, то Михеель и Швешпе разделяют их на ацетилированной бумаге в системе этилацетат — ацетон — вода в соотношении 1 : 2 : 2,75. Эта методика не вполне пригодна ввиду сравнительно близких величин  $R_f$ . Тиетсова и Попьяк указали на возможность разделения гидроксаматов миристиновой ( $R_f$  0,86), пальмитиновой ( $R_f$  0,64) и стеариновой кислот ( $R_f$  0,1) на бумаге, пропитанной керосином, в системе этанол — 1 *M* раствор уксусной кислоты в соотношении 57,5 : 42,5.

При восходящем методе хроматографирования по этому способу хорошее разделение зависит от концентраций исследуемых кислот. Приведенная концентрация растворителей является критической. При более высокой концентрации спирта пальмитиновая кислота передвигается с фронтом растворителя, а при меньшей концентрации остается на линии старта. Оба приведенных метода неудовлетворительны, но принцип их в основном приемлем и метод мог бы иметь значение для количественного анализа кислот.

Наиболее существенным недостатком всех до сих пор приведенных методов идентификации кислот является невозможность отделения насыщенных кислот от ненасыщенных. Шленк и сотрудники (J. Am. Oil. Chem. Soc., 34, 377, 1957) достигли хорошего отделения ненасыщенных кислот от насыщенных путем разделения их при температуре  $-10^\circ$  на бумаге, пропитанной силиконом, используя в качестве растворителя смесь 85%-ной  $\text{HCOOH}$ , 85%-ной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и воды в соотношении 50 : 50 : 5. При этом насыщенные кислоты остаются на линии старта, а ненасыщенные разделяются. Согласно исследованиям (Михалец) все насыщенные и ненасыщенные кислоты можно разделить при помощи двумерной хроматографии на бумаге, пропитанной парафином. Разделение проводят 93%-ным раствором уксусной кислоты при  $20^\circ$  (растворитель I) и при  $-10^\circ$  системой 85%-ная  $\text{HCOOH}$  — 85%-ная  $\text{CH}_3\text{COOH}$  — вода в соотношении 50 : 50 : 5 (растворитель II). Несмотря на возможность идентификации ненасыщенных кислот некоторыми реактивами (раствором йода в метаноле или марганцевокислым калием (Д 3), определение их хроматографическим методом в смеси с насыщенными кислотами не представляется возможным. Звольский и Редлих, пытаясь разрешить эту проблему, переводят реактивом Гануша (раствор монодобрмида в ледяной уксусной кислоте) ненасыщенные кислоты в соответствующие галоид-

ные производные с последующим хроматографированием их водным раствором этанола на бумаге, пропитанной растительным маслом (II 24). По различным величинам  $R_f$  насыщенных кислот и галогидозамещенных ненасыщенных кислот, а также по окраске их после проявления можно отличить оба типа кислот. Другой метод описан Инойе и сотрудниками [4]. Эти авторы приготовили и разделили большое число аддитивных соединений метиловых эфиров ненасыщенных кислот с уксуснокислой ртутью (II) (II 25).

### Разделение продуктов расщепления ненасыщенных кислот

Ненасыщенные кислоты подвергают озонолизу и окислению щелочным раствором окиси серебра. Образующиеся при этом моно- и дикарбоновые кислоты переводят в гидроксамовые производные с последующим разделением их при помощи одномерной или двумерной хроматографии, применяя в качестве растворителя насыщенные водой *n*-бутанол или этилацетат (Инойе и сотрудники [1—3]). Ненасыщенные кислоты можно также перевести путем окисления в щелочной среде марганцевокислым калием в насыщенные с последующим их хроматографированием (Михалец, неопубликованные данные). Анализ кислот по способу Инойе сложен и длителен; окислением ненасыщенных кислот марганцевокислым калием можно сравнительно легко идентифицировать насыщенные и ненасыщенные кислоты в анализируемой пробе.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Вагнер и сотрудники проводят количественное определение кислот денситометрическим измерением на бумаге интенсивности окраски пятен, образовавшихся в результате проявления медных мыл ферроцианидом калия. Перила [2] при проявлении хроматограммы солями серебра определяет кислоты по количеству связанного пятном серебра; для этого пятно вырезают из хроматограммы, сжигают и количество серебра определяют колориметрически с применением дитизона.

## Глицериды

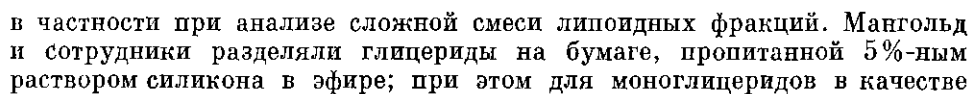
Затруднения при проявлении глицеридов заставили Мангольда и сотрудников разработать системы растворителей и реакции для проявления, которые позволили бы отличить в смеси моно-, ди- и триглицериды, а также отделить их от высших жирных кислот и спиртов.

Для проявления ненасыщенных глицеридов достаточно подвергнуть хроматограмму действию паров йода. Насыщенные и ненасыщенные моноглицериды проявляют водно-спиртовым раствором  $\alpha$ -декстрина (Д 19); этот же реактив применяют и для проявления ди- и триглицеридов после предварительного ферментативного гидролиза панкреатином (Д 20). Для проявления моноглицеридов можно также пользоваться тетраацетатом свинца (Д 21).

Аналогично разделению высших жирных кислот Кауфман для разделения глицеридов также применил непропитанную бумагу, а в качестве

**Таблица 17**

### ЗНАЧЕНИЯ $R_f$ ГЛИЦЕРИДОВ И ФОСФОЛИПИДОВ



подвижной фазы оказался пригодным растворитель тетрагидрофуран — вода в соотношении 3 : 2, а для остальных глицеридов хлороформ — метанол в соотношении 1 : 3. Для достижения удовлетворительного разделения необходимо пользоваться свежеприготовленными растворителями; качество пропитанной бумаги не изменяется в течение 6 недель. Из данных, приведенных в табл. 17, следует, что с уменьшением длины цепи глицеридов или увеличением степени ненасыщенности их повышаются величины  $R_f$ .

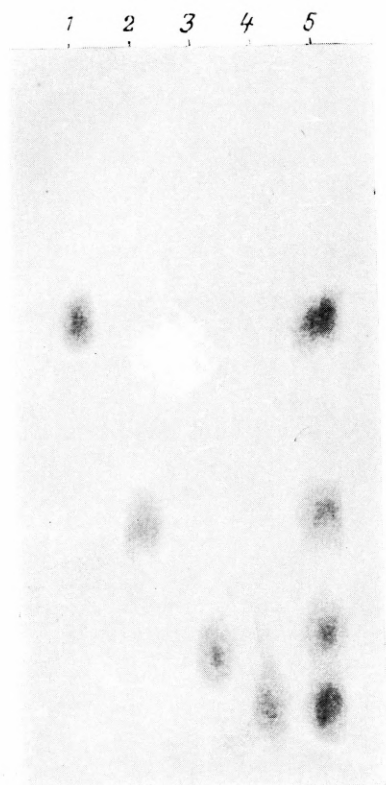
## Фосфолипиды

### ПРОЯВЛЕНИЕ

Идентификация различных фракций фосфолипидов не составляет особых трудностей. Лецитины чаще всего проявляют фосфорномолибденовой кислотой и хлористым оловом (Д 22а), а фосфолипиды со свободной аминогруппой (кефалины) — нингидрином (Д 112). Для идентификации ацетальфосфолипидов (плазмалогенов), обычно передвигающихся с лецитинами, наиболее рационально по Амелунгу и Бему пользоваться реакцией фуксина с альдегидом, освобождаемым при гидролизе ацетальфосфолипидов хлорной ртутью(II) (Д 23). Эта реакция весьма чувствительна. Ненасыщенные фосфолипиды идентифицируют, обрабатывая хроматограмму парами йода или пропуская ее через 1%-ный раствор марганцевокислого калия с последующей промывкой в проточной воде. В обоих случаях получают пятна коричневого цвета на бесцветном фоне. Само собою разумеется, что все фосфолипиды дают реакцию на фосфор (Д 45).

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Простые смеси фосфолипидов (очищенного лецитина и кефалинов) хроматографируют по Амелунгу и Бему одномерным восходящим способом следующим образом: сначала разделение смеси проводят в системе ацетон — метанол в соотношении 1 : 1, а затем в том же направлении, но на 8—10 см ниже фронта первого растворителя, в феноле, насыщенном водой (рис. 129). При таком методе разделения на непропитанной бумаге образуются пятна продолговатой формы. По Маринетти и Стотцу [1] причина этого заключается в сильной связи фосфолипидов с бумагой, обусловленной в значительной степени положительным зарядом атома азота. Заряд четвертичного атома азота лецитинов нелегко устранить без энергичного вмешательства. Наоборот, положительный заряд фосфолипидов со свободной аминогруппой можно легко маскировать ацилированием в мягких условиях. N-Ацетилфосфолипиды (кефалины), полученные путем ацилирования ацетангидридом в пиридине, имеют более высокие величины  $R_f$ , чем исходные вещества. Названные соединения можно отделить от неацетилируемых лецитинов и сфингомиэлина на непропитанной бумаге смесью лутидин — метанол в соотношении 3 : 2 или на бумаге, пропитанной кремневой кислотой, в следующих растворителях: диизобутилкетон — уксусная кислота — вода в соотношении 40 : 30 : 7, хлороформ — метанол в соотношении 3 : 1 + 2% воды. По данным Маринетти и Стотца [2] в этих случаях можно применять и двумерное хроматографирование. Ли



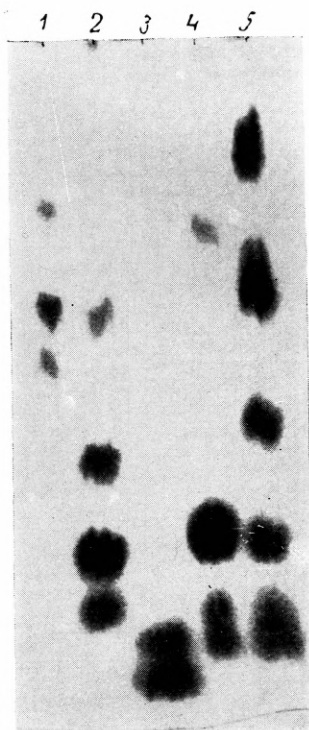
Р и с. 123. Разделение 3,5-динитробензоатов низших алифатических спиртов (Вечера и сотрудники).

Система: диметилформамид—циклогексан. 1 — метанол; 2 — этанол; 3 — *n*-пропанол; 4 — *n*-бутанол; 5 — смесь.



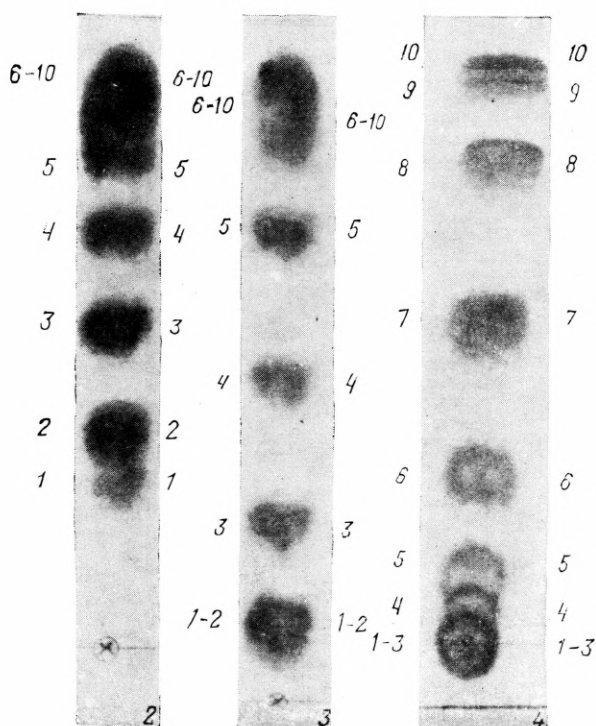
Р и с. 124. Разделение многоатомных спиртов по Бергнеру и Сперлиху (Гаспарич).

Система: хлороформ — этанол в соотношении 8 : 2. Проявитель: азотнокислое серебро (Д 1). 1 — 1,2-пропиленгликоль; 2 — этиленгликоль; 3 — глицерин+этиленгликоль+1,2-пропиленгликоль; 4 — глицерин.



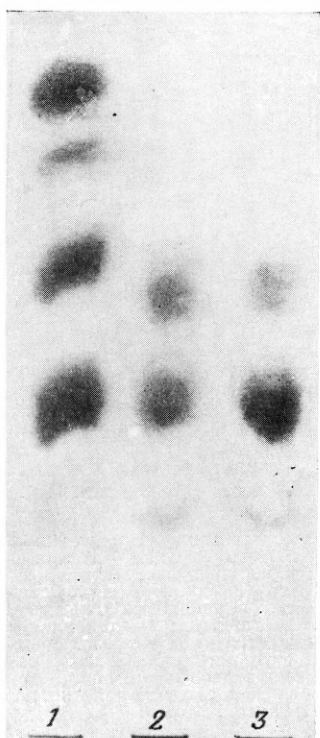
Р и с. 125. Разделение 2,4-динитрофенилгидразонов алифатических альдегидов и кетонов (Гаспарич и Вечера).

Система: диметилформамид — циклогексан. Проявитель — 1%-ный этанольный раствор КОН. В порядке (от линии старта к фронту): 1 — 2,4-динитрофенилгидразин, формальдегид, ацетальдегид, акролеин; 2 — 2,4-динитрофенилгидразин, формальдегид, ацетальдегид, пропионовый альдегид, масляный альдегид, валериановый альдегид; 3 — гексилальдегид, додецилальдегид; 4 — диацетил (моногидразон), циклопентанон, циклогексанон, смесь метилциклогексанонов; 5 — *trans*-производные фурфурола, двойное пятно ацетальдегида и *cis*-производного фурфурола, ацетон, метилэтилкетон, диэтилкетон, метилбутилкетон.



Р и с. 127. Хроматограммы гидроксамовых кислот, полученных из перазветвленных жирных кислот с числом атомов углерода от 1 до 10 (Томпсон).

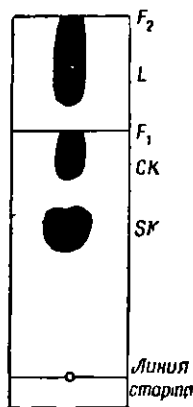
Система: 2 — амилловый спирт — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5; 3 — октанол — муравьиная кислота — вода в соотношении 3 : 1 : 3; 4 — бензол — муравьиная кислота — вода в соотношении 1 : 1 : 1. Проявитель — хлорное железо (Д 53).



Р и с. 128. Хроматограммы высших жирных кислот по Снитери (Михалец).

Бумага пропитана 10%-ным раствором парафинового масла в эфире; подвижный растворитель — 90%-ная уксусная кислота. Проявители: уксуснокислая медь и железистосинеродистый калий (Д 15). 1 — (от линии старта к фронту): арахидовая, стеариновая, пальмитиновая, миристиновая, лауриновая, каприновая кислоты; 2, 3 — высшие жирные кислоты сыворотки крови (стеариновая, пальмитиновая + олеиновая, линолевая кислоты).

и сотрудники проводят хроматографирование на бумаге, пропитанной кремневой кислотой, применяя в качестве подвижной фазы 20%-ный раствор метанола в хлороформе. При использовании бумаги, пропитанной кремневой кислотой, необходимо особое внимание уделить подготовке бумаги и составу систем растворителей. Величины  $R_f$  не являются точными показателями, поэтому вещества необходимо идентифицировать путем сравнения с метчиками, а также на основании качественных цветных реакций. Восходящий способ хроматографирования оказался лучше нисходящего. Величины  $R_f$  в некоторых ранее названных растворителях приведены в табл. 17.



Р и с. 129. Разделение фосфолипидов (по Амелунгу и Бему).  $F_1$  — фронт системы фенол — вода;  $F_2$  — фронт системы ацетон — метанол в соотношении 4 : 1; SK — серинкефалин; SK — коламинкефалин; L — лецитин.

Для удовлетворительного разделения фосфолипидов на непропитанной бумаге последнюю перед применением необходимо тщательно промыть уксусной кислотой, водой и метанолом, а хроматографирование во избежание окисления проводить в атмосфере инертного газа.

### Разделение продуктов расщепления

Хроматографирование продуктов частичного или полного гидролиза фосфолипидов несложно. Даусон для этой цели применяет двумерное хроматографирование. Наилучшие результаты разделения продуктов гидролиза лецитина достигнуты Олли при применении системы *трет*-бутанол — пикриновая кислота — вода в соотношении 80 : 4 : 20. См. также главу об аминах (стр. 385).

## Оксикислоты, дикарбоновые и трикарбоновые кислоты

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБЫ

Вышеназванные кислоты из растительного материала можно экстрагировать водой при повышенной температуре (Брайант и Оверелл). Свендсен из того же материала выделяет кислоты в виде свинцовых солей с последующим разложением их сероводородом перед хроматографированием. Выделение кислот из мочи производят по Остё и Латуразу следующим образом: мочу выдерживают при температуре  $+4^\circ$  до тех пор, пока большинство кислот из нее не выделится в осадок; затем для освобождения от сопутствующих веществ кислоты адсорбируют на основном анионите марки амберлит ИР-4Б или на сильноосновном анионите дауэкс 2 с последующим вытеснением их из колонки с анионитом 3 или 6 н. раствором муравьиной кислоты

(Нордман и сотрудники [1]). При наличии в моче сахаров следует иметь в виду возможность их разложения с образованием кислоты (см. стр. 259). Полученные элюаты можно прямо наносить на бумагу; наличие в них муравьиной кислоты не мешает проявлению, так как при сушке хроматограммы она улетучивается.

Выделение кислот путем электролитического обессоливания, экстракции эфиром или очистки катионитом оказалось непригодным из-за потерь в результате адсорбции (Нордман и сотрудники) [1].

Из неорганических кислот серная и соляная в большинстве систем растворителей остаются на линии старта и не влияют на процесс разделения; весьма отрицательное влияние на разделение в некоторых системах растворителей оказывает азотная и фосфорная кислоты (Денисон и Фарес). При хроматографировании молочной кислоты в определенных условиях на хроматограмме получают несколько пятен (Лоб и Лихтенбергер). По данным Буха и сотрудников это явление, вызванное этерификацией кислоты в водном растворе перед нанесением на бумагу, зависит от ее концентрации. Оптимальной концентрацией молочной кислоты в анализируемом растворе, обеспечивающей получение на хроматограмме одного пятна, следует считать 10%.

#### БУМАГА

По Кальбе применение непромытой бумаги для хроматографирования кислот в щелочных системах растворителей недопустимо, так как в этом случае чувствительность реакции проявления понижается. Исходя из этого, бумагу промывают одним из методов, описанных на стр. 105. На приготовленной таким способом бумаге скорость движения растворителя увеличивается в 1,5—2 раза. Кальбе рекомендует при хроматографировании в быстро движущихся растворителях применять плотную («медленную») бумагу и, наоборот, при применении медленно движущихся растворителей — более рыхлую («быструю») бумагу (см. стр. 104).

#### ПРОЯВЛЕНИЕ

##### Кислотно-основные индикаторы

Для проявления чаще всего применяют ранее приведенные (стр. 232) кислотно-основные индикаторы. Кроме бромфенолового синего (Д 6) и аналогичных индикаторов, могут быть также применены меркурохром (Айран и Барнабас), дихлорфенолиндофенол (Барнабас и Иоси), тимоловый синий (Ишервуд и Хейнс [2]), смесь фенолфталеина, метилового красного, диметиламиноазобензола, бромтимолового синего и тимолового синего (Нордман и сотрудники [1]) или универсальный индикатор ВДН. Шефтель и сотрудники [4] для проявления дикарбоновых кислот рекомендуют после обработки хроматограммы индикатором провести дополнительное опрыскивание ее 3%-ным раствором уксуснокислого свинца.

Для проявления кислот Зигель и Шлегль из флуоресцирующих индикаторов применили умбеллиферон или 4-метилумбеллиферон. Эти индикаторы флуоресцируют только при нейтральной или щелочной реакции; кислоты подавляют флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. По данным авторов чувствительность этих реакций около 20 мкг.

Успешное проявление хроматограммы приведенными реактивами возможно при условии удаления из нее кислых или щелочных компонентов

растворителя, чаще всего муравьиной или уксусной кислоты. Последние удаляются при высушивании хроматограммы в течение от 15 до 48 час при обычной температуре. Высушивание при более высоких температурах (с целью уменьшения времени высушивания) не дало положительных результатов. Муравьиную и уксусную кислоты можно удалить струей пара (Старк и сотрудники) или высушиванием хроматограммы инфракрасными лучами (Денисон и Фарес). Успешное проявление в значительной степени зависит от pH применяемого раствора индикатора. При разделении кислот в кислых системах растворителей pH индикатора доводят буфером до 5,5—7,5; при применении аммиачных систем раствор индикатора подкисляют лимонной кислотой (Кеннеди и Баркер). По данным Шефтель и сотрудников [2] на чувствительность реакции проявления влияет также содержание воды в подвижной фазе: чем меньше воды в ней, тем чувствительнее реакция проявления.

### Другие общие реактивы

Из других реактивов для проявления сравнительно часто применяют азотнокислое серебро. Образующаяся при этом на хроматограмме серебряная соль маскирует ион серебра на поверхности пятна и при повышенной температуре не происходит восстановления, в результате чего образуются белые пятна на коричневом фоне. Для ускорения потемнения пятен или, наоборот, сохранения белых пятен к раствору азотнокислого серебра добавляют аммиак, едкий натр, глюкозу (Гор) или фенол (Леффлер и Райхль). Этот метод проявления отличается большой чувствительностью (Д 24); им можно открыть 1—2 мкг лимонной кислоты. Пригодным и весьма чувствительным может оказаться предложенный Смитом и Спристербахом метод проявления пятна кислоты на бумаге, основанный на реакции восстанавливающих сахаров с ароматическими аминами (Д 25). Из других реактивов следует указать йодноватокислый калий с йодистым калием, нингидрин или реактив Несслера для проявления аммонийных солей кислот (Лонг и сотрудники). Последние два реактива оказались малопригодными.

### Специфические реактивы для некоторых кислот

Бина и Каламар для проявления дикарбоновых кислот рекомендовали высушивать хроматограммы в течение 15 мин при температуре 150—160°; в этом случае при высоких концентрациях кислот на бумаге образуются темные пятна, а при низких концентрациях возникает синяя флуоресценция. По данным, приведенным Брауном и сотрудниками, некоторые кислоты (лимонная, винная, молочная) флуоресцируют в ультрафиолетовом свете после опрыскивания хроматограммы азотнокислым серебром. По Шрейеру и Гаку весьма чувствительным является метод идентификации лимонной, аконитовой и винной кислот раствором *n*-диметиламинобензальдегида в уксусном ангидриде (Д 102 а). Из других реактивов для проявления следует отметить марганцевокислый калий, пиридин и уксусный ангидрид, ванадиевокислый аммоний, церийаммонийнитрат (Бух и сотрудники) или ферроцианид калия с  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  (Мартин). Марганцевокислый калий пригоден, в частности, для проявления ненасыщенных и некоторых оксикислот (Д 3). Для проявления фосфорных эфиров кислот применяют чувствительные реакции их с молибденовокислым аммонием и хлорной кислотой (см. стр. 286) (Д 45).

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Выбор системы растворителей и некоторые осложнения при хроматографировании кислот были рассмотрены в введении. В отличие от низших жирных кислот для этой группы в основном применимы кислые системы растворителей, содержащие; в частности, муравьиную, уксусную и пропионовую кислоты. Последние после разделения анализируемых кислот должны быть удалены с бумаги. Вас применил сернистую кислоту, отличающуюся от вышеназванных кислот более высокой константой диссоциации и быстрее улетучивающуюся с бумаги. В этих системах органические кислоты, за исключением щавелевой кислоты, образуют на хроматограмме пятна круглой формы. Щавелевая кислота, как более сильная по сравнению с кислотами растворителя, дает пятна продолговатой формы, что, однако, не влияет на разделение, так как из этой группы кислот щавелевая имеет наименьшую величину  $R_f$ . Определенные трудности, связанные с удалением с хроматограмм кислот, содержащихся в растворителях, принудили Шефтель и сотрудников [1—3] изыскать системы растворителей, содержащие легко летучие компоненты, ускоряющие улетучивание с бумаги ранее названных кислот. К таким компонентам относятся метилбензоат, эвкалиптол и др. Эти вещества испаряются с хроматограммы вместе с летучими кислотами при высушивании на воздухе в течение нескольких часов. В таких системах подлежащие разделению кислоты слабо растворимы; для повышения их растворимости добавляют низшие спирты.

Основным компонентом кислых систем являются алифатические спирты, от этилового и до амилового спирта включительно. Наличие спирта в системе может вызвать этерификацию его органической кислотой и далее — непостоянство значений  $R_f$ , что является определенным недостатком таких систем. Во избежание этого в качестве основного компонента системы применяют окись мезитила (Лагг и Оверелл), кетоны и хлорированные углеводороды (Скотт) или ограничивают применение системы определенным периодом времени с момента приготовления. По данным Шефтель и сотрудников [6] при применении кислых систем продвижение на хроматограмме кислоты и ее соли не должно быть одинаковым; в противном случае возможны осложнения при идентификации кислоты. Исходя из этого, для задержания катионов на старте указанные авторы рекомендуют добавлять к раствору анализируемых кислот серную кислоту.

Из щелочных систем растворителей для разделения кислот почти исключительно применяют системы, содержащие аммиак. По данным Шефтель и сотрудников [6] щелочные системы дают пятна менее округлой формы, чем кислые, и отрицательно влияют на проявление хроматограммы кислотно-основными индикаторами. Однако их с успехом можно применить при двумерном способе хроматографирования. Из спиртов в основном применяют этанол или пропанол; в системе, содержащей бутанол, пятна часто остаются на стартовой линии.

При анализе многих кислот, особенно в присутствии сахаров или аминокислот, необходимо пользоваться двумерным способом хроматографирования. В этом случае для эффективного разделения необходимо применять системы (в качестве первого и второго растворителей) с различными значениями pH (Бенсон и сотрудники).

Интересного разделения лимонной, винной, яблочной, малеиновой, малоновой и янтарной кислот способом двумерного кругового хроматографирования с применением растворителя *n*-пентанол — 5 *M* раствор муравьиной кислоты в соотношении 1 : 1 достигли Айран и Барнабас.

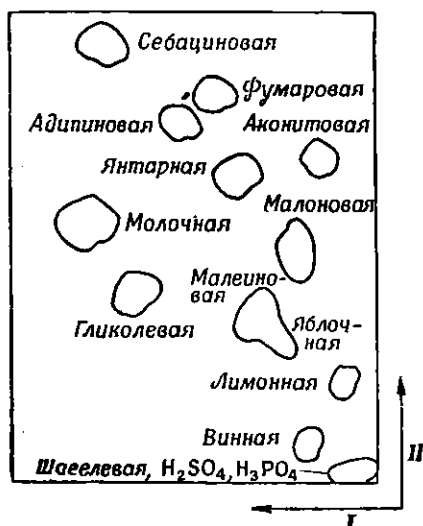
а) Подобную последовательность пятен дают следующие системы: *н*-бутанол-муравьиная кислота-вода (10:2:5), *н*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5), уксусноэтиловый эфир-муравьиная кислота-вода (3:1:1)

### Кислые системы

Наиболее широкое применение нашли следующие системы растворителей: *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (4 : 1 : 5 или 10 : 2 : 5), *n*-пентанол — 5 *M* раствор муравьиной кислоты (1 : 1), этилацетат — муравьиная кислота — вода (3 : 1 : 1), фенол — вода — муравьиная кислота (3 : 1 : 1), изоамилформиат — муравьиная кислота — вода (11 : 2 : 1), окись мезитила — вода — муравьиная кислота (75 : 75 : 34), этилацетат — метилбензоат — муравьиная кислота (40 : 10 : 5) с насыщением системы водой, *n*-пропанол — эвкалиптол — муравьиная кислота (5 : 5 : 2) с насыщением водой и этилмоноэфир этиленгликоля — эвкалиптол — муравьиная кислота (5 : 5 : 2) с насыщением водой. Пригодность этих систем для разделения определенных кислот видна из данных табл. 18 и рис. 130. При применении систем, содержащих фенол, наблюдается образование приблизительно на  $\frac{1}{4}$  хроматограммы так называемой кислой зоны, нарушающей проявление индикаторами (Старк и сотрудники). Во избежание этого необходимо, в частности при хроматографировании веществ с величиной  $R_f$  ниже 0,25, продлить фронт хроматограммы приблизительно на 10 см ниже обычного.

### Щелочные системы

Эти системы растворителей применяют в качестве дополнительных систем только для первичного разделения при двумерном хроматографировании. В этих случаях Шефтель и сотрудники [2, 3] рекомендуют применять следующие системы: этилмоноэфир этиленгликоля — аммиак — вода в соотношении 80 : 5 : 15 или этанол — аммиак — вода в соотношении 80 : 5 : 15. Кальбе рекомендует тетрагидрофуран — 3 н. раствор аммиака в соотношении 4 : 1.



### Двумерная хроматография

Наиболее пригодные системы растворителей для двумерной хроматографии приведены в подписи к рис. 131.

Рис. 131. Двумерная хроматограмма органических кислот (Нордман и сотрудники).

Система: I — растворитель: этанол — аммиак — вода в соотношении 80 : 5 : 15; II — растворитель: *n*-пропанол — эвкалиптол — муравьиная кислота в соотношении 50 : 50 : 20. Смесь насыщают водой.

### Хроматография производных

Хроматографирование гидроксамовых кислот этой группы применяют очень редко. При этерификации дикарбоновых кислот требуется (Финк и Финк) применение половинного количества гидроксилamina для образования гидроксаматной группы только с одним карбоксилем. Несмотря

на это, при разделении таких производных получают продолговатые пятна и, кроме того, несколько пятен для одной кислоты. Карионе и Хасимото разделяют дикарбоновые кислоты в виде флуоресцирующих производных, получаемых в результате обработки их полифенолами (резорцином, флороглюцином, пирогаллолом и др.).

Лимонная и изолимонная кислоты имеют почти во всех системах растворителей настолько близкие величины  $R_f$ , что разделение их в смеси не представляется возможным. Поэтому для идентификации этих кислот в смеси Шефтель и сотрудники [5] рекомендуют предварительный перевод изолимонной кислоты в ее лактон, передвигающийся затем на хроматограмме значительно быстрее, чем свободная кислота.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для количественного анализа в основном можно применять ранее приведенные методы (см. стр. 335). Чаще всего пользуются зависимостью между величиной площади пятна и концентрацией. Точность этого метода колеблется в пределах  $\pm 5-10\%$ . Менее точными по Брайанту и Овереллу являются методы электрометрического титрования, например потенциометрического. Виланд и Фельд [1] разработали следующий ретенционный метод количественного анализа кислот. Согласно этому методу, раствор уксуснокислой меди(II) в тетрагидрофуране просачивается по капиллярам бумаги перпендикулярно направлению тока растворителя. При этом кислоты, образующие с медью комплексные соединения или нерастворимые осадки, задерживают фронт восходящего растворителя; из величины площади задержанных пятен на хроматограмме можно вычислить количество кислоты. Райхль и Леффлер усовершенствовали этот метод, применив так называемый обратный ретенционный анализ (см. стр. 189).

Для определения лимонной кислоты Босер использовал ее способность образовывать с медью комплексное соединение. Нордман и сотрудники количественно определяли *цис*- или *транс*-аконитовую кислоту реакцией с *n*-диметиламинобензальдегидом в уксусном ангидриде; образовавшееся при этом красное производное экстрагировали метанолом и фотометрировали.

Наиболее точными для количественного анализа кислот являются методы, основанные на применении радиоизотопов, например радиоактивного углерода  $C^{14}$ .

### Кетокислоты

Много внимания уделяется хроматографии на бумаге кетокислот ввиду их большого биохимического значения. Этот метод идентификации впервые был применен Кавалини и сотрудниками [2], а также Виландом и Фишером [2].

Хроматографирование свободных кетокислот применяется редко, что объясняется легучестью некоторых из них, значительной лабильностью и возможным влиянием на их подвижность других веществ, содержащихся в анализируемой смеси (Коштирж и Рабек [1]).

В большинстве случаев кетокислоты хроматографируют в виде различных производных, чаще всего в виде 2,4-динитрофенилгидразонов

(ДНФГ). Поскольку эти производные часто встречаются в двух изомерных формах и отделение значительного числа ДНФГ друг от друга затруднено, то в последнее время хроматографируют аминокислоты, полученные в результате восстановления ДНФГ.

### СВОБОДНЫЕ КИСЛОТЫ

По Виланду и Фишеру или Магазанику и Умбаргеру разделение свободных кетокислот можно проводить в кислых системах, например используя смесь *n*-бутанола с муравьиной кислотой в соотношении 95 : 5 с насыщением системы водой.

Для проявления кетокислот применяют по Виланду и Фишеру весьма чувствительный реактив — *o*-фенилендиамин (Д 26) или раствор семикарбазида (Магазаник и Умбаргер). При проявлении кетокислот *o*-фенилендиамином необходимо строго соблюдать время нагревания. Минимальный перегрев влияет на результаты проявления.

### 2,4-ДИНИТРОФЕНИЛГИДРАЗОНЫ

#### Приготовление пробы

*Экстракция из растительного материала.* Наиболее пригодным, вероятно, является метод Альфтгана и Виртанена. Согласно этому методу, приблизительно 100 г свежего материала гомогенизируют в растворе вольфрамовой кислоты (вода — 10%-ный раствор вольфрамовокислого натрия — 0,66 н. раствор серной кислоты в соотношении 6 : 2 : 2). Полученную массу фильтруют через плотную ткань. Гомогенизирование материала с последующей фильтрацией проводят три раза. Полученные экстракты объединяют и фильтруют через бумажный фильтр.

*Экстракция из крови и мочи.* Кровь или другой биологический материал, за исключением мочи, в которой белок обычно отсутствует, предварительно освобождают от белков по Селигсону и Шапиро или Кавалини и Фронталли [1].

*Приготовление ДНФГ.* Описано много модификаций метода приготовления ДНФГ, основанных на инкубировании кетокислот с динитрофенилгидразином с последующей экстракцией ДНФГ (II 27).

С целью удаления балластных веществ очистку раствора чаще всего проводят путем взбалтывания с раствором углекислого натрия, последующего подкисления раствора и повторной экстракции органическим растворителем (этилацетат или эфир). Виртанен и сотрудники [3] для удаления из раствора главным образом липофильных веществ рекомендуют адсорбировать ДНФГ из этилацетатного раствора на слое бентонита и целита 545 (в соотношении 1 : 1) и после промывания адсорбента эфиром экстрагировать ДНФГ в пробирке центрифуги 10 мл 10%-ного углекислого натрия. Полученный раствор подкисляют, после чего к нему добавляют этилацетат.

Пробы ДНФГ лучше всего наносить на бумагу в буферном растворе с pH 7,2, нанесение проб в органическом растворителе приводит к расщеплению ДНФГ и, в частности, к их декарбоксилированию (Альтман и сотрудники).

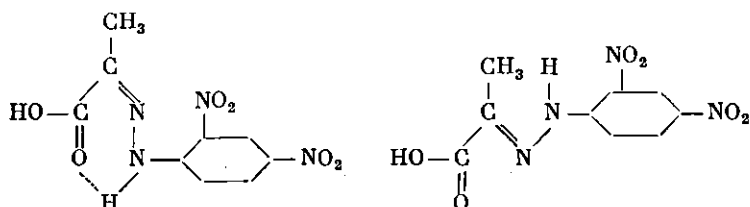
### Проявление

ДНФГ представляют собой окрашенные соединения. На хроматограмме они видны в виде окрашенных пятен. Опрыскивание хроматограммы 0,5 н. раствором едкого натра приводит к изменению окраски и повышению интенсивности окраски пятен; это облегчает идентификацию анализируемых кислот (Заппи). ДНФГ гасят флуоресценцию в ультрафиолетовом свете.

### Системы растворителей

Для разделения ДНФГ применяют различные нейтральные или щелочные системы, содержащие спирты. Затруднения обусловлены изомерией некоторых производных, в частности ДНФГ пировиноградной и щавелевоуксусной кислот. Кавалини и Фронталли [1] установили отсутствие указанного явления у синтетически приготовленных проб, не подвергавшихся процессу очистки (II 276). Эти авторы считают, что изомеризация вызвана повторной экстракцией с изменением pH раствора.

Образовавшиеся изомеры являются *цис*- и *транс*-изомерами. Ишервуд и Джонс [3] на основании величин  $R_f$  и инфракрасных спектров ДНФГ пировиноградной кислоты приводят следующие возможные формулы ДНФГ:



Кроме пятен этих изомеров, могут образоваться и другие пятна продуктов полимеризации (в случае пировиноградной кислоты) или декарбоксилирования (щавелевоуксусная кислота переходит в пировиноградную) (Ишервуд и Круисчанк) [1]. Кроме того, не исключена возможность присутствия свободного 2,4-динитрофенилгидразина. Тауерс и Мортимер [1] обнаружили еще одно вещество, идентифицированное ими как 1-окси-6-нитро-1,2,3-бензотриазол; это соединение возникает при воздействии щелочей на 2,4-динитрофенилгидразин.

Из систем растворителей наиболее применимы (по данным Кавалини и Фронталли [1]) *n*-бутанол — этанол — вода в соотношении 4 : 1 : 5 или (ЭльГавари и Томпсон) *n*-бутанол — этанол — 0,5 н. раствор аммиака в соотношении 7 : 1 : 2.

Бумагу для хроматографирования некоторые авторы рекомендуют пропитывать буферным раствором с pH 6—8,5. Так, Ишервуд и Круисчанк [1] рекомендуют разделение ДНФГ проводить на бумаге, пропитанной фосфатным буфером (pH 6,2), в системе *трет*-амиловый спирт — этанол — вода в соотношении 5 : 1 : 4. Величины  $R_f$  ДНФГ при хроматографировании в некоторых системах приведены в табл. 18. Для пропитки бумаги применяли также этиллактат, а в качестве подвижной фазы — бензин, содержащий 1—3% четыреххлористого углерода (Бертон) или метод обращенных фаз на ацетилованной бумаге (Коштирж и Славик [2]). Виртанен и сотрудники [3] предпочитают разделение проводить по Серенсену в 0,1 *M* водном буферном растворе гликокол — едкий натр с pH 8,4.

Для анализа большого количества ДНФГ Заппи применил двумерное хроматографирование; при этом первым растворителем служила система *n*-бутанол — этанол — вода в соотношении 41 : 9 : 50, а вторым — фенол, насыщенный водой. В зависимости от расположения пятен на хроматограмме можно судить о количестве карбоксильных и гидроксильных групп, а также о наличии ароматического ядра.

### Количественный анализ

Пятно ДНФГ, полученное на хроматограмме после разделения по методу Кавалини и сотрудников [2], вырезают, элюируют 10%-ным раствором углекислого натрия и измеряют окраску раствора при длине волны 510 мμ. По данным Маркеса ДНФГ чувствительны по отношению к свету, температуре и низким значениям pH. При определении ДНФГ кетокислот, образующих изомеры, необходимо вырезать пятна обоих изомеров и измерить их суммарную окраску (Кавалини и Фронталли [1]). Для количественного анализа ДНФГ был предложен ряд видоизмененных методов. Из них приводим метод Кавалини и Фронталли [1] (II 28).

Нейш для количественного анализа ДНФГ рекомендовал полярографическое определение в 0,1 н. растворе соляной кислоты. Этот метод позволяет анализировать микрограммовые количества ДНФГ.

### ПЕРЕВОД 2,4-ДИНИТРОФЕНИЛГИДРАЗОНОВ В АМИНОКИСЛОТЫ

Кулонен [1], учитывая упомянутые в предыдущем разделе недостатки и затруднения при хроматографировании ДНФГ, применил метод, предусматривающий предварительное восстановление ДНФГ амальгамой алюминия в аминокислоты с последующей идентификацией последних методом хроматографии на бумаге. В дальнейшем этот метод был разработан Тауерсом и сотрудниками [2], а также Виртаненом и сотрудниками [1, 2]. Первые для восстановления ДНФГ применили каталитическое гидрирование, вторые — олово в соляной кислоте (II 29). Для идентификации аминокислот, образовавшихся в результате восстановления ДНФГ, пользуются методами, приведенными в главе об аминокислотах (стр. 400). Для этой цели Виртанен и сотрудники [1, 2] рекомендуют двумерное хроматографирование с применением в качестве первого растворителя системы *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5, а в качестве второго — фенола, насыщенного водой.

В результате восстановления ДНФГ образуются следующие аминокислоты: из щавелевоуксусной кислоты — аспарагиновая, из α-кетоглутаровой — глутаминовая, из оксипировиноградной — серин, из глиоксальной — гликокол, из γ-окси-α-кетомасляной — гомосерин, из β-окси-α-кетомасляной — треонин, а из пировиноградной кислоты — аланин (Тауерс и сотрудники [2], Виртанен и Альфтан [2]). Кулонен [2] считает, что серин образуется в качестве артефакта из продуктов альдольной конденсации пировиноградной кислоты. Точно не установлено и происхождение γ-аминомасляной кислоты. По данным Тауерса и сотрудников [2] она может образоваться в результате декарбоксилирования ДНФГ α-кетоглутаровой кислоты или при восстановлении ДНФГ семиальдегида янтарной кислоты.

По данным Тауерса и сотрудников [1] в результате каталитического гидрирования 1-окси-6-нитро-1, 2, 3-бензотриазола возникает вещество, положительно реагирующее с нингидрином и передвигающееся аналогично валину при хроматографировании в феноле с pH 5,5 (см. стр. 249). Помимо этого, был обнаружен ряд других веществ, реагирующих с нингидрином, но они до сих пор не идентифицированы.

### Количественный анализ

Сложность количественного определения кетокислот в виде аминокислот состоит в том, что восстановление ДНФГ не протекает количественно. Все же при точном соблюдении условий можно достигнуть постоянных результатов. При восстановлении ДНФГ оловом (II 29) получают следующие выходы соответствующих аминокислот: из пировиноградной кислоты — 78%, из  $\alpha$ -кетомасляной — 32%, из щавелевоуксусной — 61% и из  $\alpha$ -кетоглутаровой — 43% (Альфтан и Виртанен). Количественный анализ аминокислот (см. стр. 433) с учетом приведенных выходов дает возможность определить количества исходных кетокислот.

### ХИНОКСАЛИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

Образование хиноксалиновых производных некоторых кетокислот с *o*-фенилендиамином было использовано Виландом и Фишером для хроматографического разделения. Для этой же цели Хокенхал и Флутгейт [1, 2] приготовили производные кетокислот с 1,2-диамино-4-нитробензолом. Предложенные для разделения этих производных системы растворителей особенно пригодны ввиду их большой скорости протекания (1—2 час).

### ЛИТЕРАТУРА

- Airan J. W., Barnabas J., *Naturwissenschaften*, 40, 510 (1953).  
 Alfthan M., Virtanen A. I., *Acta chem. Scand.*, 9, 186 (1955).  
 Altmann S. M., Crook E. M., Datta S. P., *Biochem. J.*, 49, Ixiii (1951).  
 Amelung D., Böhm P., *Z. physiol. Chem.*, 298, 199 (1954).  
 Barnabas J., Joshi G. V., *Anal. Chem.*, 27, 443 (1955).  
 Benson A. A., Bassham J. A., Calvin M., Goodale T. C.,  
 Maas V. A., Stepka W., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1710 (1950).  
 Bina K., Kalamar J., *Naturwissenschaften*, 43, 36 (1956).  
 Boldingh J., *Experientia*, 4, 1 (1948).  
 Boser H., *Naturwissenschaften*, 42, 440 (1955).  
 Brown F., *Nature*, 167, 441 (1951). [1]  
 Brown F., Hall L. P., *Nature*, 166, 66 (1950). [2]  
 Bryant F., Overell B. T., *Nature*, 167, 361 (1951). [1]  
 Bryant F., Overell B. T., *Biochim. biophys. Acta*, 10, 471 (1953). [2]  
 Buch M. L., Montgomery R., Porter W. L., *Anal. Chem.*, 24, 489 (1952).  
 Burton H. S., *Chemistry and Industry*, 1954, 576.  
 Cavallini D., Frontali N., *Biochim. biophys. Acta*, 13, 439 (1954). [1]  
 Cavallini D., Frontali N., Toschi G., *Nature*, 163, 568 (1949). [2]  
 Dawson R. M. C., *Biochim. biophys. Acta*, 14, 374 (1954).  
 Denison F. W., Jr., Phares E. F., *Anal. Chem.*, 24, 1628 (1952).  
 Duncan R. E. B., Porteous J. W., *Analyst*, 78, 641 (1953).  
 El Hawary M. F. S., Thompson R. H. S., *Biochem. J.*, 53, 340 (1953).  
 Fink K., Fink R. M., *Proc. Soc. exp. biol. Med.*, 70, 654 (1949).  
 Gore D. N., *Chemistry and Industry*, 1951, 479.  
 Guillaume J., Osteux R., *Compt. rend.*, 241, 501 (1955).

- Hiscox E. R., Berridge N. J., *Nature*, **166**, 522 (1950).
- Hockenhull D. J. D., Floodgate G. D., *Biochem. J.*, **52**, 38 (1952). [1]
- Hockenhull D. J. D., Hunter G. D., Herbert M. W., *Chemistry and Industry*, 1953, 127. [2]
- Holasek A., Winsauer K., *Monatsh. Chem.*, **85**, 796 (1954).
- Hulme A. C., Swain T., *Nature*, **168**, 254 (1951).
- Cheftel R. I., Munier R., Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**, 840 (1951). [1]
- Cheftel R. I., Munier R., Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **34**, 380 (1952). [2]
- Cheftel R. I., Munier R., Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **35**, 1085 (1953). [3]
- Cheftel R. I., Munier R., Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **35**, 1091 (1953). [4]
- Cheftel R. I., Munier R., Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **35**, 1095 (1953). [5]
- Cheftel R. I., Munier R., Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **36**, 429 (1954). [6]
- Inouye Y., Noda M., *J. agr. chem. Soc. (Japan)*, **25**, 496 (1952). [1]
- Inouye Y., Noda M., *J. agr. chem. Soc. (Japan)*, **25**, 161 (1952). [2]
- Inouye Y., Noda M., Hamiro Y., *J. agr. chem. Soc. (Japan)*, **25**, 491 (1952). [3]
- Inouye Y., Noda M., Hirayama O., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **32**, 132 (1955). [4]
- Isherwood F. A., Cruickshank D. H., *Nature*, **173**, 121 (1954). [1]
- Isherwood F. A., Hanes C. S., *Biochem. J.*, **55**, 824 (1953). [2]
- Isherwood F. A., Jones R. L., *Nature*, **175**, 419 (1955). [3]
- Jermstad A., Jensen K. B., *Pharm. Acta Helv.*, **25**, 209 (1950).
- Jones A. R., Dowling E. J., Skraba W. J., *Anal. Chem.*, **25**, 394 (1953).
- Kalbe H., *Z. physiol. Chem.*, **297**, 19 (1954).
- Kariyone T., Hashimoto Y., *J. pharm. Soc. Japan*, **71**, 439 (1951).
- Kaufmann H. P., *Fette u. Seifen*, **52**, 331 (1950). [1]
- Kaufmann H. P., *Fette u. Seifen*, **54**, 73 (1952). [2]
- Kaufmann H. P., Budwig J., Schmidt C. W., *Fette u. Seifen*, **54**, 10 (1952). [3]
- Kaufmann H. P., Budwig J., *Fette u. Seifen*, **54**, 348 (1952). [4]
- Kaufmann H. P., Nitsch W. H., *Fette u. Seifen*, **56**, 154 (1954). [5]
- Kennedy E. P., Barker H. A., *Anal. Chem.*, **23**, 1033 (1951).
- Kobrlé V., Zahradník R., *Chem. Listy*, **48**, 1189 (1954).
- Košťíř J. V., Rábek V., *Biochim. biophys. Acta*, **5**, 210 (1953) [1]
- Košťíř J. V., Slavič K., *Chem. Listy*, **44**, 17 (1950); *Coll. Czechoslov. chem. Commun.*, **15**, 17 (1950). [2]
- Kulonen E., *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **5**, 72 (1953). [1]
- Kulonen E., *Suomen Kemi.*, **28B**, 105 (1955). [2]
- Lea C. H., Rhodes D. N., Stoll R. D., *Biochem. J.*, **60**, 353 (1955).
- Lindqvist B., Storgårds T., *Acta chem. Scand.*, **7**, 87 (1953).
- Loeb G., Lichtenberger M. J., *Bull. Soc. chim. France*, **1950**, 1128.
- Löffler J. E., Reichl E. R., *Mikrochim. Acta*, **1953**, 79.
- Long A. G., Quayle J. R., Stedman R. J., *J. Chem. Soc.*, **1951**, 2197.
- Lugg J. W. H., Overell B. T., *Nature*, **160**, 87 (1947).
- Magasanik B., Umbarger H. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2308 (1950).
- Mangold H. K., Lamp B. G., Schlenk H., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6070 (1955).
- Marinetti G. V., Stotz E., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6668 (1955). [1]
- Marinetti G. V., Stotz E., *Biochim. biophys. Acta*, **21**, 168 (1956). [2]
- Markees S., *Experientia*, **11**, 205 (1955).
- Martin S. M., *Chemistry and Industry*, **1955**, 427.
- Michael F., Schweppe H., *Angew. Chem.*, **66**, 136 (1954).
- Nair J. H., *Anal. Chem.*, **25**, 1912 (1953).
- Neish W. J. P., *Recueil*, **72**, 105 (1953).
- Nordmann J., Du Ruisseau J. R., Nordmann R., *3e Congr. int. Biochim. Bruxelles* (1955); *Anal. Chem.*, **67**, 668 (1955).
- Nordmann R., Gauchery O., Du Ruisseau J. P., Thomas Y., *Nordmann J., Bull. Soc. Chim. biol.*, **36**, 1461 (1954). [1]
- Nordmann R., Gauchery O., Du Ruisseau J. P., Thomas Y., *Nordmann J., Bull. Soc. Chim. biol.*, **36**, 1641 (1954). [2]

- Nunez G. Spiteri J., Bull. Soc. Chim. biol., 35, 851 (1953).  
 Olley J., Dawson R. M. C., Biochem. J., 62, 5P (1956).  
 Opieńska-Blauth J., Sakławska-Szymonova O., Kański M.,  
 Nature, 168, 511 (1951).  
 Osteux R., Laturaze J., Compt. rend., 239, 512 (1954).  
 Perilä O., Acta chem. Scand., 9, 864 (1955) [1]  
 Perilä O., Acta chem. Scand., 10, 143 (1956). [2]  
 Пустовалов В. Л., Биохимия, 20, 730 (1955).  
 Reid R. L., Lederer M., Biochem. J., 50, 60 (1951).  
 Reichl E. R., Monatsh. Chem., 86, 69 (1955). [1]  
 Reichl E. R., Löffler J. E., Mikrochim. Acta, 1954, 226. [2]  
 Satake K., Seki T., Kagaku no Ryoiki (Japan), 4, 557 (1950); C. A., 45, 4604  
 (1951).  
 Savary P., Bull. Soc. Chim. biol., 36, 1355 (1954).  
 Scott R. W., Anal. Chem., 27, 367 (1955).  
 Seligson D., Shapiro B., Anal. Chem., 24, 754 (1952).  
 Schlögl K., Siegel A., Mikrochim. Acta, 40, 202 (1953).  
 Schreier K., Hack W., Naturwissenschaften, 43, 178 (1956).  
 Schweppe H., в книге Linskens H. F. (red.), Papierchromatographie  
 in der Botanik. Springer-Verlag, Berlin, стр. 83 (1955).  
 Smith F., Spriestersbach D., Nature, 174, 466 (1954).  
 Spiteri J., Bull. Soc. Chim. biol., 36, 1355 (1954).  
 Stadtman E., Barker H. A., J. biol. Chem., 184, 769 (1950).  
 Stark J. B., Goodban A. E., Owens H. S., Anal. Chem., 23, 413 (1951).  
 Svendsen A. B., Pharm. Acta Helv., 25, 230 (1950).  
 Šanda V., Procházka Z., Le Moal H., Chem. Listy, 52, 1546 (1958).  
 Thompson A. R., Austral. J. sci. Res., 4B, 180 (1951).  
 Tietz A., Popják G., Biochem. J., 60, 155 (1955).  
 Towers G. H. N., Mortimer D. C., Nature, 174, 1189 (1954). [1]  
 Towers G. H. N., Thompson J. F., Steward F. C., J. Am. Chem.  
 Soc., 76, 1959, 2392 (1954). [2]  
 Vas K., Agro kém. Talajtan, 1, 299 (1952).  
 Virtanen A. I., Alfthan M., Acta chem. Scand., 8, 1720 (1954). [1]  
 Virtanen A. I., Alfthan M., Acta chem. Scand., 9, 188 (1955). [2]  
 Virtanen A. I., Miettinen J. K., Kunttu H., Acta chem. Scand., 7,  
 38 (1953). [3]  
 Wagner H., Abisch L., Bernhard K., Helv. chim. Acta, 38, 1536 (1955).  
 Wieland T., Feld U., Angew. Chem., 63, 258 (1951). [1]  
 Wieland T., Fischer F., Naturwissenschaften, 36, 219 (1949). [2]  
 Yamafuji K., Eto M., Enzymologia, 16, 247 (1953).  
 Zappi F., Ricerca sci., 23, 1432 (1953).  
 Zvolský K., Redlich P., Průmysl Potravin, 6, 559 (1955).

# УГЛЕВОДЫ

---

*К. Мацек*

В этой главе сахара разделены на три группы: I — моносахариды и олигосахариды, II — замещенные сахара и производные сахаров, III — полисахариды. К первой группе отнесены простые альдозы, кетозы и гексометилозы (метилпентозы), содержащие от 4 атомов углерода и выше, а также их олигосахариды, содержащие до 14 сахарных остатков. Здесь же рассматриваются некоторые проявители и системы растворителей, являющиеся общими и для сахаров группы II. К последней отнесены сахароспирты, кислоты, лактоны и ангидриды сахаров, дезоксиуглеводы, гликали, метилированные сахара, метилгликозиды, фосфорные эфиры и аминосахара. Наконец, для группы полисахаридов приведены примеры их хроматографии на бумаге и методы определения строения полисахаридов.

## *Связь между структурой (строением) сахаров и величиной $R_f$*

Одним из основных вопросов теории хроматографии сахаров на бумаге является механизм их разделения. Сахара, как соединения с большим числом гидроксильных групп, хорошо растворимы в воде, и их коэффициент распределения всегда благоприятствует накоплению в водной фазе. Следовательно, в первую очередь необходимо было решить вопрос, какой процесс — распределение или адсорбция — имеет место при хроматографировании сахаров на бумаге.

Наблюдениями Томпсона и Стьюард о невозможности количественного извлечения сахаров из бумаги подтверждена адсорбция их целлюлозой. Величина потерь сахаров в результате адсорбции пропорциональна расстоянию пятна от стартовой линии. На основании этого Каукабани приходит к выводу о том, что при хроматографировании вначале имеет место, вероятно, процесс адсорбции на поверхности целлюлозы и лишь

затем — распределение. Согласно данным большинства авторов, процесс распределения является решающим при разделении сахаров.

Общеизвестно, что сахара при хроматографировании их в растворителях, слабо насыщенных водой, остаются на линии старта или имеют весьма низкие значения  $R_f$ .

При применении растворителей, обильно насыщенных водой, значения  $R_f$  будут более высокими. Ишервуд и Джермин показали для ряда органических растворителей, что продвижение углеводов по бумаге, выраженное величиной  $R_M$ , прямо пропорционально логарифму молярной доли воды в органическом растворителе (табл. 19).

Таблица 19

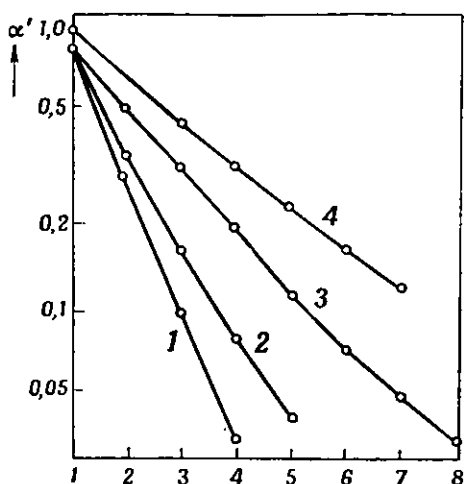
ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОДЫ В ОРГАНИЧЕСКОМ РАСТВОРИТЕЛЕ НА ВЕЛИЧИНУ  $R_f$   
(по Джермину и Ишервуду)

Растворитель	Молярная доля во- ды в не- водной фазе	Значения $R_f$			$R_f$ рамнозы	$R_f$ ксилозы
		рамнозы	ксилозы	глюкозы	$R_f$ ксилозы	$R_f$ глюкозы
Этилацетат . . . . .	0,132	0,01	0,00	0,00	—	—
Метилацетат . . . . .	0,269	0,075	0,04	0,00	1,9	—
Метилэтикетон . . . . .	0,305	0,095	0,05	0,0025	1,9	2,0
Бензиловый спирт . . . . .	0,387	0,11	0,06	0,03	1,8	2,0
Циклогексанол . . . . .	0,432	0,15	0,06	0,03	2,5	2,0
<i>m</i> -Крезол . . . . .	0,471	0,27	0,15	0,07	1,75	2,1
<i>n</i> -Бутанол . . . . .	0,508	0,22	0,125	0,07	1,7	1,8
<i>трет</i> -Амиловый спирт . . . . .	0,609	0,32	0,245	0,145	1,3	1,7
Фенол . . . . .	0,668	0,59	0,44	0,39	1,34	1,13
Хинолин . . . . .	0,680	0,41	0,31	0,19	1,32	1,6
2-Бутанол . . . . .	0,707	0,41	0,31	0,26	1,32	1,27
Изомасляная кислота . . . . .	0,778	0,51	0,44	0,37	1,16	1,19
<i>сим.м</i> -Коллидин . . . . .	0,846	0,59	0,50	0,44	1,18	1,14

Если принять во внимание распределение между двумя фазами, то в неподвижной фазе наблюдается взаимодействие сахаров с водой и целлюлозой, а в подвижной фазе — с молекулами воды, растворенными в этой фазе. По Хейнсу и Ишервуду, считающим неподвижную фазу комплексом вода — целлюлоза, разделение двух близких по своему строению веществ зависит от той легкости, с которой каждое вещество переходит, с одной стороны, в комплекс вода — целлюлоза, а с другой — в воду подвижной фазы.

Как уже было отмечено выше (см. стр. 77), Мартин вывел соотношение, согласно которому влияние строения веществ на коэффициент распределения или на их поведение при хроматографировании на бумаге является величиной аддитивной. Эта гипотеза действительна для сахаров с одинаковой циклической структурой, где каждое увеличение молекулы на группу  $=\text{СНОН}$  приводит к соответствующему снижению значения  $R_f$ . Другой пример дают работы Джинза и сотрудников, Уайта и Сикор или Френча и Уайлда в области олигосахаридов. Френч и Уайлд, например, определили, что логарифм  $a' = R_f/(1 - R_f)$  у ряда олигосахаридов с одинаковой связью линейно зависит от числа остатков моносахаридов (рис. 132). Присутствие других сахарных остатков или другой способ

связи для тех же остатков в молекуле олигосахарида дает в результате другой наклон прямой. Экспериментальное определение наклона прямой



дает возможность идентифицировать соответствующий полисахарид. Влияние степени полимеризации на передвижение веществ по бумаге для различных полисахаридов с разветвленной цепью можно видеть на рис. 135 и 136.

На передвижение сахаров по бумаге значительное влияние

Р и с. 132. Зависимость величины  $\alpha$  от степени полимеризации различных олигосахаридов (Френч и сотрудники).

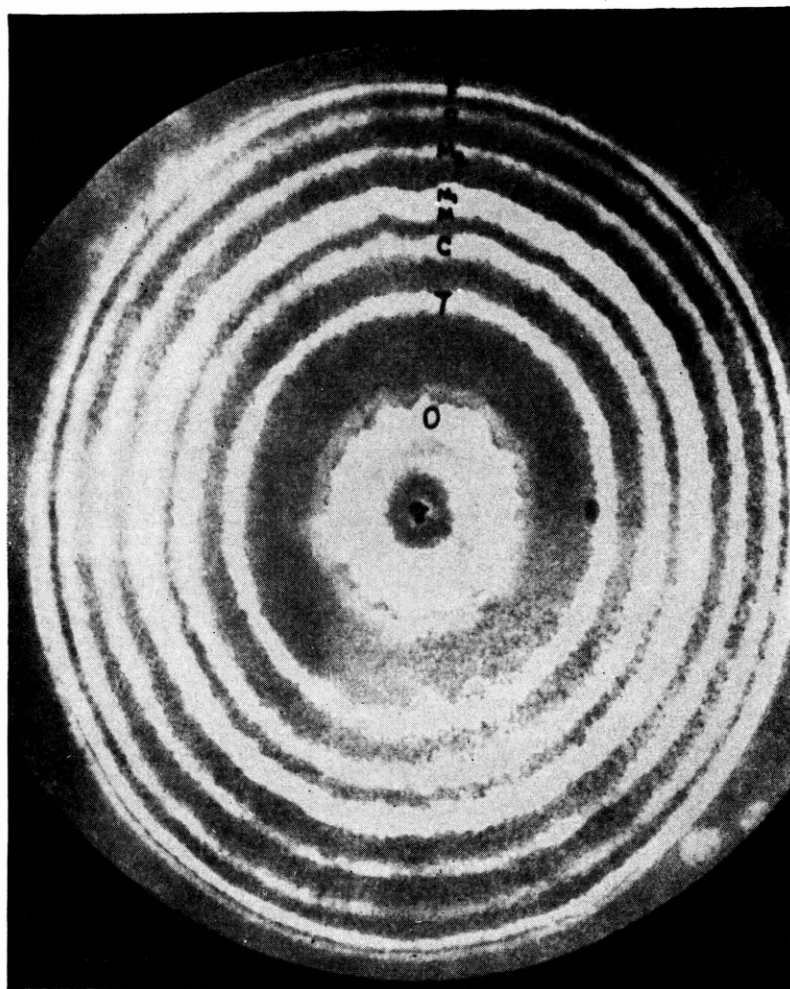
По оси абсцисс: количество моносахаридных остатков в молекуле. По оси ординат:  $R_f/(1-R_f)$  (нанесено в логарифмическом масштабе). 1—галактан; 2—декстран; 3—амилоза; 4—инулин.

оказывает соответствующая структурная (циклическая) форма их. На примере метилглюкозидов, альдопентоз и альдогексоз, которые могут образовывать пиранозную и фуранозную формы (табл. 20), видно, что сахара с фуранозной формой дают более высокие значения  $R_f$ , нежели сахара с пиранозной формой. Для производных сахаров изменение в скорости продви-

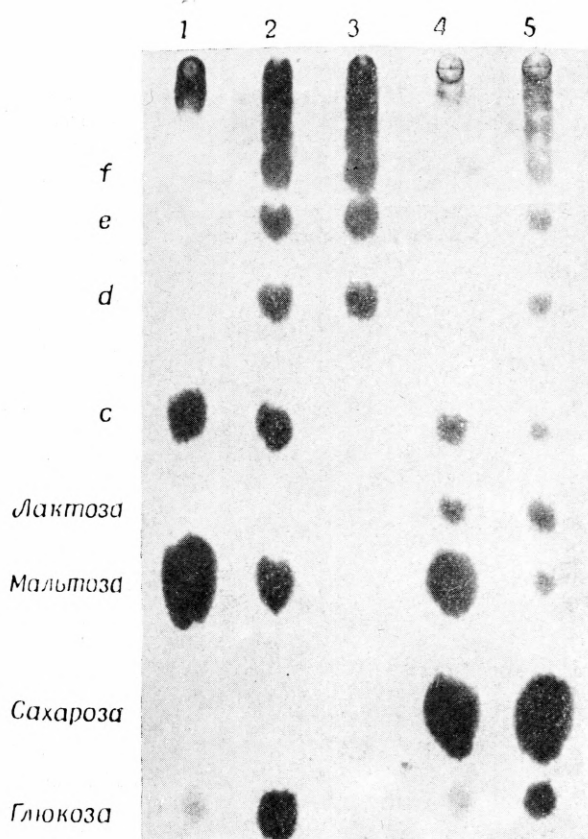
Таблица 20

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНОЙ (ЦИКЛИЧЕСКОЙ) ФОРМЫ НА ВЕЛИЧИНУ  $R_f$   
(по Ишервуду и Джермину)

Сахара	Структурная форма	Границы $R_f$	Главное значение $R_f$
Альдотетрозы . . . . .	Фуранозная	0,41—0,43	0,42
Альдопентозы . . . . .	Пиранозная	0,23—0,33	0,285
Кетопентозы . . . . .	Фуранозная	0,35—0,37	0,36
Альдогексозы . . . . .	Пиранозная	0,175—0,31	0,24
Кетогексозы . . . . .	»	0,24—0,30	0,26
Гептозы . . . . .	»	0,14—0,23	0,18
Гекситолы (сорбит, дульцит, маннит) . . . . .		0,18—0,20	0,19
Альдогексометилозы . . . . .	Пиранозная	0,265—0,48	0,40
Кетогексометилозы . . . . .	Фуранозная	0,43—0,47	0,44
Дисахариды (сахароза, трегалоза, лактоза, целлобиоза, мальтоза) . . . . .		0,07—0,16	0,13
Трисахариды (рафиноза)		0,044	0,044
Метилглюкозиды альдопентоз . . . . .	Пиранозная	0,40—0,48	0,44
	Фуранозная	0,52—0,55	0,54
Метилглюкозиды альдогексоз . . . . .	Пиранозная	0,23—0,37	0,31
	Фуранозная	0,43—0,48	0,46



Р и с. 130. Круговая хроматограмма органических кислот (Гири).  
 Система: *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода в соотношении 10 : 7 : 10. Проявители:  
 бромкрезоловый зеленый (Д 6).  
 Кислоты: *O* — щавелевая кислота; *T* — винная; *C* — лимонная; *M* — яблочная; *M*<sub>1</sub> — малеи-  
 ковая; *M*<sub>2</sub> — малоновая; *S* — янтарная; *F* — фумаровая; *A* — адипиновая.

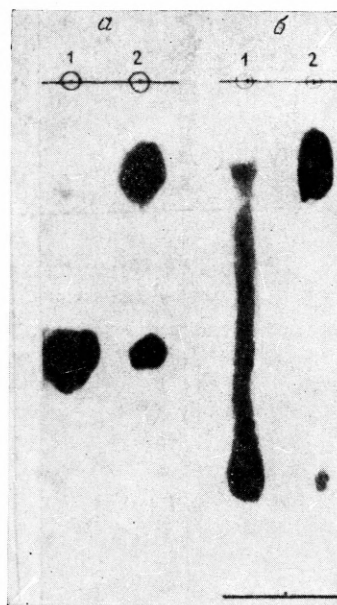


Р и с. 135. Исследование продуктов конверсии крахмала (Бьюкан и Сэвидж).

Система: *n*-пропанол — этилацетат — вода в соотношении 6 : 1 : 3. Проявитель: анилиндибензил-амин — фосфорная кислота (Д 35). 1 — сироп солода; 2 — «жидкая глюкоза» (с — мальтотриоза, d — мальтотетроза, e — мальтопентоза, f — мальтогексоза и т. д.); 3 — «жидкая глюкоза» после сбраживания; 4 — конфеты из солодового сиропа; 5 — конфеты из «жидкой глюкозы».

Р и с. 138. Поведение свободной глюкуроновой кислоты и ее лактона в системах с различными значениями pH (Партридж).

Система: а — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5, б — сим-коллоид, насыщенный водой.

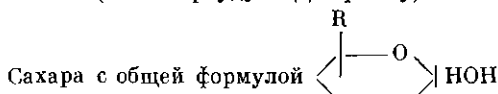


жения регулируется присоединенной группой: замена у альдогексоз группы  $-\text{CH}_2\text{OH}$  на  $-\text{CH}_3$  повышает значение  $R_f$  почти на 50%, удлинение углеродной цепи на группу  $=\text{CHOH}$  снижает  $R_f$  почти на 15%, а замена у альдопентоз атома водорода при  $\text{C}_1$  группой  $-\text{CH}_2\text{OH}$  (возникновение кетогексоз) снижает  $R_f$  почти на 10%. Замена альдегидной группы карбоксильной в нейтральных или кислых системах незначительно снижает величину  $R_f$ . В некоторых системах замена гидроксильной группы аминной группой вызывает увеличение значения  $R_f$ .

У сложных сахаров, кроме величины молекулы (число остатков моносахаридов), еще большее влияние на передвижение по бумаге имеет способ связи. 1,4-Дисахариды передвигаются на бумаге значительно быстрее, чем 1,6-дисахариды. Менее заметное влияние оказывают  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликозидные связи, несмотря на то что Опарину и Бардинской удалось отделить  $\alpha$ -этилфруктозид от  $\beta$ -этилфруктозида. У метилированных сахаров с уве-

Таблица 21

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ЧЛЕНОВ ГОМОМОРФНЫХ ГРУПП <sup>а)</sup>  
(по Ишервуду и Джермину)



Конфигурация циклической части (по Фишеру) <sup>6)</sup>	Альдопентозы (R = — H)	Альдогексозы (R = — CH <sub>2</sub> OH)	Альдогептозы (R = — CHOH — CH <sub>2</sub> OH)																												
<div><div>+</div><div>+</div><div>+</div></div> <div><div>+</div><div>+</div><div>—</div></div> <div><div>+</div><div>—</div><div>—</div></div> <div><div>—</div><div>—</div><div>—</div></div> <div><div>—</div><div>+</div><div>—</div></div> <div><div>—</div><div>+</div><div>—</div></div> <div><div>—</div><div>—</div><div>+</div></div> <div><div>—</div><div>—</div><div>—</div></div> <tr><td>Рибоза 0,33</td><td>Аллоза 0,22</td><td rowspan="10"><div><div>Альтроза 0,27</div><div>Глюкоза 0,195</div><div>Манноза 0,24</div><div>Гулоза 0,23</div><div>Идоза 0,31</div><div>Галактоза 0,175</div><div>Талоза 0,285</div></div></td><td><div><div><i>d</i>-Гала-<i>l</i>-глюкоза 0,16</div><div><i>d</i>-Гала-<i>l</i>-манноза 0,21</div><div><i>d</i>-Глюко-<i>d</i>-гулоза 0,19</div><div><i>d</i>-Гуло-<i>l</i>-галактоза 0,14</div><div><i>d</i>-Манно-<i>d</i>-галактоза 0,15</div><div><i>d</i>-Гуло-<i>l</i>-талоза 0,23</div></div></td></tr> <tr><td>Арабиноза 0,23</td><td></td></tr> <tr><td>Ксилоза 0,28</td><td></td></tr> <tr><td>Ликсоза 0,30</td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><th>Альдометилозы (R = — CH<sub>3</sub>)</th><th>Кетогексозы (H при C<sub>1</sub> = — CH<sub>2</sub>OH)</th><th>Альдогексуроновые кислоты<sup>в)</sup> (R = — COOH)</th></tr> <tr><td><div><div>+</div><div>+</div><div>+</div></div><div><div>+</div><div>+</div><div>—</div></div><div><div>+</div><div>—</div><div>+</div></div><div><div>—</div><div>+</div><div>+</div></div><div><div>+</div><div>—</div><div>—</div></div><div><div>—</div><div>+</div><div>—</div></div><div><div>—</div><div>—</div><div>+</div></div><div><div>—</div><div>—</div><div>—</div></div><tr><td><div><div>Аллометилоза 0,36</div><div>Альтрометилоза 0,45</div><div>Глюкометилоза</div><div>Гулометилоза 0,36</div><div>Маннометилоза 0,38</div><div>Идометилоза 0,51</div><div>Галактометилоза 0,265</div><div>Талометилоза 0,48</div></div></td><td><div><div>Аллюлоза 0,30</div><div>Фруктоза 0,24</div><div>Сорбоза 0,24</div><div>Тагатоза 0,27</div></div></td><td><div><div>Глюкуроновая кислота 0,15</div><div>Маннуоновая кислота 0,18</div><div>Галактуроновая кислота 0,13</div></div></td></tr></td></tr>	Рибоза 0,33	Аллоза 0,22	<div><div>Альтроза 0,27</div><div>Глюкоза 0,195</div><div>Манноза 0,24</div><div>Гулоза 0,23</div><div>Идоза 0,31</div><div>Галактоза 0,175</div><div>Талоза 0,285</div></div>	<div><div><i>d</i>-Гала-<i>l</i>-глюкоза 0,16</div><div><i>d</i>-Гала-<i>l</i>-манноза 0,21</div><div><i>d</i>-Глюко-<i>d</i>-гулоза 0,19</div><div><i>d</i>-Гуло-<i>l</i>-галактоза 0,14</div><div><i>d</i>-Манно-<i>d</i>-галактоза 0,15</div><div><i>d</i>-Гуло-<i>l</i>-талоза 0,23</div></div>	Арабиноза 0,23		Ксилоза 0,28		Ликсоза 0,30																Альдометилозы (R = — CH <sub>3</sub> )	Кетогексозы (H при C <sub>1</sub> = — CH <sub>2</sub> OH)	Альдогексуроновые кислоты <sup>в)</sup> (R = — COOH)	<div><div>+</div><div>+</div><div>+</div></div> <div><div>+</div><div>+</div><div>—</div></div> <div><div>+</div><div>—</div><div>+</div></div> <div><div>—</div><div>+</div><div>+</div></div> <div><div>+</div><div>—</div><div>—</div></div> <div><div>—</div><div>+</div><div>—</div></div> <div><div>—</div><div>—</div><div>+</div></div> <div><div>—</div><div>—</div><div>—</div></div> <tr><td><div><div>Аллометилоза 0,36</div><div>Альтрометилоза 0,45</div><div>Глюкометилоза</div><div>Гулометилоза 0,36</div><div>Маннометилоза 0,38</div><div>Идометилоза 0,51</div><div>Галактометилоза 0,265</div><div>Талометилоза 0,48</div></div></td><td><div><div>Аллюлоза 0,30</div><div>Фруктоза 0,24</div><div>Сорбоза 0,24</div><div>Тагатоза 0,27</div></div></td><td><div><div>Глюкуроновая кислота 0,15</div><div>Маннуоновая кислота 0,18</div><div>Галактуроновая кислота 0,13</div></div></td></tr>	<div><div>Аллометилоза 0,36</div><div>Альтрометилоза 0,45</div><div>Глюкометилоза</div><div>Гулометилоза 0,36</div><div>Маннометилоза 0,38</div><div>Идометилоза 0,51</div><div>Галактометилоза 0,265</div><div>Талометилоза 0,48</div></div>	<div><div>Аллюлоза 0,30</div><div>Фруктоза 0,24</div><div>Сорбоза 0,24</div><div>Тагатоза 0,27</div></div>	<div><div>Глюкуроновая кислота 0,15</div><div>Маннуоновая кислота 0,18</div><div>Галактуроновая кислота 0,13</div></div>
Рибоза 0,33	Аллоза 0,22	<div><div>Альтроза 0,27</div><div>Глюкоза 0,195</div><div>Манноза 0,24</div><div>Гулоза 0,23</div><div>Идоза 0,31</div><div>Галактоза 0,175</div><div>Талоза 0,285</div></div>		<div><div><i>d</i>-Гала-<i>l</i>-глюкоза 0,16</div><div><i>d</i>-Гала-<i>l</i>-манноза 0,21</div><div><i>d</i>-Глюко-<i>d</i>-гулоза 0,19</div><div><i>d</i>-Гуло-<i>l</i>-галактоза 0,14</div><div><i>d</i>-Манно-<i>d</i>-галактоза 0,15</div><div><i>d</i>-Гуло-<i>l</i>-талоза 0,23</div></div>																											
Арабиноза 0,23																															
Ксилоза 0,28																															
Ликсоза 0,30																															
Альдометилозы (R = — CH <sub>3</sub> )	Кетогексозы (H при C <sub>1</sub> = — CH <sub>2</sub> OH)	Альдогексуроновые кислоты <sup>в)</sup> (R = — COOH)																													
<div><div>+</div><div>+</div><div>+</div></div> <div><div>+</div><div>+</div><div>—</div></div> <div><div>+</div><div>—</div><div>+</div></div> <div><div>—</div><div>+</div><div>+</div></div> <div><div>+</div><div>—</div><div>—</div></div> <div><div>—</div><div>+</div><div>—</div></div> <div><div>—</div><div>—</div><div>+</div></div> <div><div>—</div><div>—</div><div>—</div></div> <tr><td><div><div>Аллометилоза 0,36</div><div>Альтрометилоза 0,45</div><div>Глюкометилоза</div><div>Гулометилоза 0,36</div><div>Маннометилоза 0,38</div><div>Идометилоза 0,51</div><div>Галактометилоза 0,265</div><div>Талометилоза 0,48</div></div></td><td><div><div>Аллюлоза 0,30</div><div>Фруктоза 0,24</div><div>Сорбоза 0,24</div><div>Тагатоза 0,27</div></div></td><td><div><div>Глюкуроновая кислота 0,15</div><div>Маннуоновая кислота 0,18</div><div>Галактуроновая кислота 0,13</div></div></td></tr>	<div><div>Аллометилоза 0,36</div><div>Альтрометилоза 0,45</div><div>Глюкометилоза</div><div>Гулометилоза 0,36</div><div>Маннометилоза 0,38</div><div>Идометилоза 0,51</div><div>Галактометилоза 0,265</div><div>Талометилоза 0,48</div></div>	<div><div>Аллюлоза 0,30</div><div>Фруктоза 0,24</div><div>Сорбоза 0,24</div><div>Тагатоза 0,27</div></div>	<div><div>Глюкуроновая кислота 0,15</div><div>Маннуоновая кислота 0,18</div><div>Галактуроновая кислота 0,13</div></div>																												
<div><div>Аллометилоза 0,36</div><div>Альтрометилоза 0,45</div><div>Глюкометилоза</div><div>Гулометилоза 0,36</div><div>Маннометилоза 0,38</div><div>Идометилоза 0,51</div><div>Галактометилоза 0,265</div><div>Талометилоза 0,48</div></div>	<div><div>Аллюлоза 0,30</div><div>Фруктоза 0,24</div><div>Сорбоза 0,24</div><div>Тагатоза 0,27</div></div>	<div><div>Глюкуроновая кислота 0,15</div><div>Маннуоновая кислота 0,18</div><div>Галактуроновая кислота 0,13</div></div>																													

а) Система этилацетат—пиридин—вода в соотношении 2 : 1 : 2.

б) У альдометилоз, альдогексоз, альдопентоз и альдогексуроновых кислот конфигурация при C<sub>5</sub> является  $d$ -конфигурацией.

в) Система этилацетат—уксусная кислота—вода в соотношении 3 : 1 : 3.

личением числа метильных групп снижается гидрофильный характер. Аналогичное влияние имеет ацетилирование. Отсюда следует, что при хроматографировании, например, пентаацетилированных гексоз лучше всего применять гидрофобную ацетилированную бумагу (Михеель и Швеппе).

Весьма важно, что метод хроматографии на бумаге позволяет разделять изомерные сахара, т. е. вещества, отличающиеся друг от друга только пространственным расположением. Согласно первоначальной теории Мартина, эти вещества должны были бы иметь одинаковые значения  $R_f$ . Однако, как это видно из данных табл. 21, величины  $R_f$  для некоторых изомерных сахаров весьма отличны, и пространственное расположение их гидроксильных групп может влиять больше, чем увеличение числа групп  $=\text{СНОН}$ . Решению этой проблемы много времени посвятили Ишервуд и Джермин. Результаты этих исследований позволяют сделать ряд интересных выводов, но окончательного освещения и обобщения полученных результатов до сих пор не было дано. Из работ указанных авторов следовало, что при определенной циклической форме значения  $R_f$  сильно зависят от расположения отдельных гидроксильных групп. Так, например, из сравнения отдельных членов гомоморфных рядов с одинаковой конфигурацией всех гидроксильных групп, где отдельные члены ряда отличались лишь конфигурацией при  $\text{C}_5$ , выяснилось, что порядок расположения отдельных сахаров на хроматограммах в этих рядах является всегда постоянным. Только для альдопентоз и кетогексоз было найдено, что *цис*-конфигурация у углеродных атомов  $\text{C}_2$  и  $\text{C}_3$  способствует увеличению подвижности по сравнению с *транс*-изомерами. Повышенную подвижность можно было бы объяснить образованием водородного мостика у *цис*-производных. Однако в этом случае, очевидно, влияют и другие не известные нам пока факторы. Это вытекает, например, из предварительных работ Вахтмейстера или из основательного исследования Баркера и Смита. Эти авторы пытались сделать некоторые выводы из исследования образования боратных комплексов сахаров: образование таких комплексов должно было бы привести на хроматограмме к снижению значения  $R_f$  по сравнению со значением  $R_f$  в отсутствие борной кислоты. В некоторых случаях у метилированных сахаров при наличии свободных соседних гидроксильных групп в *цис*-положении такого рода снижение значения  $R_f$  действительно имело место. Однако в ряде случаев снижения не наблюдали. Отсюда следует, что на значение  $R_f$  влияют еще и другие факторы, роль которых значительна.

## Методика определения

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБЫ

Для хроматографирования наиболее целесообразно пользоваться 0,1—1%-ным водным раствором соответствующего сахара или смеси сахаров, а еще лучше растворами в 50—80%-ном этиловом спирте. При анализе сахаров из растительного или животного материала приготовление пробы включает три стадии: хранение материала, экстракцию сахаров и, наконец, очистку экстракта от примесей.

Несмотря на относительную устойчивость сахаров, хранение их в биологическом материале сопряжено с опасностью изменений, которые могут

быть вызваны ображиванием сахаров микроорганизмами, попавшими извне, или воздействием различных ферментов, содержащихся в самом материале. Поэтому при длительном хранении анализируемого материала последний целесообразно подвергнуть высушиванию, замораживанию или хотя бы хранению при низкой температуре (в холодильном шкафу). Экстракцию сахаров из биологического материала проводят водой или водным раствором спирта различной концентрации. В этом случае экстракт содержит меньше примесей. Экстракцию проводят при обычной или повышенной температуре. В последнем случае возможно разложение сахаров, в частности при пониженном или повышенном значении pH раствора.

В полученных экстрактах, кроме сахаров, содержатся многие другие вещества гидрофильного характера, в частности белки, полисахариды, органические кислоты и неорганические вещества. В больших концентрациях эти вещества могут заметно снизить качество хроматограммы, а в некоторых случаях сделать невозможным проведение анализа. Высокомолекулярные вещества лучше всего удалять осаждением их 10-кратным количеством этилового спирта. Недостатком этого метода является большое разбавление анализируемого раствора и необходимость сгущения его, а для сахарокислот существует еще опасность их осаждения, так как в биологическом материале эти кислоты содержатся в виде солей, нерастворимых в спирте. Исходя из этого, рекомендуется проводить осаждение белков реактивом Шомодьи (II 30), а также 50%-ным водным раствором трихлоруксусной кислоты или добавлением  $1/10$  объема 30%-ного раствора основного уксуснокислого свинца с последующим удалением свинца в виде сернокислой соли.

Влияние солей на хроматографирование сахаров на бумаге изучали Опеньска-Блаут и сотрудники [1]. Они установили, что нейтральные соли с концентрацией не выше 5% существенного влияния на величину  $R_f$  не оказывают. Наоборот, Баар и Булл [2] доказали, что уже 0,1 *M* раствор некоторых солей может весьма существенно снижать значение  $R_f$  сахаров, в частности при разделении их в кислых и щелочных системах. Поэтому они рекомендуют применять нейтральные системы растворителей, где этого явления не наблюдается. Бейли и сотрудники [2] установили, что при нанесении пробы, содержащей аммониевые соли, и сушке исходного пятна горячим воздухом могут образоваться гликозиламины, способные в щелочных системах исказить результаты анализа.

В настоящее время для удаления из раствора солей или органических кислот чаще всего применяют ионообменные смолы. Из работ Филлипса и Полларда, Халма и Вульфа вытекает, что для обессоливания раствора необходимо пользоваться слабоосновными анионитами, каким является анионит марки амберлит ИРА120 и подобные ему. При применении сильноосновных анионитов (например, амберлит ИРА400 или дауэкс2) происходит весьма значительное расщепление сахаров с образованием органических кислот. Из катионитов можно применить амберлит ИР4Б. Наиболее удобным методом обессоливания сахарного раствора является смешение его со смесью катионита и анионита с последующим отделением ионитов центрифугированием. Недостатком этого метода является невозможность регенерации ионитов. Мальпресс и Моррисон для удаления солей рекомендуют выпаривание раствора насухо с последующей экстракцией сахаров пиридином (II 31). При этом сахара количественно переходят в пиридиновый слой, а неорганические соли остаются. Электролитический метод обессоливания растворов применяют реже, так как при этом наблюдаются значительные потери сахаров.

## ГИДРОЛИЗ

Гидролиз приобретает особо важное значение главным образом при изучении состава полисахаридов и олигосахаридов. Можно применять химический или ферментативный метод гидролиза. В обоих случаях гидролиз осложнен ресинтезом (реверсией) олигосахаридов из образовавшихся моносахаридов и олигосахаридов. Особенно часто ресинтез наблюдается при ферментативном методе гидролиза, чему было посвящено много работ.

### Химический гидролиз

Чаще всего гидролиз проводят серной кислотой. Для полного гидролиза полисахарида обычно применяют раствор 1 н. серной кислоты (II 32). Температура и продолжительность гидролиза изменяются в зависимости от структуры полисахарида. Для частичного гидролиза применяют более низкие концентрации кислоты (обычно 0,5 н.) и нагревание пробы проводят на кипящей водяной бане (без запаивания).

Для некоторых полисахаридов гидролиз серной кислотой оказался недостаточным. В таких случаях, а также для метилированных полисахаридов рекомендуется проводить гидролиз метанольным раствором соляной кислоты (II 45). Небольшие количества олигосахаридов, содержащие, например, в элюате пентен, Гольдшмидт и Буркерт рекомендовали гидролизовать добавлением к элюату капли 0,1 н. соляной или уксусной кислот с последующим выпариванием раствора досуха. Полученный при этом остаток растворяют в капле воды и наносят на бумагу. Дас и сотрудники предпочитают гидролизовать 85 %-ной муравьиной кислотой вместо серной.

Большинство авторов подвергают хроматографированию предварительно нейтрализованные гидролизаты. Однако, как установили Опенска-Блаут и сотрудники [1], а также Гейлорд, 1 н. раствор кислоты не влияет на величину  $R_f$  сахаров и на чувствительность проявления сахаров ароматическими аминами в кислой среде. Следовательно, в этих случаях нейтрализация гидролизатов не обязательна. Это очень важно, в частности, при количественном хроматографическом анализе, так как при нейтрализации наблюдается значительная адсорбция сахаров осажденными солями.

Необходимо, однако, иметь в виду, что гидролиз в кислых растворах приводит к образованию не только моносахаридов, но и олигосахаридов. Реакции реверсии в основном изучали Тейфель и Райс, Мюллер и Тейфель и др. Опарин и Бардинская [2] обнаружили, что при гидролизе сахарозы соляной кислотой в присутствии спирта, так же как и при ферментативном гидролизе, образуются  $\alpha$ -этилфруктозид и небольшое количество  $\beta$ -этилфруктозида. По бумаге оба эти вещества передвигаются быстрее фруктозы. Наконец, Соутар и Гемптон доказали, что уже при нагревании водного раствора рамнозы происходит ее изменение. Однако это явление, не наблюдающееся для других сахаров, приписывают влиянию стекла или бумаги в процессе хроматографирования.

В некоторых случаях весьма оправдал себя гидролиз полисахаридов при помощи катионитов. При этом методе гидролиза часто отпадает проблема нейтрализации гидролизата. Возможность применения катионитов для гидролиза была тщательно изучена Глеггом и Эйдингером, исследовавшими устойчивость моносахаридов при нагревании в течение 2 и 4 дней, а также гидролиз полисахаридов. Применяя пермутит Q в водородной форме, авторы выявили отсутствие изменений альдогексоз и незначи-

тельное изменение метилпентоз. Кетозы и уроновые кислоты на хроматограмме обнаружить не удалось. Исходя из этого, указанный метод применим лишь для гидролиза олигосахаридов и полисахаридов, состоящих из альдогексоз, метилпентоз или пентоз.

### Ферментативный гидролиз

Ввиду специфической способности ферментов к расщеплению связи между определенными моносахаридами ферментативный метод гидролиза часто имеет большое значение для определения строения сахаров. Ферментативный гидролиз можно проводить в растворе или непосредственно на бумаге до и после хроматографического разделения. Весьма пригодным оказалось двумерное хроматографирование олигосахаридов с ферментативным гидролизом их на бумаге после разделения в первом направлении (Бэкон и Эдельман [3]).

Техника гидролиза непосредственно на бумаге описана Бэконом и Эдельманом [3], Уильямсом и Бевеню. Этот метод применим в случае быстрого протекания ферментативной реакции, например при гидролизе инвертазой (II 33). При медленном протекании гидролиза, наблюдающемся при применении мелибиазы или диастаза, этот метод не пригоден. Для таких случаев Портер и Гобан разработали следующую микротехнику. В трубках, применяемых для определения температуры плавления (II 34), ферментативному гидролизу подвергают 20—30  $\mu$ г сахара. По окончании инкубации трубка служит микропипеткой. Продолжительность инкубации для мелибиазы при 37° составляет 72 час, а для диастаза — минимум 168 час. При достаточно большом количестве пробы ферментативный гидролиз сахаров проводят обычным методом инкубации их с соответствующим ферментом в буферном растворе.

В последние годы хроматографию на бумаге весьма часто применяют, с одной стороны, для выявления специфики определенных ферментов к расщеплению тех или иных субстратов, с другой — для решения вопросов строения. При этом были обнаружены интересные явления, например каталитический перенос сахарных остатков ферментами, расщепляющими дисахариды. Это явление впервые наблюдали Бэкон и Эдельман [2], а также Блашар и Олбон при гидролизе сахарозы концентратом инвертазы, полученным из дрожжей. Этими авторами было доказано образование трисахарида, состоящего из одной молекулы глюкозы и двух молекул фруктозы. При ферментативном гидролизе, кроме явлений реверсии и переноса сахарных остатков, Бэкон [1], Опарин и Бардинская [1, 2], прервав метанолом или этанолом гидролиз сахарозы инвертазой, наблюдали образование  $\beta$ -метилфруктофуранозида или  $\beta$ -этилфруктофуранозида, обладавших более высоким значением  $R_f$ , чем фруктоза. Описан ряд аналогичных реакций, на которые следует обратить внимание при исследованиях с применением ферментативного метода гидролиза.

### ВЫБОР БУМАГИ

При хроматографировании сахаров особых требований в отношении выбора типа бумаги не предъявляется, хотя все условия в отношении качества хроматографической бумаги должны быть соблюдены. Для разделения сахаров оказались пригодными следующие бумаги: ватман 1, 2, 3 MM 20, 54, Шлейхер—Шюль 602h: P, 2040b, 2043b, 2045a, 2071; мунктелл Chr 100, ELE/130, Niederschlag Erzgebirge WF 1.

Для быстрого анализа наиболее пригодна бумага типа ватман 54, 31 ЕТ или Шлейхер—Шюль 598 G, 2040a. Продолжительность разделения сахаров путем нисходящей хроматографии на бумаге ватман 31 ЕТ при расстоянии фронта растворителя от линии старта 35 см в системе *n*-бутанол—пиридин—вода в соотношении 6 : 4 : 3 составляет 3,30 час. Разделение в аналогичных условиях на бумаге ватман 1 продолжается 13 час. Для количественного определения *in situ*, где требуется образование концентрированных пятен и гладкая поверхность бумаги, наиболее пригодными, очевидно, являются бумаги Шлейхер—Шюль 2043b MGL, ватман 3 MM или мунктелл ELE/130. Для количественного анализа элюата наиболее пригодна бумага Шлейхер—Шюль 2071. Последняя обладает большой емкостью и дает после хроматографирования концентрированные пятна.

Почти во всех случаях можно пользоваться бумагой без какой-либо очистки или пропитки ее. Исключением является лишь хроматографирование фосфорных эфиров сахаров. В этом случае применяемая бумага должна быть очищена от всех примесей, в частности от тяжелых металлов. Наличие тяжелых металлов в бумаге приводит к дефектам на хроматограмме и затрудняет разделение (см. рис. 79). Тяжелые металлы удаляют из бумаги промыванием ее 2 н. раствором уксусной или 1 н. раствором соляной кислоты с последующей отмывкой бумаги водой до нейтральной реакции. Фирма «Reeve Angel & Co» поставляет бумагу ватман 540, 541, 542, отмытую кислотами. Мортимер рекомендует промывать бумагу раствором 8-оксихинолина. Михеель и Швеппе при разделении высокоацетилированных производных сахаров пользовались ацетилированной бумагой.

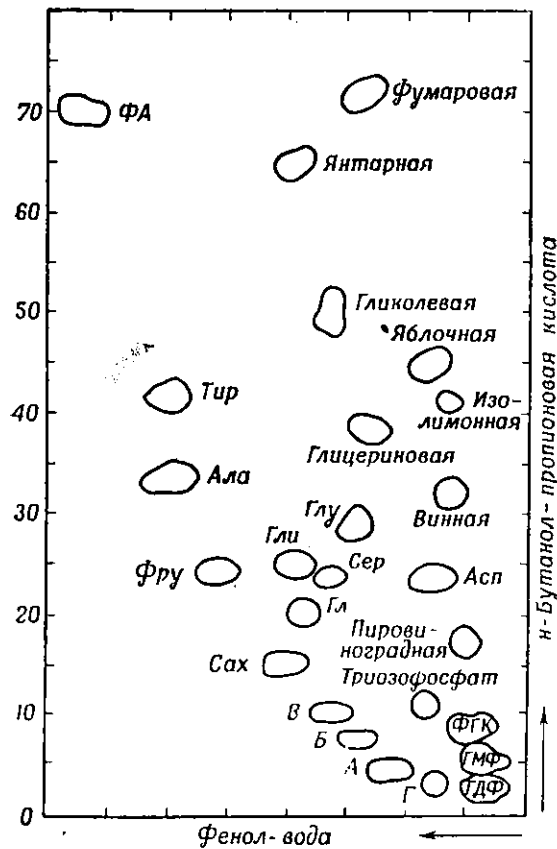
#### ПРИМЕНЯЕМЫЕ КОЛИЧЕСТВА САХАРОВ

Количество анализируемого сахара определяется, с одной стороны, чувствительностью реакции проявления, а с другой — емкостью растворителя и бумаги. Обычно можно рекомендовать нанесение на бумагу сахаров в количестве от 100 до 500 мкг каждого сахара в смеси. Само собою разумеется, что методом хроматографии на бумаге можно обнаружить и 1—5 мкг сахаров, а при анализе сахаров, меченных радиоактивным углеродом, — еще меньшие количества. Максимальное количество сахара, которое может быть подвергнуто хроматографированию, определяется главным образом емкостью бумаги. При использовании обычно применяемой бумаги типа ватман 1 или Шлейхер—Шюль 2043b и нанесении пробы на бумагу в виде точки можно подвергать хроматографированию 15 мг сахаров, обладающих достаточно различными величинами  $R_f$ . При аналогичном нанесении пробы нам удалось на бумаге Шлейхер—Шюль 2071 разделить смесь 200 мг галактозы и ксилозы (см. рис. 40). Это количество сахаров можно было бы еще увеличить при условии нанесения пробы на бумагу в виде полоски и применения круговой хроматографии. Таким путем Гири [1] на бумаге ватман 3 разделил, например, смесь сахаров в количестве от 300 до 500 мг.

Для препаративных целей разделение сахаров можно также проводить на слое целлюлозы. В качестве наиболее пригодного носителя Гирдз и сотрудники рекомендовали гидратцеллюлозу. Последняя обладает большой емкостью и большой способностью к разделению. Гросс и Олбон, определяя наличие рафинозы в пищевом сахаре (сахарозе), делили 20 г смеси на столбике порошкообразной целлюлозы.

## ТЕХНИКА РАЗДЕЛЕНИЯ

Для разделения сахаров чаще всего применяют метод одномерной восходящей, нисходящей и круговой хроматографии. В большинстве обычных систем растворителей при низких величинах  $R_f$  сахаров разделение необходимо проводить с перетеканием или повторно (Джинз и сотрудники). Метод круговой хроматографии, введенный в анализ сахаров Рао



Р и с. 133. Двумерная хроматограмма радиоактивных веществ, встречающихся при исследовании процесса фотосинтеза в присутствии  $C^{14}O_2$  (Бенсон и сотрудники). Системы: I — растворитель — фенол, насыщенный водой; II — растворитель — *n*-бутанол — пропионовая кислота — вода. ФГК — фосфоглицериновая кислота; ГМФ — гекезомснофосфаты; ГДФ — гекезодифосфаты. Г — неидентифицированный компонент, содержащий глюкозу и глюкозофосфат.

и сотрудниками, дает на бумаге узкие полоски, поэтому он оказался весьма пригодным для разделения сложной смеси сахаров. Гири и Нигем [2] повторным круговым разделением в системе *n*-бутанол — ацетон — вода в соотношении 2 : 7 : 1 разделили 11 сахаров. Для олигосахаридов с пятью (или более) сахарными остатками целесообразно применять разделение с перетеканием, которое длится свыше недели; повторное разделение оказалось бы еще более длительным.

Метод двумерного хроматографирования сахаров применяется реже, чем в случае других веществ. Однако им пользуются при разделении неко-

торых смесей фосфорных эфиров или для отделения сахаров от других веществ. Классическим примером двумерной хроматографии служит исследование кинетики фотосинтеза (рис. 133 и рис. 105).

Разделение сахаров в большинстве случаев проводят при обычной температуре. Коунсел и сотрудники, исследовавшие влияние температуры на разделение сахаров и качество хроматограммы, установили, что разделение сахаров при повышенной температуре (37 и 57°) приводит к увеличению величины  $R_f$ , однако отношение величин  $R_f$  двух сахаров при этом снижается, что приводит к ухудшению разделения. Преимущество разделения сахаров при повышенных температурах состоит лишь в образовании на хроматограмме менее концентрированных пятен, что приобретает значение при количественном анализе *in situ*.

## Простые сахара

### ПРОЯВЛЕНИЕ

Универсального проявителя для всей группы сахаров не существует: имеются специфичные проявители для различных типов сахаров. Для проявления простых сахаров и их олигосахаридов, содержащих альдегидную или кетонную группу, используют их восстанавливающие свойства, наличие нескольких  $\alpha$ -диоловых групп или, наконец, легкое превращение сахаров в производные фурфурола, образующие с фенолами или ароматическими аминами окрашенные соединения. В тех случаях, когда разделение двух сахаров не представляется возможным, для уточнения анализа можно использовать различную сбраживаемость этих сахаров на бумаге с последующим проявлением хроматограммы.

Проявление сахаров на хроматограмме чаще всего проводят путем опрыскивания ее соответствующим реактивом; при погружении («протягивании») хроматограммы в водный или спиртовый раствор проявителя возможно растворение сахаров; поэтому указанным приемом проявления пользуются лишь в некоторых специально оговоренных случаях. Для круговой хроматографии Гири и сотрудники рекомендуют нанесение проявителя кисточкой или ватой, намотанной на стеклянную палочку. Этот прием можно было бы применить при секторном проявлении хроматограммы.

В табл. 22 указаны реактивы для проявления сахаров и их чувствительность. Обычно на хроматограмму наносят вещество в десятикратном количестве.

### ОКИСЛЯЮЩИЕ РЕАКТИВЫ

Применение этой группы реактивов для проявления сахаров основано на легкой окисляемости сахаров, содержащих альдегидную и кетольную группы. Преимуществом окисляющих реактивов является их доступность, высокая чувствительность реакции, независимость реакции от значения рН среды, возможность применения для количественного определения сахаров по величине и интенсивности окраски пятен и др. Недостатком является их минимальная (по сравнению с другими реактивами) избирательность.

Таблица 22

## РЕАКЦИИ ПРОЯВЛЕНИЯ САХАРОВ

Реактив	Д	Альдопентозы	Альдогексозы	Кетопентозы	Кетогексозы	Метилпентозы	Невосстанавливающие дисахариды	Восстанавливающие дисахариды	Спирты	Невосстанавливающие кислоты	Кетокислоты и урсновые кислоты	Лактоны кислот	Дезоксисахара	Метилированные альдозы	Метилированные кетозы	Фосфорные эфиры	Аминосахара	Окраска	Чувствительность, из
Азотнокислое серебро . . . . .	4	+	+	+	+	+	—	+	(+)	—	+	—	—	+	+	+	+	ч.	1—5
Хлористый трифенилтетразолий . . . . .	5	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	кр.	1—5
Периодат—бензидин . . . . .	28a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	б. а)	5—10
Периодат — $\text{KMnO}_4$ — бензидин . . . . .	28б	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	син. б)	3—10
Периодат — реактив Римини . . . . .	28г	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	син.	1—5
Резорцин . . . . .	30	+син.	—	+	+кр.	+ж.	+кр. в)	—	—	—	+	—	—	—	+	+ в)	—	—	5—10
Антрац . . . . .	32	—	—	—	+	—	+ в)	+ в)	—	—	—	—	—	—	—	+ в)	—	ж.	10
Кислый фталат анилина . . . . .	34	+кр.	+к.	—	—	+к.	—	+	—	—	+	—	—	+	(+)	+	(+)	г)	2—5
Анилин — дифениламин . . . . .	35	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	5
Молибденовокислый аммоний . . . . .	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	син.	—
Реактив Моргана — Элсона . . . . .	47	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	кр.	—
Нингидрин . . . . .	112	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	ф.	—

а) Синий фон.

б) Белый фон.

в) Реагирует только с веществами, содержащими молекулы кетов.

г) Различная окраска.

Из реактивов этой группы чаще всего применяют аммиачный раствор азотнокислого серебра (Д 4). Последний, восстанавливаясь сахарами до металлического серебра, образует на хроматограмме темно-коричневые пятна на светло-коричневом фоне. Недостатками реактива являются малая избирательность и чувствительность к перегреву (потемнение хроматограммы при высушивании). Поэтому описан ряд модификаций реактива Партриджа [1], из которых приводятся три наиболее часто применяемые. Валленфельс [2] рекомендует опрысканную хроматограмму нагревать при 100° в токе водяного пара. Потемнения бумаги можно избежать путем промывки ее раствором стабилизатора с последующим отмыванием водой. Тревелиан и сотрудники модифицировали реактив, применяемый для проявления методом погружения («протягивания») хроматограммы (Д 46); при этом способе проявления нет необходимости в нагревании хроматограммы, фон ее отмывают водным раствором аммиака, в результате чего хроматограмма приобретает устойчивость к хранению.

При применении указанных модификаций проявления возможно образование на хроматограмме расплывчатых пятен. Во избежание этого Мак-Фаррен и сотрудники при количественном определении сахаров *in situ* добавляют к системе растворителей азотнокислое серебро и по окончании разделения сахаров хроматограмму помещают в атмосферу аммиака, после чего подвергают ее нагреванию до 80°. Чувствительность реакции проявления азотнокислым серебром около 1 мкг.

В настоящее время наиболее широко применяется реактив, предложенный Валленфельсом [1] и одновременно Тревелианом и сотрудниками, — щелочной раствор хлористого трифенилтетразолия (Д 5). Проявление основано на реакции восстановления этого вещества сахарами до трифенилформазана, окрашенного в красный цвет. Чувствительность реактива приблизительно 1 мкг. Еще более чувствителен так называемый тетразолиевый синий, т. е. хлористый 2,2-*n*-(ди-*o*-метокси)-дифенилен-3,3', 5,5'-тетрафенилдитетразолий.

Популярным реактивом, введенным Джинзом и сотрудниками, является также 3,5-динитросалициловая кислота (Д 27). С помощью этого реактива можно обнаружить 1 мкг сахара. Вудворд и Рабидо применяют эту реакцию на сахара после предварительного опрыскивания хроматограммы нингидрином и раствором метилового красного для совместного определения на одной хроматограмме аминокислот, органических кислот и сахаров. Из других реактивов этой группы следует отметить 3,4-динитробензойную кислоту, примененную Вейгандом и Гофманом, и щелочной раствор марганцевокислого калия (Д 36).

#### РЕАКТИВЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С $\alpha$ -ДИОЛАМИ

Преимуществом этих реактивов является их способность взаимодействовать со всеми сахаристыми веществами. Однако они не являются избирательными реактивами на сахара, так как реагируют также с несахаристыми  $\alpha$ -диолами. Нижеприведенные реактивы можно с успехом применить для ориентировочного определения наличия в анализируемых пробах веществ с  $\alpha$ -диоловой конфигурацией или для проявления невосстанавливающих сахаров. Для дальнейшей характеристики и идентификации восстанавливающих сахаров рекомендуется применять реактивы, приведенные в следующем разделе.

Из реактивов этой группы наибольшее значение имеют предложенные Бьюкененом и сотрудниками периодат натрия и тетраацетат свинца. Реакция периодата натрия основана на окислении сахаров в альдегиды с последующим определением их реактивом Шиффа (Д 28а). Цифонелли и Смит проводят опрыскивание хроматограммы периодатом, а затем бензидином; при этом периодат на месте пятна восстанавливается сахаром в йодат, а после опрыскивания хроматограммы бензидином последний окисляется вокруг пятна периодатом в бензидиновую синь; на месте пятна такого окисления не происходит. В результате приведенных реакций сахара на хроматограмме идентифицируются в виде белых пятен на синем фоне. Чувствительность этой реакции колеблется в пределах 2—8 мкг. Лемье и Бауэр [2] рекомендуют опрыскивать хроматограмму растворами периодата натрия и марганцевокислого калия. В этом случае после отмывания избытка реактивов идентифицируют сахара в виде коричневых пятен двуокиси марганца. Вулфром и Миллер усовершенствовали описанный метод. Эти авторы образовавшиеся пятна двуокиси марганца проявляют опрыскиванием хроматограммы раствором бензидина (Д 28б); последний окисляется в бензидиновую синь, в результате чего возникают устойчивые синие пятна на белом или светло-коричневом фоне. Чувствительность этой реакции меньше 5 мкг.

При реакции с тетраацетатом свинца (Д 21) вещества с  $\alpha$ -диоксиконфигурацией восстанавливают  $Pb^{IV}$  в  $Pb^{II}$ ; избыток неустойчивого тетраацетата свинца гидролизует в двуокись свинца коричневого цвета, в результате чего возникают белые пятна на коричневом фоне. Чувствительность реакции приблизительно 10 мкг.

Изящным, но, к сожалению, мало чувствительным является способ проявления  $\alpha$ -диолов по Бредфилду и Флуду. При этом способе используется образование комплексов борной кислоты с многоатомными спиртами. Борная кислота как слабо диссоциированная ( $K=6,4 \cdot 10^{-10}$ ) не изменяет окраски кислотно-основных индикаторов. Однако в комплексе с многоатомными спиртами она ведет себя как среднedisсоциированная кислота, обнаруживаемая кислотно-основными индикаторами. При опрыскивании хроматограммы смесью борной кислоты и соответствующего индикатора, например бромкрезолового синего (Д 29), сахара обнаруживают в виде желтых пятен на синем фоне. Чувствительность этой реакции приблизительно 50 мкг. При этом способе проявления не наблюдается расщепления сахаров, и в случае необходимости их можно использовать для дальнейших операций (см., например, стр. 277).

Аналогичный способ применил Хокенхал. По этому способу бумагу пропитывают буферным боратным раствором с pH 9,2 и проявляют хроматограмму фенолфталеином или феноловым красным. Сахара при этом образуют белые пятна на красном фоне.

#### РЕАКТИВЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С ПРОИЗВОДНЫМИ ФУРФУРОЛА

Специфическими реактивами для проявления восстанавливающих сахаров являются вещества, взаимодействующие с фурфуролом и его производными (фурфурольная проба). Все кетозы или альдозы, содержащие 5 и более атомов углерода, при нагревании с сильными кислотами образуют фурфурол или его производные. Последние легко определить по цветной реакции с фенолами или аминами. Тип образовавшегося производного

фурфурола и его количество зависит от исходного сахара. Пентозы и кетогексозы быстро реагируют с фенолами, в то время как альдогексозы, дающие незначительные количества производных фурфурола, обычно с фенолами не взаимодействуют. Для определения альдогексоз пользуются их реакцией с аминами. Этим способом отличают альдозы от кетоз.

### Фенольные реактивы

Форсайт ввел в хроматографию на бумаге метод проявления, основанный на образовании из восстанавливающих сахаров производных фурфурола с последующим определением их цветной реакцией с фенолами. Вначале применяли фенол с соляной кислотой. Затем последняя была заменена трихлоруксусной (Партридж [2]) или фосфорной кислотой (Ваврух [1], Де-Велли [1]). Эти кислоты оказались более пригодными, так как они не разрушают бумагу. Из фенолов наиболее подходящими оказались резорцин или нафторезорцин (*Д 30*) и  $\alpha$ -нафтол (*Д 31*). Клевстранд и Нордал для отличия кетогексоз от кетогептоз рекомендовали применять орцин (*Д 74*). Кетогексозы с орцином дают желтое окрашивание, а кетогептозы — синее. Иогансон рекомендовал для проявления антрон, являющийся при соблюдении точных условий специфическим реактивом на кетозы (*Д 32*).

Чувствительность приведенных реактивов колеблется в пределах от 5 до 20 мкг. Пентозы и альдогексозы с этими реактивами не взаимодействуют или взаимодействуют весьма слабо. Партридж [2] установил, однако, что пентозы могут взаимодействовать с фенольными реактивами при нагревании опрысканной хроматограммы во влажной атмосфере. Поэтому реактивы, содержащие фосфорную кислоту, удерживающую бумагу во влажном состоянии, хорошо реагируют и с пентозами. Из олигосахаридов, содержащих кетозы, реагируют те из них, которые в условиях проявления подвергаются гидролизу. Поскольку большинство приведенных реактивов применяется в виде спиртовых растворов, проявление ими хроматограмм методом погружения не представляется возможным. Харрис и Мак-Вильям разработали инструкцию о применении нафторезорцина для проявления хроматограмм методом погружения («протягивания») (*Д 30*).

### Реактивы, содержащие амины

Подобно тому как фенолы в определенных условиях являются специфическими реактивами для кетоз, так некоторые ароматические амины могут оказаться специфическими для альдоз. Этот тип реактивов был введен в хроматографию на бумаге Чаргаффом и сотрудниками, причем они применяли *m*-фенилендиамин (*Д 33*) для проявления альдоз. При помощи этого реактива можно в ультрафиолетовом свете обнаружить и кетозы, хотя они реагируют слабее альдоз. Наиболее часто применяемым реактивом для проявления альдоз является кислый фталат анилина (Партридж [3]) (*Д 34*). Он более чувствителен, чем ранее предложенный кислый оксалат анилина. Чувствительность кислого фталата анилина особенно высока при наблюдении флуоресценции пятен в ультрафиолетовом свете; в этом случае им можно обнаружить даже микрограммовые количества альдоз. Кетозы и олигосахариды с кислым фталатом анилина взаимодействуют слабо. Кетозы реагируют при условии применения для разделения щелочных систем растворителей. Ишервуд и Джермин объясняют это явление возможной эпимеризацией, которую в таких случаях можно избежать путем полного высушивания хроматограммы на холоду перед проявлением. Реакция

сахаров с кислым фталатом анилина зависит от температуры нагревания (высушивания) хроматограммы. Как установил Азо и сотрудники, каждому сахару соответствует своя оптимальная температура нагревания хроматограммы. Чаще всего нагревают до 105°; при проявлении, например, сахарозы оптимальная температура нагревания составляет 130°. При хроматографировании сахаров применение кислого фталата анилина в качестве проявителя дает возможность отличить альдопентозы от альдогексоз. В этом его большое преимущество. Альдогексозы и метилпентозы дают с ним пятна коричневого цвета, а альдопентозы — красного.

Кроме кислого фталата анилина, в качестве проявителя сахаров можно рекомендовать предложенный Буханом и Сэвиджем реактив, содержащий анилин, дифениламин и фосфорную кислоту (Д 35) и взаимодействующий с альдозами и кетозами (чувствительность до 5 мкг); указанный реактив с сахарами дает пятна различной окраски, что используется для дифференциации сахаров. По данным Гири и сотрудников [4], с помощью этого реактива можно определить и вид связи сахаров. Так, например, мальтоза дает с ним пятна синего цвета, а изомальтоза — желто-коричневого. Однако, поскольку окраска пятен зависит также от температуры нагревания и типа применяемой для хроматографирования бумаги, сравнивают окраску пятен испытуемого и стандартного сахара.

Так как большинство ароматических аминов взаимодействует с альдозами, а фенолы — с кетозами, то Вигиано-Вамос и Хирасе с сотрудниками применили для проявления реактивы, содержащие обе характерные группы, например *n*-аминофенол или *o*-аминофенол (Д 36), с которыми альдозы и кетозы реагируют с чувствительностью 1—5 мкг. Бояркин для проявления сахаров пользовался смесью салициловой кислоты и *o*-толуидина.

По литературным данным из других аминов для проявления сахаров пригодны *n*-аминодиметиланилин, предложенный Богсом и сотрудниками. бензидин, введенный Хорроксом, *n*-аминогиппуровая кислота (Д 37), описанная Заттлером и Цербаном [1], и *n*-анизидин, примененный Хафом и сотрудниками [1].

Амины с нафталиновым ядром не являются специфическими реактивами для проявления альдоз. Так, описанный Новелли β-нафтиламин с соляной кислотой или примененный Айраном и Десаи диметил-α-нафтиламин взаимодействуют как с альдозами, так и с кетозами. Специфическим реактивом на кетозы является примененный Гири и Нигемом [3] α-нафтиламин (Д 38). Из алифатических аминов Дедонде рекомендовал мочевины для кетоз и их олигосахаридов (Д 39).

### ПРОЯВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАМИ

Сложность хроматографического разделения некоторых гексоз побудила Лейтгардта и Вольфа использовать для идентификации сахаров способность некоторых из них к сбраживанию. Так, например, хроматографически трудно отделить фруктозу от сорбозы или глюкозу от галактозы. В таких случаях испытуемый раствор параллельно хроматографируют на двух полосках бумаги, одну из которых после разделения проявляют химическим путем, а вторую опрыскивают суспензией дрожжей (Д 40) и инкубируют во влажной атмосфере. Спустя определенное время, хроматограмму высушивают и проявляют. При этом на хроматограмме проявляются только несброженные сахара (например, сорбоза или галактоза).

## ОТЛИЧИЕ АЛЬДОГЕКСОЗ ОТ МЕТИЛПЕНТОЗ

Метилпентозы (гексометиллозы) дают на хроматограмме все реакции альдогексоз. При проявлении хроматограммы ароматическими аминами метилпентозы можно отличить от альдогексоз по окраске пятен и особенно по флуоресценции пятен в ультрафиолетовом свете. Как правило, величины  $R_f$  для метилпентоз более высоки, чем для альдогексоз. Вальдрон для более достоверной идентификации метилпентоз в присутствии альдогексоз применил окисление их йодной кислотой. Последняя окисляет метилпентозы в муравьиную кислоту и ацетальдегид, а альдогексозы — в муравьиную кислоту и формальдегид. Образовавшийся ацетальдегид определяют реакцией Римины с нитропруссидом натрия и вторичным амином (Д 282). Следует иметь в виду, что аналогичную реакцию дают и дезоксиуглеводы и гликали, для отличия которых Эдвард и Вальдрон разработали ряд реакций проявления (см. стр. 282).

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Как уже было отмечено в теоретической части (стр. 254), сахара хорошо растворимы в воде и низших спиртах и практически нерастворимы в растворителях среднегидрофильного или гидрофобного характера. Джермин и Ишервуд установили, что подвижность сахаров на бумаге зависит от молярной доли воды в применяемом органическом растворителе. Это ясно из данных табл. 19. Однако при хроматографии на бумаге наиболее важным является отношение значений  $R_f$  веществ, так как от этого зависит возможность их разделения. Из отношения величин  $R_f$ , например, рамнозы и ксилозы или глюкозы следует, что максимум этого отношения достигается при определенной величине молярной доли воды. Этот максимум находится при содержании воды 0,45 и при величинах  $R_f$  порядка 0,2; отсюда вытекает необходимость применения растворителей, в которых  $R_f$  для обычных сахаров составляет около 0,2, а также разделения сахаров с перетеканием или многократного хроматографирования.

Таблица 23

РАССТОЯНИЕ ЦЕНТРА ПЯТЕН САХАРОВ ОТ ЛИНИИ СТАРТА ПОСЛЕ РАЗДЕЛЕНИЯ  
В ТЕЧЕНИЕ СУТОК ПРИ 20°  
(по Джермину и Ишервуду)

Растворитель	Вязкость ( $\eta$ ), сантимпуаз	Скорость фронта раствори- теля, см/час	Расстояние, см			
			фронт	рамноза	ксилоза	глюкоза
Метилацетат . . . . .	0,38	12	288	21,6	11,5	0,0
Этилацетат . . . . .	0,45	10	240	2,4	0,0	0,0
Метилэтилкетон . . . . .	0,43	10,8	258	25,5	12,9	6,4
Вода . . . . .	1,0	3,75	—	—	—	—
Изомасляная кислота . . . . .	1,3	2,25	54	27,5	23,7	19,9
n-Бутанол . . . . .	3,0	2,6	62	13,6	7,8	4,4
2-Бутанол . . . . .	3,7	2,6	62	25,6	19,2	16,4
трет-Амиловый спирт . . . . .	4,7	1,25	30	9,6	7,3	4,3
Бензиловый спирт . . . . .	5,8	1,6	38,4	4,2	2,3	1,1
Фенол . . . . .	11,7	1,5	36	21,2	15,8	14,1
m-Крезол . . . . .	20,2	1,1	26,5	7,1	4,0	1,8
Циклогексанол . . . . .	68,0	0,65	15,6	2,3	0,9	0,4

Из данных, приведенных в табл. 23, видно, что наиболее пригодные растворители (с точки зрения содержания в них оптимального количества воды), какими являются циклогексанол, *m*-крезол или бензиловый спирт, отличаются большой вязкостью, в результате чего время разделения значительно увеличивается. Исходя из этого, Джермин и Ишервуд применили растворители с низкой вязкостью (например, этилацетат), а для увеличения растворимости воды и, следовательно, сахаров добавляли к ним третий компонент, растворимый в воде и в растворителе. Такими веществами являются низшие жирные кислоты (муравьиная, уксусная), органические основания (пиридин) или низшие алифатические спирты (метанол, этанол).

Приведенные теоретические положения необходимо учитывать при выборе системы растворителей. Необходимо также иметь в виду, что в этилацетатных системах, содержащих сильную органическую кислоту, возможен гидролиз этилацетата; наоборот, в бутанольных системах, содержащих муравьиную или уксусную кислоту, возможна этерификация и, следовательно, снижение содержания воды в подвижной фазе. При применении щелочных систем растворителей может наблюдаться (главным образом при высушивании хроматограммы) эпимеризация.

В литературе описано весьма много комбинаций двух- и трехкомпонентных систем. Здесь приводятся лишь основные типы систем, оказавшихся наиболее пригодными; изменять эти системы можно в соответствии с принципами, приведенными на стр. 112.

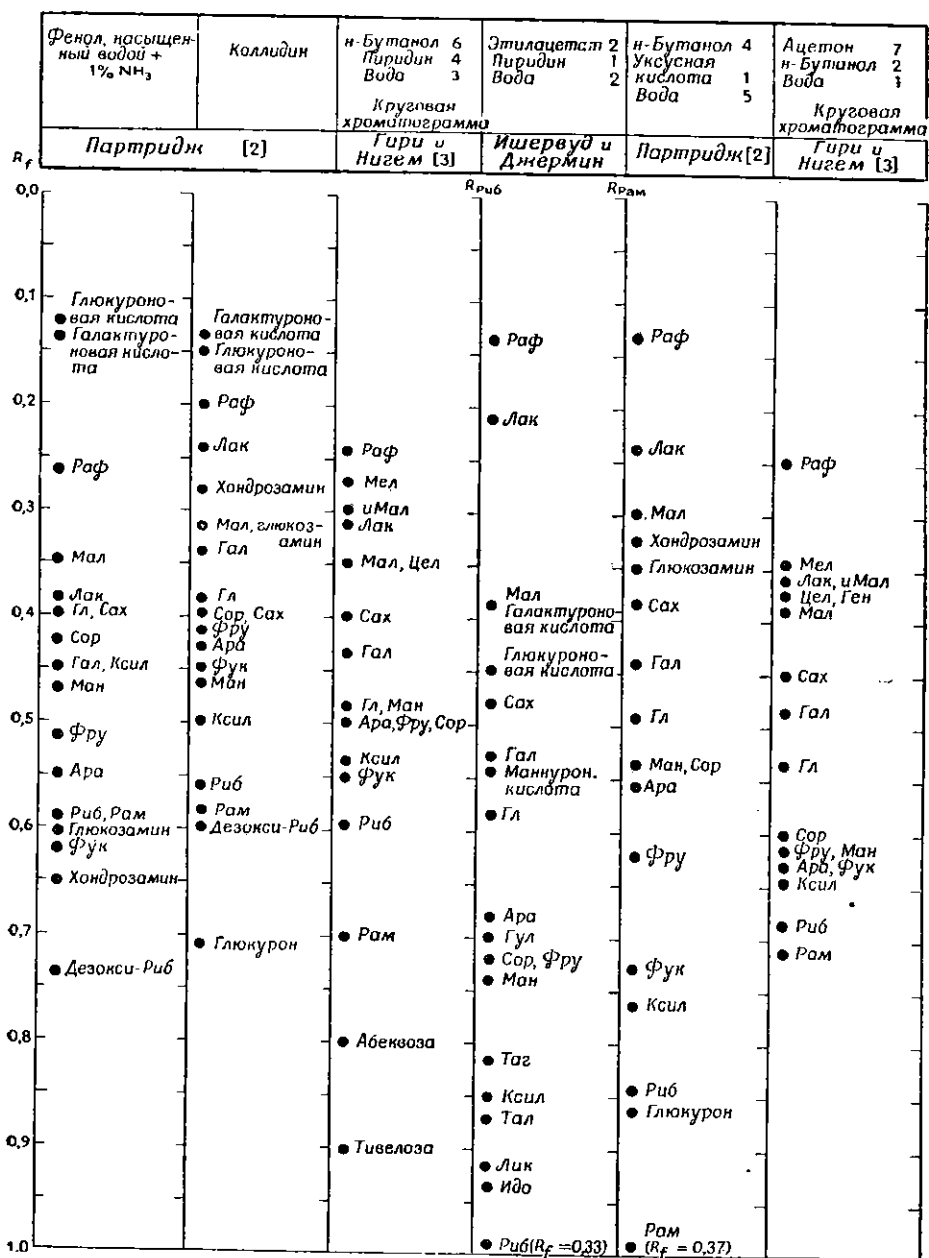
Из двухкомпонентных систем чаще всего применяют фенол, насыщенный водой или содержащий 15% воды. Для связывания содержащихся в бумаге металлов в камеру добавляют небольшие количества аммиака или муравьиной кислоты, а иногда и цианистого калия. Кроме фенола, применяют насыщенный водой коллидин.

Из трехкомпонентных систем наиболее применимы смеси Партриджа: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5, *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода в соотношении 12 : 1 : 1 (после выдерживания в течение 1 час к смеси добавляют 6 ч. воды; отделение слоев производят через 24 час) или этилацетат — уксусная кислота — вода в соотношении 3 : 1 : 3. Рачинский и сотрудники применяют смесь *n*-бутанол — масляная кислота — вода в соотношении 1 : 1 : 1. Из щелочных систем наиболее пригодным оказался растворитель *n*-бутанол — пиридин — вода в соотношении 6 : 4 : 3, рекомендуемый также для разделения олигосахаридов, или система этилацетат — пиридин — вода в соотношении 2 : 1 : 2. Для круговой хроматографии и для ускорения разделения сахаров к приведенным системам добавляют ацетон; например, пригодна система *n*-бутанол — ацетон — вода в соотношении 2 : 7 : 1 (рис. 134).

Во избежание возможной этерификации *n*-бутанола в кислых системах некоторые авторы (Йосидзава, Масамунэ и Маки [1]) заменяют его на бутилацетат, а растворимость воды увеличивают добавлением спирта. Разделение олигосахаридов в системе пропанол — этилацетат — вода показано на рис. 135.

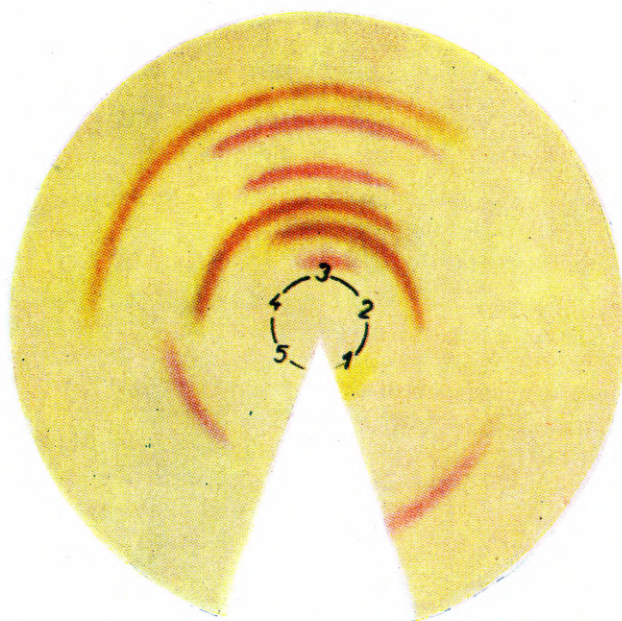
Для двумерной хроматографии смеси сахаров с фосфорными эфирами, аминокислотами и органическими кислотами при исследовании кинетики фотосинтеза Бенсон и сотрудники применяют в качестве первого растворителя фенол, насыщенный водой, а в качестве второго — смесь *n*-бутанол — пропионовая кислота — вода (*n*-бутанол — вода 1246 : 84 и пропионовая кислота — вода 620 : 730; оба раствора перед применением смешивают в соотношении 1 : 1) (см. рис. 133). Для двумерного хромато-

Таблица 24

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АЛЬДОЗ И КЕТОЗ

графирования смесей чистых сахаров наиболее пригоден метод Гамермана и сотрудников. Эти авторы дважды проводят разделение в системе *н*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3), а затем используют фенол, насыщенный водой.

В заключение этого раздела приводим рекомендуемые системы для разделения смесей из двух и трех сахаров с близкими величинами  $R_f$ .



Р и с. 134. Круговая хроматограмма сахаров (Мацек).

Система: *n*-бутанол — ацетон — вода в соотношении 2 : 7 : 1, разделение проведено с перетеканием.  
 Проявитель: кислый фталат анилина (Д34).  
 Зоны от середины к краю: 1 — мальтоза и рибоза; 2 — галактоза; 3 — мальтоза, галактоза, глюкоза, арабиноза, рибоза, рамноза; 4 — глюкоза и рамноза; 5 — арабиноза.

Глюкоза — галактоза: *n*-бутанол — пиридин — вода в соотношении 6 : 4 : 3; проявление ферментативным методом.

Фруктоза — сорбоза: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5; проявление ферментативным методом.

Глюкоза — сахароза — фруктоза: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5 или этилацетат — пиридин — вода в соотношении 2 : 1 : 2.

Ксилоза — арабиноза — фукоза: фенол, насыщенный водой.

Манноза — фруктоза: фенол, насыщенный водой.

*d*-Аллюлоза — фруктоза: этилацетат — пиридин — вода в соотношении 2 : 1 : 2 (по Цербану с сотрудниками).

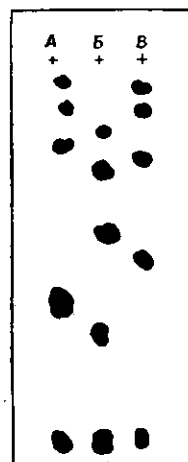
Олигосахариды, содержащие до 14 моносахаридных остатков: *n*-бутанол — пиридин — вода в соотношении 6 : 4 : 3.

Величины  $R_f$  наиболее часто встречающихся сахаров в наиболее приемлемых системах растворителей приведены в табл. 24.

### ОБРАЗОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ

Разделение сахаров можно также проводить после превращения их в некоторые производные. Штоль и Рюэггер разделяли сахара после превращения их в соответствующие *n*-нитрофенилгидразоны. При этом методе исследуемые сахара разделялись на несколько групп, которые нельзя было разделить дальше. Надо полагать, что для качественного анализа сахаров этот метод не дает никаких преимуществ.

Более широкое распространение получил метод Бэйли и Боурна [1]. Эти авторы переводили олигосахариды непосредственно на бумаге в соответствующие *N*-бензилглюкозиламины (II 35). Этим методом благодаря более слабой адсорбции таких веществ целлюлозой



Р и с. 136. *N*-Бензилглюкозиламины гомологического ряда олигосахаридов (Бейли и Боурн).

Система: *n*-бутанол — этанол — вода — аммиак в соотношении 40 : 10 : 49 : 1.

Проявитель: нингидрин.

А — глюкоза и олигосахариды со связью 1—4а; Б — со связью 1—3β; В — со связью 1—6а.

представляется возможным сравнительно быстро проанализировать олигосахариды. При применении системы *n*-бутанол — этанол — вода — аммиак в соотношении 40 : 10 : 49 : 1 можно разделить глюкозосодержащие олигосахариды со связью 1—4а, 1—3β, 1—6 а (рис. 136).

Преимущество этого метода по сравнению с методами непосредственного определения сахаров (без перевода в производные) состоит в сокращении времени анализа, так как при этом нет необходимости в повторном хроматографировании или разделении с перетеканием. Поскольку образовавшиеся *N*-бензилглюкозиламины проявляют нингидрином (II 112), то приведенный метод является достаточно чувствительным. Однако он неприменим для анализа олигосахаридов, состоящих из фруктозных остатков. Еще большей чувствительности метода Бэйли и Боурна [1] можно

достигнуть при хроматографировании олигосахаридов после реакции их с N-(1-нафтил)-этилендиамином по способу Уодмана и сотрудников. Полученные производные флуоресцируют в ультрафиолетовом свете, и чувствительность, по данным авторов, составляет 0,05 мкг. Этот метод применяют в тех же случаях, что и метод с N-бензилглюкозиламином. Авторы указывают на его преимущество при проявлении незначительных количеств сахаров, например в первой фазе ферментативного гидролиза.

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Значительным прогрессом в химии сахаров явилась разработка количественного определения их методом хроматографии на бумаге. Этот метод является незаменимым при количественном анализе смеси более трех сахаров или при определении малых количеств сахаров. Ваннер, сравнивая классические методы определения сахаров с хроматографическими, указывает, что погрешность определения при использовании некоторых классических методов достигает 200%.

Количественные методы анализа сахаров группируют в зависимости от способа определения: непосредственно на бумаге (т. е. *in situ*) или в элюате пятна, вырезанного из хроматограммы. Первые методы более быстры, вторые более точны. При количественном анализе сахаров для получения точных результатов необходимо соблюдать все условия количественной хроматографии на бумаге (стр. 180). В тех случаях, где требуется определить небольшие количества одного сахара в присутствии большого количества другого, Гросс и Олбон рекомендуют разделять их на столбике порошкообразной целлюлозы с последующим колориметрическим определением.

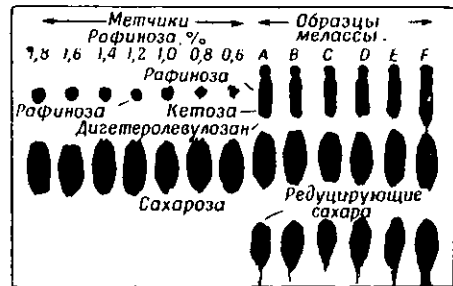
## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ *IN SITU*

Методы количественного определения сахаров непосредственно на бумаге основаны на линейном соотношении между величиной пятна и логарифмом концентрации веществ (Фишер и сотрудники) и на зависимости интенсивности окраски пятен от концентрации сахара (см. стр. 182). Все эти методы являются быстрыми, но точность их колеблется в пределах  $\pm 5-10\%$ . Они, следовательно, пригодны для ориентировочных анализов или для определения двух сахаров с такими близкими значениями  $R_f$ , что при элюции их из бумаги не исключена возможность смешения пятен; в этом случае точность определения после элюции оказалась бы ниже, чем при методе *in situ*. Классическим примером применения метода *in situ* является количественное определение глюкозы и галактозы в их смеси.

Наиболее просто концентрацию сахаров определяют по длине пятен или (точнее) путем сравнения величины и интенсивности окраски пятен испытуемого раствора с величиной и интенсивностью окраски пятен стандартных растворов. Для получения воспроизводимых результатов необходимо, чтобы площадь наносимых пятен стандартных и испытуемых растворов была одинаковой, а проявление хроматограммы следует проводить при постоянной температуре. Олбон и Гросс рекомендуют нагревать хроматограмму в специально предложенной ими сушилке, позволяющей поддерживать температуру в пределах  $\pm 1^\circ$ . Приведенный метод был применен, в частности, в сахарном производстве для определения содержания рафинозы в сахаре-сырце. В этом случае он оказался значительно

более точным, чем классические методы анализа. Определение этим методом рафинозы в мелассе встречается ряд затруднений ввиду наличия в ней красящих веществ, кетозы и дигетеролевулозана. Исходя из этого, Де-Велли [2] рекомендует подвергать мелассу предварительному гидролизу инвертазой. При этом кетоза и сахароза расщепляются на фруктозу и глюкозу, а рафиноза — на мелибиозу и фруктозу. Количество образовавшейся мелибиозы определяют путем сравнения со стандартной шкалой (рис. 137).

Методы субъективной оценки пятен *in situ* дают большую погрешность, поэтому некоторые авторы пользуются объективными методами определения. Последние основаны на фотометрическом измерении интенсивности света, пропущенного пятном (бумагой), или на измерении степени отражения света окрашенным пятном. Первый способ разработан Мак-Фарреном и сотрудниками. Эти авторы на проявленной азотнокислым серебром хроматограмме фотометрически измеряли интенсивность окраски центра



Р и с. 137. Определение рафинозы в мелассе (Де-Велли).

Система: *n*-пропанол — ацетат — вода. Проявитель:  $\alpha$ -нафтол (вверху), сульфит диатил-*n*-фенилендиамина (внизу). Определение рафинозы в мелассе осложнено наличием в ней кетозы и различных красящих веществ, поэтому целесообразно анализировать раствор, подвергшийся предварительному воздействию инвертазы. Последняя расщепляет кетозу и сахарозу в редуцирующие сахара, а рафинозу — во фруктозу и мелибиозу. Количественную оценку пятен мелибиозы на хроматограмме проводят путем сравнения с метчиком, содержащим обработанную инвертазой рафинозу и соответствующее количество хлористого калия.



пятен. Погрешность такого определения, например при анализе глюкозы и галактозы, составила  $\pm 5\%$ . Преимущество метода — возможность определения микрограммовых количеств сахаров. Густавсон и сотрудники фотографируют проявленную хроматограмму на пленку с последующей фотометрической оценкой. Аналогичным является метод Килгора и Датона. Эти авторы фотографируют хроматограмму в ультрафиолетовом свете, который поглощается сахарами, проявленными фенольными реактивами или ароматическими аминами. Для этого проявленную хроматограмму накладывают на эмульсию фотографической бумаги и облучают ее ультрафиолетовой лампой на расстоянии 30 см (1—2 сек). Затем фотобумагу обычным методом проявляют и проводят количественную оценку. Весьма точным является метод Валленфельса и сотр. [3], состоящий в том, что проявленную азотнокислым серебром хроматограмму пропитывают прозрачным маслом и путем прерывного передвижения бумаги фотометрически измеряют через щель пропускную способность; площадь измеряют планиметром. Оптимальные концентрации сахаров для количественного анализа: моносахариды 2—25  $\mu\text{г}$ , дисахариды 5—15  $\mu\text{г}$  и трисахариды 10—100  $\mu\text{г}$ .

Мак-Креди и Мак-Комб [1] рекомендовали фотометрический метод определения сахаров, основанный на отражении света окрашенными пят-

нами. При использовании этого метода и при проявлении сахаров анилином с трихлоруксусной кислотой авторы установили линейную зависимость измеренных величин от логарифма концентрации сахара.

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ САХАРОВ В ЭЛЮАТЕ

Методы определения сахаров в элюате являются в большинстве случаев более точными и применяются, в частности, при исследованиях структуры полисахаридов. Эти методы более длительны, и для серийных анализов ими не пользуются. Только отдельные модификации их, при которых образовавшееся при проявлении красящее вещество элюируется непосредственно из бумаги, приемлемы и с точки зрения продолжительности анализа.

Для этих методов весьма важным является экстракция сахаров из бумаги. Для этой цели предложен ряд способов. Рекомендуется проводить экстракцию холодной водой способом, применяемым при хроматографическом разделении, или помещать бумагу с пятнами сахаров между двумя стеклышками и промывать ее водой (см. стр. 178). Проводить экстракцию при кипячении или повышенной температуре ввиду возможного разложения сахаров не рекомендуется.

Методы определения сахаров в элюате в зависимости от способа делят на две группы: методы титрования и колориметрические методы. Методы титрования более трудоемки, но они в известной степени точнее.

#### Методы титрования

Количественный анализ сахаров был разработан Флудом и сотрудниками [1] и независимо от них Хоторном. Флуд и сотрудники [1] определяли сахара в элюате реактивом Шомодьи; для анализа брали от 0,05 до 5 мг, т. е. в тысячу раз меньше, чем при классических методах анализа. При этом погрешность определения составила  $\pm 2\%$ . Хоторн определял сахара в элюате путем окисления их периодатом.

Из методов этой группы наиболее пригодным может оказаться разработанный позже метод Гирста и Джонса [2], основанный на окислении сахаров периодатом натрия с последующим ацидиметрическим определением образовавшейся при этом муравьиной кислоты (II 36). Количество образовавшейся при окислении муравьиной кислоты зависит от характера анализируемого сахара: альдогексозы дают 5 молекул муравьиной кислоты, пентозы и метилпентозы — 4 молекулы, а кетогексозы — 3 молекулы. Так как при окислении одной молекулы сахара образуется большее количество молекул титруемой муравьиной кислоты, то приведенный метод отличается большей чувствительностью и точностью по сравнению с методами, основанными на определении альдегидной или кетонной групп.

Этим методом можно также определить гексуроновые кислоты (5 молекул муравьиной кислоты) и гексозамины (также 5 молекул). При окислении частично метилированных сахаров количество образующейся муравьиной кислоты зависит от степени метилирования сахара.

Для определения сахаров в количествах от 2 до 40 мг применяют метод Гарднера [1, 2]. Согласно этому методу, сахара разделяют круговой хроматографией на бумаге ватман 3 и проявляют опрыскиванием хроматограммы бромкрезолпурпуром с борной кислотой. Затем круговые зоны вырезают и элюируют водой. В элюате сахара определяют комплексометрически по

способу Поттерата. Точность метода, как это видно из примеров определения глюкозы или смеси лактозы с сахарозой, составляет  $\pm 2\%$ .

### Колориметрические методы

Описан ряд колориметрических методов определения сахаров после проявления их кислым фталатом анилина (Бласс и сотрудники), по методу Шомодьи—Нельсона (Дуфф, Эствуд и Шу), антроновым реактивом (Димлер и сотрудники), 3,5-динитросалициловой кислотой (Борель и сотрудники), бензидином (Джонс и Придгам [2]) и др. Методы, основанные на элюировании красящего вещества, получаемого непосредственно на бумаге, являются менее длительными. Валленфельс [1] экстрагирует из бумаги формазан, полученный в результате реакции сахаров с хлористым трифенилтетразолием. Баар [1] элюирует ледяной уксусной кислотой красящее вещество, образовавшееся при реакции сахаров с кислым фталатом анилина, а Уодман — продукт реакции сахара с N-(1-нафтил)-этилендиаминном.

Из первого типа методов, основанных на цветной реакции в растворе, наиболее точным является метод Шомодьи—Нельсона, погрешность которого составляет  $\pm 2\%$  (II 37). Для определения сахаров, получаемых при ферментативном гидролизе, пользуются антроном, который применяется также при анализе глюкозо- или фруктозосодержащих олигосахаридов (II 38). Этот реактив отличается весьма высокой чувствительностью (для определения берут от 10 до 100  $\mu\text{г}$  сахара); максимальная погрешность определения составляет  $\pm 5\%$ . Однако при применении антрона для получения воспроизводимых результатов необходимо строго соблюдать условия эксперимента (температуру, продолжительность реакции, качество реактивов, отсутствие в элюате волокон бумаги).

Из второго типа колориметрических методов определения сахаров удобным и простым является метод Валленфельса [1]. Согласно этому методу, хроматограмму проявляют хлористым трифенилтетразолием, а образовавшийся формазан экстрагируют смесью пиридина и концентрированной соляной кислоты. Метод пригоден для определения моносахаридов в количестве от 5 до 100  $\mu\text{г}$ , дисахаридов — от 10 до 200  $\mu\text{г}$  и трисахаридов — от 13 до 300  $\mu\text{г}$ . Преимущество метода — возможность применения его в круговой хроматографии (Гири и Нигем [3]).

Способ Валленфельса и сотрудников [3] исследовали Фишер и Дерфел [1]. Эти авторы установили следующее: а) реакция образования формазана протекает нестехиометрически, поэтому фотометрирование элюата следует проводить не сразу, а по истечении определенного промежутка времени; б) величины холостых определений бумаги относительно малы только при соблюдении определенных условий эксперимента; в) линейная зависимость образования формазана от количества сахара наблюдается лишь при применении избытка хлористого трифенилтетразолия.

Исходя из этого, на последней стадии при количественном определении сахаров вышеприведенным методом авторы рекомендуют: 1) проявление хроматограммы проводить строго в течение 60 мин при температуре  $65^\circ$  методом погружения ее в 2%-ный раствор хлористого трифенилтетразолия в 0,5 н. метанольном растворе едкого натра; 2) образовавшиеся на хроматограмме пятна или полосы элюировать уксусной кислотой в метаноле; 3) окраску элюата определять спектрофотометром Бекмана при длине волны 482 м $\mu$ . В этих условиях окраска элюата не изменяется в течение 14 дней. Максимальная погрешность определения этим методом составляет  $\pm 3\%$  (II 39).

## Производные сахаров и замещенные сахара

### САХАРОСПИРТЫ

#### ПРОЯВЛЕНИЕ

Для обнаружения сахароспиртов применяют проявители, реагирующие с  $\alpha$ -диолами (см. стр. 266). Наиболее пригодным является реактив, содержащий периодат натрия, марганцевокислый калий и бензидин (Д 286). Для этой цели также применимы тетраацетат свинца (Д 21), азотнокислое серебро (Д 4), раствор бромфенолового синего с борной кислотой (Д 29). Индикаторы отличаются меньшей чувствительностью при проявлении (около 50  $\mu$ г). Годин описал проявление спиртов ванилином и хлорной кислотой, которые реагируют также с кетозами. Цербулис рекомендует проявлять спирты *n*-анизидином с фосфорной кислотой.

В отличие от восстанавливающих сахаров сахароспирты не реагируют с фенолами и аминами.

#### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

На бумаге сахароспирты передвигаются аналогично соответствующим им моносахаридам. Следовательно, хроматографическое разделение смеси спиртов и моносахаридов весьма затруднено. Несмотря на это, отделение глюкозы от сорбита все же было достигнуто (Парик и сотрудники).

В основном сахароспирты разделяются растворителями, применяемыми для разделения сахаров. Чаще всего применяют следующие системы: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 5 : 2 : 1, *n*-бутанол — этанол — вода в соотношении 4 : 1 : 5 или *n*-пропанол — этилацетат — вода в соотношении 7 : 1 : 2 (по Цербулису). Последняя система пригодна и для разделения гликозидов сахарных спиртов. Однако наиболее пригодной может оказаться система Цифонелли и Смита — *трет*-амиловый спирт *n*-пропанол — вода в соотношении 4 : 1 : 1,5, в которой сахароспирты дают сравнительно высокие величины  $R_f$ . Разделение отдельных сахароспиртов видно из данных табл. 25.

#### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для количественного определения сахароспиртов применяют методы *in situ* или методы титрования после элюирования спиртов с хроматограмм по Гирсту и Джонсу [2] (см. стр. 276) (Д 36).

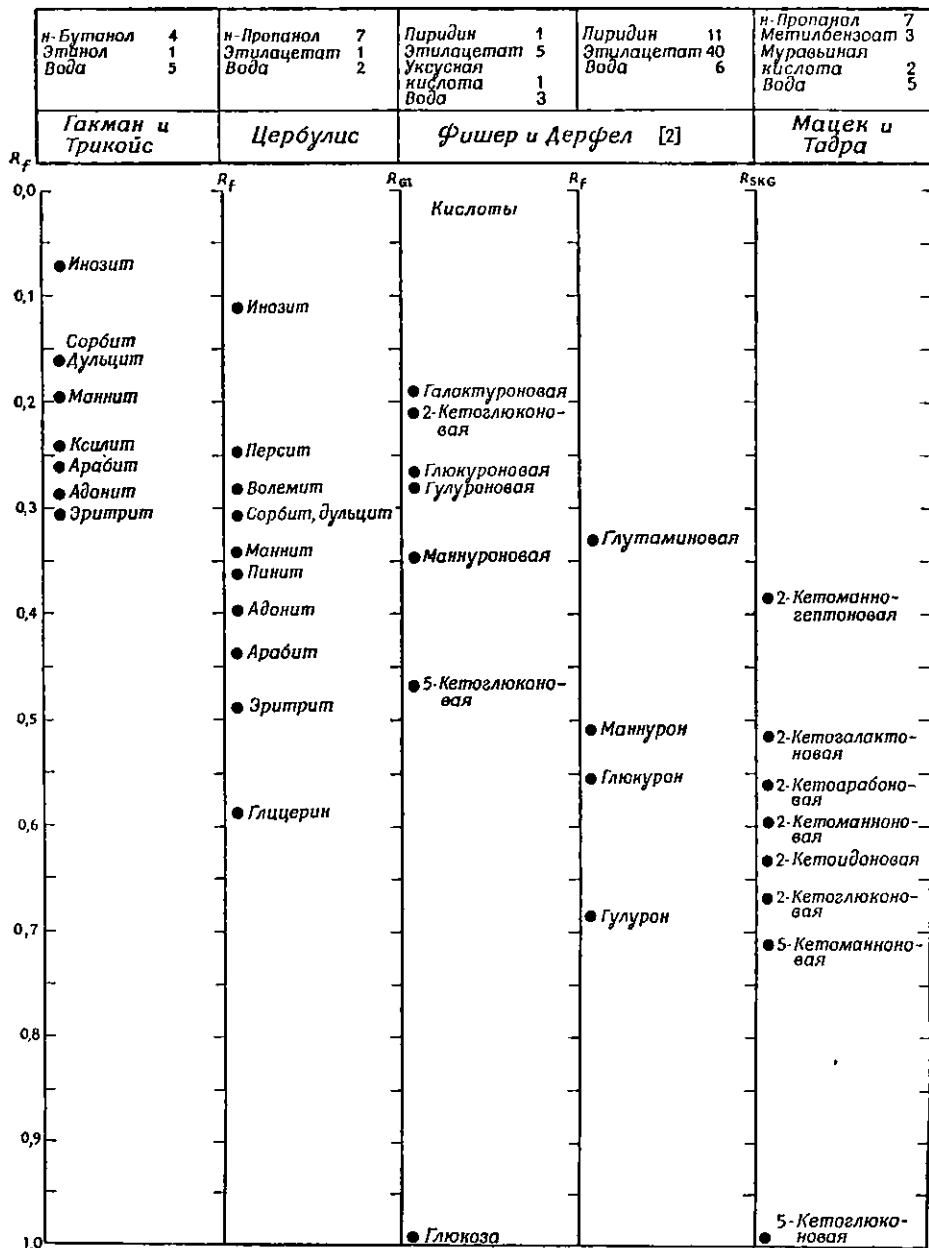
### САХАРНЫЕ КИСЛОТЫ И ЛАКТОНЫ

#### ПРОЯВЛЕНИЕ

##### Сахарные кислоты

При проявлении сахарных кислот используют  $\alpha$ -гидроксильные или карбоксильную группу; в первом случае в качестве проявителя применяют периодат натрия (Д 28), тетраацетат свинца (Д 21), бромфеноловый синий

Таблица 25  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  САХАРОСПИРТОВ И САХАРНЫХ КИСЛОТ



с борной кислотой (Д 29); во втором случае — кислотно-основные индикаторы [бромфеноловый синий (Д 6) и др.]. Наиболее чувствительным является проявление  $\alpha$ -диолов; проявление кислот с использованием их карбоксила позволяет идентифицировать сахарные кислоты в присутствии сахаристых веществ. Свободные сахарные кислоты можно также опреде-

лить после перевода их непосредственно на бумаге в метиловые эфиры. Для этого полученную хроматограмму помещают на 15 мин (подвешивают) в закрытую камеру, на дне которой находится эфирный раствор диазометана. Затем проявляют указанным далее способом.

### Лактоны и эфиры сахарных кислот

Для проявления этих веществ используют их  $\alpha$ -диольную структуру. Однако по данным Абдель-Акера и Смита [2] для их выявления более целесообразно применить модифицированную гидроксамовую пробу (Д 41).

### Уроновые кислоты и кетокислоты

Поскольку эти кислоты содержат, как и простые сахара, альдегидную или кетонную группу, для проявления их применяют реактивы, приведенные на стр. 264. Козн и Ланинг [1] описали специфический метод проявления 2-кетогексоновых кислот *о*-фенилендиамином, основанный на образовании хиноксалиновых производных, флуоресцирующих в ультрафиолетовом свете. Согласно нашим опытам, этот реактив взаимодействует также с 5-кетогексоновыми кислотами. По Мацеку и Тадра для проявления кетогексоновых кислот лучше всего применять кислый фталат анилина (Д 34), так как при этом в зависимости от окраски пятен можно определить положение кетогруппы: 2-кетокислоты дают пятна красного цвета, в то время как 5-кетокислоты — коричневого. Для выявления положения кетогруппы применяют также *м*-фенилендиамин. По Эдингтону и Перцивалю кислый фталат анилина или щавелевокислый анилин применяют для характеристики замещенных уроновых кислот: уроновые кислоты со свободным гидроксильным у  $C_2$  образуют пятна коричневого цвета, а кислоты со связанным гидроксильным у  $C_2$  — красного цвета.

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

В отличие от простых сахаров при разделении сахарных кислот наблюдается затруднение, связанное с диссоциацией их в нейтральных или слабокислых системах и проявляющееся в образовании «хвостов» (см. стр. 150). Диссоциацию необходимо подавить сильно диссоциированной органической кислотой (муравьиной, уксусной). У лактонов это явление отсутствует, и для разделения их с успехом применяют и нейтральные системы. Наиболее пригодными оказались следующие системы: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5, *n*-пропанол — метилбензоат — муравьиная кислота — вода в соотношении 7 : 3 : 2 : 5, а для лактонов — *n*-бутанол — этанол — вода в соотношении 4 : 1,1 : 1,9 (табл. 26).

Другим затруднением при разделении уроновых кислот является образование лактонов: при растворении кислоты немедленно наступает равновесие между свободной кислотой и ее лактоном, зависящее от pH раствора, температуры и других условий. В этом случае на хроматографическую бумагу фактически наносят раствор двух веществ (кислоты и ее лактона). Уроновые кислоты и лактоны сравнительно устойчивы в нейтральных и кислых системах, при помощи которых их можно отделить. В щелочной среде лактонный цикл размыкается и на хроматограмме образуется грязная полоска между лактоном и кислотой (рис. 138). В слабощелочных системах размыкание лактона не наблюдается, однако, как установили Фишер

и Дерфел [2] при помощи количественной хроматографии на бумаге, оно все же имеет место, но образовавшаяся грязная черта остается за пределами границы чувствительности проявителя.

Таблица 26

ВЕЛИЧИНА  $R_f$  ЛАКТОНОВ В СИСТЕМЕ *n*-БУТАНОЛ — ЭТАНОЛ —  
ВОДА В СООТНОШЕНИИ 40 : 11 : 19  
(по Абдель-Акеру и Смиту [2])

Лактон	$R_f$
$\gamma$ -Лактон <i>d</i> -глюкогептоновой кислоты	0,13
$\gamma$ -Лактон <i>d</i> -глюконовой кислоты . . .	0,22
$\gamma$ -Лактон <i>d</i> -манноновой кислоты . . .	0,25
$\gamma$ -Лактон <i>d</i> -глюконовой кислоты . . .	0,32
$\gamma$ -Лактон <i>d</i> -галактоновой кислоты . .	0,35
$\gamma$ -Лактон <i>d</i> -ксилоновой кислоты . . .	0,41
$\gamma$ -Лактон <i>l</i> -рамноновой кислоты . . .	0,50

Фишер и Дерфел [2] для разделения рекомендуют систему пиридин — этилацетат — уксусная кислота — вода в соотношении 5 : 5 : 1 : 3; камеру насыщают смесью пиридин — этилацетат — вода в соотношении 11 : 40 : 6. При качественном анализе кислот наиболее рациональной является идентификация маннуровой, глюкокуроновой, галактукуроновой и гулукуроновой кислот по величине  $R_f$  их уронидов с применением системы этилацетат — пиридин — вода в соотношении 11 : 40 : 6. Разделение уронидов и свободных кислот видно из данных табл. 25. Для количественного анализа необходимо, чтобы анализируемая кислота передвигалась на бумаге только в одной форме. Так как в щелочных системах на бумаге наблюдается размыкание лактона, то, по Фишеру и Дерфел [2], целесообразно уронид перед нанесением на бумагу перевести едким натром в свободную кислоту (II 40) с последующим анализом ее. Для отделения и идентификации олигоуроновых кислот можно, по данным Фишера и Дерфел, применить хроматографию с перетеканием или, по Мак-Креди и Сегмиллеру [2], — систему этилацетат — уксусная кислота — вода в соотношении 5 : 2,5 : 3.

Из замещенных сахарных кислот необходимо указать на хроматографическое разделение фосфорных эфиров 2-кетоглюконовых кислот, для которых Де-Ли рекомендовал систему метанол — аммиак — вода в соотношении 6 : 1 : 3.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

При количественном анализе уроновых кислот необходимо исключить образование уронидов. Определение кислот проводят одним из способов, приведенных в разделе простых сахаров. Фишер и Дерфел [2] указывают, что для количественного анализа наиболее пригодным является метод с применением хлористого трифенилтетразолия (II 39). В табл. 27 приведены относительные величины восстановления уроновых кислот при образовании формазанов.

Как видно из данных, приведенных в табл. 27, величины восстановления для свободных кислот и уронидов практически одинаковы. Это объясняется размыканием уронидов в щелочной среде проявителя.

Для анализа сахарных кислот, в которых отсутствует альдегидная или кетонная группа, применяют методы *in situ* или методы с применением периодата (II 36).

Таблица 27

ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ УРОНОВЫХ КИСЛОТ  
ПРИ ОБРАЗОВАНИИ ФОРМАЗАНОВ

(II 39, по Фишеру и Дерфел [2])

Глюкоза . . . . .	1,00	Маннуриновая кислота . . . . .	1,34
Глюкуроновая кислота . . . . .	1,36	Маннурон . . . . .	1,35
Глюкурон . . . . .	1,38	2-Кетоглюконовая кислота . . . . .	1,11
Галактуроновая кислота . . . . .	0,99	5-Кетоглюконовая кислота . . . . .	0,99

## АНГИДРИДЫ САХАРОВ, ДЕЗОКСИСАХАРА И ГЛИКАЛИ

### ПРОЯВЛЕНИЕ

Эту группу сахаров проявляют реактивами, применяемыми для проявления простых сахаров. Затруднения наблюдаются лишь при определении плохо гидролизующихся дезоксисахаров или дигетеролевулозанов. Для проявления их необходимо пользоваться реактивами, содержащими сильные минеральные или органические кислоты. Для дигетеролевулозанов наиболее пригодными проявителями являются резорцин или нафторезорцин с фосфорной кислотой (Д 30).

Как было указано в разделе о проявлении метилпентоз (стр. 270), для отличия дезоксисахаров и гликалей от простых альдоз и кетоз можно использовать окисление этих веществ йодной кислотой в муравьиную кислоту и ацетальдегид с последующим определением последнего реакцией Римини. Однако аналогичную реакцию дают также и метилпентозы. Поэтому Эдвард и Вальдрон отличают дезоксисахара и гликали от метилпентоз путем окисления их йодной кислотой с последующим проявлением хроматограммы кислым раствором *n*-нитроанилина (Д 288); при этом определяются дезоксисахара и гликали, образующие при окислении диальдегид малоновой кислоты, но не метилпентозы. Для отличия гликалей от дезоксисахаров пользуются реакцией с соляной кислотой в этаноле (Д 42). Соляная кислота при нагревании с гликалями образует на бумаге пятна розового или коричневого цвета. По данным Эдварда и Вальдрона все приведенные реакции весьма чувствительны. Йодной кислотой и нитропруссидом натрия можно обнаружить метилпентозы, дезоксисахара и гликали в пределах от 1 до 5 мкг, йодной кислотой и *n*-нитроанилином — от 0,1 мкг, а соляной кислотой — от 0,1 мкг гликалей.

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Для разделения этой группы сахаров пользуются системами, обычно применяемыми для разделения простых сахаров. Дезоксисахара чаще всего разделяют системой *n*-бутанол — этанол — вода в соотношении 4 : 1 : 5, ангидриды сахаров разделяют системами: *n*-бутанол — пиридин — вода в соотношении 3 : 2 : 1 или этилацетат — пиридин — вода в соотношении 25 : 8 : 7 (табл. 28). Для полного отделения простых сахаров от диангид-

ридов дифруктофураноз Роминский и Сушкова рекомендуют двумерное хроматографирование в системах фенол — вода в качестве первого растворителя и этилацетат — пиридин — вода в соотношении 2 : 1 : 2 — в качестве второго.

Таблица 28  
Величины  $R_f$  дезоксисахаров, гликалей и ангидридов сахаров

Соединение	н-Бутанол 4 Уксусная кислота 1 Вода 5	н-Бутанол 4 Этанол 1 Вода 5	Соединение	н-Бутанол 3 Пиридин 2 Вода 1
	Эдвард и Вальдрон	Уорд и Кент		Мак-Дональд и Госс
<i>l</i> -Рибаль . . . . .	0,77	—	Ди- <i>d</i> -фруктопиранозидо-1,2': 2,1'-диангидрид . . . . .	$R_{фру}$
<i>l</i> -Глюкаль . . . . .	0,61	—	<i>d</i> -Фруктопиранозо- <i>d</i> -фруктофуранозо-1,2': 2,1'-диангидрид . . . . .	0,34
<i>d</i> -Галакталь . . . . .	0,54	—	Фруктоза . . . . .	0,70
2-Дезокси- <i>d</i> -глюкоза . . . . .	0,35	—	Дифруктозоангидрид I . . . . .	1,00
2-Дезоксигалактоза . . . . .	0,32	—	Дифруктозоангидрид II . . . . .	1,14
2-Дезоксирибоза . . . . .	0,45	0,50	Дифруктозоангидрид III . . . . .	1,30
3-Дезоксирибоза . . . . .	—	0,60		1,72
4-Дезоксирибоза . . . . .	—	0,53		

В этих системах простые дезоксисахара и ангидриды сахаров передвигаются быстрее, чем соответствующие альдотексозы и кетотексозы. Затруднения наблюдаются при разделении ангидридов сахаров, состоящих из двух молекул фруктозы. В этом случае передвижение их на бумаге в первую очередь зависит от циклической формы: медленнее всего передвигаются, например, ди-*d*-фруктопиранозидо-1,2': 2,1'-диангидрид (дигетеролевулозан I); более высокими значениями  $R_f$  обладают *d*-фруктопиранозо-*d*-фруктофуранозо-1,2': 2,1'-диангидрид (дигетеролевулозан II); затем фруктоза. Диангидриды дифруктофуранозы I, II и III передвигаются быстрее, чем фруктоза, хотя и являются дисахаридами (Мак-Дональд и Госс, Заттлер и сотрудники [2], Роминский и Сушкова, Викберг).

Интересное открытие сделали Вестфал [1] и Пон, а также Штауб. Указанные авторы обнаружили в гидролизатах липополисахаридов два сахара, быстрее передвигающиеся, чем обычные моносахариды. Вестфал и сотрудники [2] назвали эти сахара тивелозой и абеквзой и на основе исследования структуры причислили их к дезоксиметилпентозам. Оба сахара, вероятно, являются стереоизомерами.

## МЕТИЛИРОВАННЫЕ САХАРА И МЕТИЛГЛИКОЗИДЫ

### ОБНАРУЖЕНИЕ

Для обнаружения метилированных сахаров применяют в основном проявители, приведенные на стр. 264. Хаф и сотрудники [1] из исследованного ими ряда ароматических аминов и фенолов рекомендуют следую-

щие, наиболее пригодные проявители: кислый фталат анилина (Д 34), *n*-анизидин (Д 43) и дифениламин (Д 35). Последний пригоден для обнаружения свободной (неметилизованной) гидроксильной группы у  $C_4$ . Диметиланилин (Д 44) дает различные окраски с триметил- и диметилпроизводными ксилозы или арабинозы. Для отличия тетраметилфруктофуранозы от тетраметилглюкопиранозы, обладающих одинаковыми величинами  $R_f$ , Гирст и сотрудники применяют для проявления по Джонсу щавелевокислый анилин и щавелевокислую мочевику. Первый проявитель реагирует с тетраметилглюкозой, а второй — с тетраметилфруктозой. В некоторых сомнительных случаях при идентификации метилированных сахаров целесообразно применить для проявления по Цифонелли и Смиту периодат калия и бензидин. С этими проявителями реагируют только метилированные сахара, содержащие свободную  $\alpha$ -диоловую группировку.

Метилгликозиды с приведенными реактивами реагируют слабо. Для проявления метилгликозидов наиболее пригодными являются азотно-кислое серебро (Д 4) или (по Цифонелли и Смит) периодат калия с бензидином (Д 286).

#### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Метилованные сахара в обычных системах растворителей обладают более высокими величинами  $R_f$ , чем незамещенные сахара;  $R_f$  возрастает с увеличением числа метильных групп. Величины  $R_f$  метилгликозидов выше значений  $R_f$  для остальных монометилпроизводных сахаров. Для разделения метилированных сахаров чаще всего применяют систему *n*-бутанол — этанол — аммиак — вода в соотношении 4 : 10 : 1 : 49 (Браун и сотрудники) или *n*-бутанол — этанол — вода в соотношении 5 : 1 : 4 (Гирст и Джонс [21]). Подвижность сахаров чаще всего относят к подвижности 2, 3, 4, 6-тетраметилглюкозы (величины  $R_g$ ).

В табл. 29 приведены величины  $R_g$  некоторых метилированных сахаров.

Богс и сотрудники предпочитают разделение метилированных сахаров проводить метилэтилкетон, насыщенным водой. По данным Хафа и сотрудников [1], для разделения уроновых кислот целесообразно пользоваться кислой системой *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5.

Для разделения метилгликозидов наиболее пригодной должна быть система по Цифонелли и Смит: *трет*-амиловый спирт — *n*-пропанол — вода в соотношении 4 : 1 : 1,5. Величины  $R_f$  метилгликозидов в этой системе приведены в табл. 30.

В других случаях пользуются системами, применяемыми для разделения метилированных сахаров.

В тех случаях, когда не удастся достигнуть четкой и надежной идентификации сахаров, необходимо, по Хафу [1], провести деметилирование соответствующих сахаров (после разделения их на колонке) с последующей идентификацией продуктов деметилирования. Лемье и Бауэр [1] применяют для идентификации 2-, 3-, 4- или 6-метилглюкоз и некоторых изомерных деметилглюкоз окисление йодной кислотой; полученные продукты подвергают щелочному гидролизу с последующей идентификацией продуктов гидролиза на бумаге.

Таблица 29

ЗНАЧЕНИЯ  $R_g$  МЕТИЛИРОВАННЫХ САХАРОВ В СИСТЕМЕ  
 $n$ -БУТАНОЛ-ЭТАНОЛ-ВОДА В СООТНОШЕНИИ 5:1:4  
(по Гирсту и Джонсу)

Соединение	$R_g$	Соединение	$R_g$
Мальтоза . . . . .	0,02	3-Метилхинозоза . . . . .	0,60
Глюкоза . . . . .	0,09	3,4-Диметилфруктоза . . . . .	0,61
4-Метилгалактоза . . . . .	0,16	2,3-Диметиларабиноза . . . . .	0,64
6-Метилгалактоза . . . . .	0,18	2,3,4-Триметилгалактоза . . . . .	0,64
2-Метилглюкоза . . . . .	0,22	2,4-Диметилксилоза . . . . .	0,66
2-Метилгалактоза . . . . .	0,23	2,4,6-Триметилгалактоза . . . . .	0,67
6-Метилглюкоза . . . . .	0,27	2,3,6-Триметилгалактоза . . . . .	0,71
Рамноза . . . . .	0,30	3-Метилальтрометилоза . . . . .	0,68
3,4-Диметилгалактоза . . . . .	0,32	2,3-Диметилксилоза . . . . .	0,74
4-Метилманноза . . . . .	0,32	2,4,6-Триметилглюкоза . . . . .	0,76
2-Метил- $\beta$ -метилальтрозид . . . . .	0,34	3,4,6-Триметилманноза . . . . .	0,79
2-Метилксилоза . . . . .	0,38	2,3,6-Триметилманноза . . . . .	0,81
2-Метиларабиноза . . . . .	0,38	2,3,6-Триметилглюкоза . . . . .	0,83
2,4-Диметилгалактоза . . . . .	0,41	1,3,4-Триметилфруктоза . . . . .	0,83
4,6-Диметилгалактоза . . . . .	0,42	3,4-Диметилрамноза . . . . .	0,84
2,6-Диметилгалактоза . . . . .	0,44	2,3,4-Триметилглюкоза . . . . .	0,85
4,6-Диметилглюкоза . . . . .	0,46	3,4,6-Триметилфруктоза . . . . .	0,86
2-Метилфуктоза . . . . .	0,51	2,3,4,6-Тетраметилгалактоза . . . . .	0,88
3,6-Диметилглюкоза . . . . .	0,51	Тетраметилфруктопираноза . . . . .	0,90
3,4-Диметилглюкоза . . . . .	0,52	2,3,4-Триметилксилоза . . . . .	0,94
4,6-Диметилальтроза . . . . .	0,52	2,3,5-Триметиларабиноза . . . . .	0,95
2,3-Диметилманноза . . . . .	0,54	2,3,4,6-Тетраметилманноза . . . . .	0,96
2,3-Диметилглюкоза . . . . .	0,57	2,3,4,6-Тетраметилглюкоза . . . . .	1,00
4-Метилрамноза . . . . .	0,57	2,3,5,6-Тетраметилглюкоза . . . . .	1,01
4,6-Диметилманноза . . . . .	0,57	2,3,4-Триметилрамноза . . . . .	1,01
3,4-Диметилманноза . . . . .	0,58	1,3,4,6-Тетраметилфруктоза . . . . .	1,01

Таблица 30

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  МЕТИЛГЛИКОЗИДОВ (ЦИФОНЕЛЛИ И СМИТ)  
Система *трет*-амиловый спирт— $n$ -пропанол—вода в соотношении 8:2:3

Соединение	$R_f$	Соединение	$R_f$
Метил- $\alpha$ - <i>d</i> -глюкозид . . . . .	0,58	Метил- $\alpha$ - <i>l</i> -фуктозид . . . . .	0,76
Метил- $\beta$ - <i>d</i> -глюкозид . . . . .	0,63	Метил- $\alpha$ - <i>l</i> -рамнозид . . . . .	0,86
Метил- $\alpha$ - <i>d</i> -галактозид . . . . .	0,54	Метил- $\alpha$ - <i>d</i> -ксилозид . . . . .	0,75
Метил- $\beta$ - <i>d</i> -галактозид . . . . .	0,51	Метил- $\beta$ -лактозид . . . . .	0,33
Метил- $\alpha$ - <i>d</i> -маннозид . . . . .	0,68	Метил- $\beta$ -мальтозид . . . . .	0,37
Метил- $\alpha$ - <i>d</i> -маннофуранозид . . . . .	0,74	Сахароза . . . . .	0,36
Метил- $\alpha$ - <i>l</i> -арабинозид . . . . .	0,60	Глюкоза . . . . .	0,42
Метил- $\beta$ - <i>l</i> -арабинозид . . . . .	0,68		

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для количественного анализа частично метилированных сахаров Гирст и сотрудники [1] применили окисление щелочным гипойодидом калия или натрия. Определение сахаров окислением их перйодатом натрия по данным Гирста и Джонса дало лишь в нескольких случаях удовлетворительные результаты; при анализе этим методом 3,4-диметилрамнозы или 2,3-диметилглюкозы полученные результаты не совпадали с ожидаемыми. Это не позволило авторам рекомендовать этот метод для анализа метилированных сахаров. Исходя из этого, Бартлетт и сотрудники предлагают колориметрический метод количественного определения метилированных сахаров с применением кислого фталата анилина. Результаты определения этим методом не зависят от степени металирования сахаров. С успехом можно применить и другие методы (ранее описанные в главе о простых сахарах), не связанные с определением  $\alpha$ -диоловых групп.

## ФОСФОРНЫЕ ЭФИРЫ

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБЫ

Выделение эфиров из биологического материала проводят (после удаления белков) путем перевода их в бариевую соль и добавления этанола до концентрации 80%. Для хроматографирования по Мортимеру бариевую соль растворяют в 0,5 н. соляной кислоте, добавляют для осаждения бария сернокислый калий или сернокислый аммоний и доводят раствор до pH 5. В таком виде раствор сохраняется при температуре 4°. Хроматографирование фосфорных эфиров в виде калиевых или аммониевых солей более целесообразно, чем хроматографирование свободных эфиров, полученных при обессоливании раствора катионитом.

### ПОДГОТОВКА БУМАГИ

Методика приготовления бумаги для хроматографирования фосфорных эфиров приведена выше (см. стр. 105). По данным Опеньской-Блауг и сотрудников [2], при разделении эфиров в системе *n*-бутанол — пиридин—5%-ная трихлоруксусная кислота в соотношении 40 : 25 : 45 промывание бумаги оказывается излишним, так как никакого влияния на форму пятен оно не оказывает.

### ПРОЯВЛЕНИЕ

Для проявления фосфатов сахаров используют одну из составных частей их молекулы: фосфорную или углеводную. В первом случае фосфорный эфир сначала подвергают гидролизу с последующим определением освобожденного при гидролизе неорганического фосфата. В качестве проявителя этой группы применяют предложенный Хейнсом и Ишервудом молибденовый реактив (Д 45а) или при проявлении методом погружения — реактив в модификации Барроуза и сотрудников (Д 45б). Проявление проводят следующим образом: хроматограмму опрыскивают молибденовым реактивом, содержащим хлорную и соляную кислоты и молибдено-

вокислый аммоний, и нагревают; при этом в результате гидролиза фосфорного эфира и реакции фосфатов с молибденовокислым аммонием на хроматограмме образуются пятна фосфорномолибденового комплекса. Для получения более ярко окрашенных пятен хроматограмму опрыскивают аскорбиновой кислотой или подвергают действию паров сероводорода; в результате такой обработки фосфорномолибденовый комплекс восстанавливается в соединение синего цвета. Доман и Каган, а также Опеньска-Блаут и сотрудники [2] для получения более интенсивной окраски пятен опрыскивают хроматограмму бензидином (Д 45а). В этом случае окраска пятен вызвана не только восстановлением фосфорномолибденового комплекса, но и окислением бензидина в бензидиновую синь. При описанном методе гидролиза обнаружение некоторых особенно устойчивых эфиров, например фосфоглицериновой кислоты, затруднено. Исходя из этого, Бандурский и Аксельрод после опрыскивания хроматограммы молибденовым реактивом высушивают ее в течение не более 1 мин при 85° (достаточно для открытия глюкозо-1-фосфата), а затем помещают ее на расстоянии 10 см от источника ультрафиолетового света с длиной волны 2537 Å и облучают в течение 10 мин. Все фосфорорганические соединения с молибденовым реактивом образуют на хроматограмме пятна синего цвета, а неорганические фосфаты — желто-зеленого. Мортимер для обнаружения трудногидролизуемых фосфатов опрыскивает хроматограмму сначала кислым фталатом анилина (Д 34) (проявляются пятна глюкозо-6-фосфата или фруктозодифосфата), после чего хроматограмму проявляют молибденовым реактивом (Д 45а).

Основным недостатком химического метода гидролиза фосфорных эфиров на бумаге является деструкция целлюлозы сильными кислотами, хотя даже при применении для гидролиза весьма сильных кислот некоторые фосфаты остаются негидролизованнными. Поэтому Доман и Каган и Шимона, а также Сакловска-Шимонова проводят гидролиз таких эфиров на бумаге раствором фермента фосфатазы (Д 45а) с последующим проявлением неорганического фосфата ранее указанным способом. По данным Домана и Кагана, чувствительность реакции при проявлении молибденовым реактивом и бензидином составляет 0,15 мкг фосфора на 1 см<sup>2</sup>. При ферментативном гидролизе фосфорных эфиров в процессе инкубирования хроматограммы в водной среде наблюдается распыливание (диффузия) пятен; во избежание этого Флетчер и Мальпресс перед опрыскиванием раствором фермента пропитывают бумагу хлористым кальцием (Д 45г), в результате чего освобожденный при инкубировании с фосфатазой фосфат дает с хлористым кальцием фосфорнокислый кальций и форма пятен сохраняется.

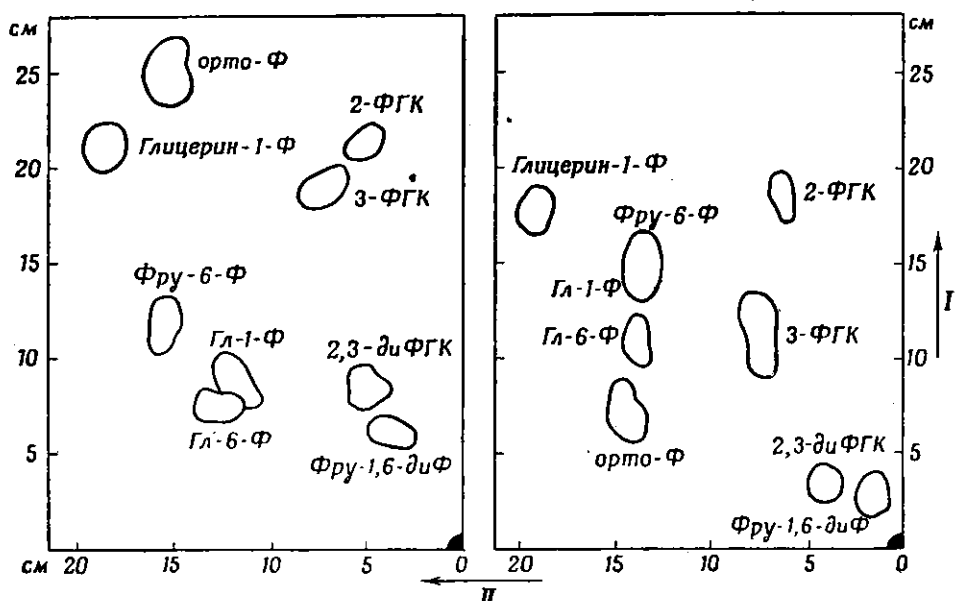
Вейд и Морган описали другой метод проявления фосфатов, не требующий предварительного гидролиза фосфорных эфиров, но отличающийся в десять раз меньшей чувствительностью. Метод основан на опрыскивании хроматограммы хлорным железом и сульфосалициловой кислотой (Д 46); при этом ионы Fe<sup>3+</sup> фиксируются пятном фосфата, а на основном фоне нефиксированное Fe<sup>3+</sup> реагирует с сульфосалициловой кислотой. Приведенная реакция зависит от pH бумаги. Оптимальное значение pH колеблется в пределах от 1,5 до 2,5.

Менее специфическими являются методы, основанные на определении углеводной составной части фосфорных эфиров после гидролиза их на бумаге. Борковский, исследуя условия гидролиза эфиров соляной кислотой, обнаружил образование сахаров за счет гидролиза бумаги. Поэтому для гидролиза эфиров более рационально применять реактивы, содер-

жащие трихлоруксусную и хлорную кислоты (Уокер и Уоррен). Для проявления многих фосфатов сахаров можно пользоваться реактивами, обычно применяемыми для проявления сахаров (азотнокислое серебро, нафторезорцин, кислый фталат анилина и др.).

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Получение воспроизводимых результатов при хроматографировании фосфорных эфиров в значительной мере зависит от точного соблюдения



Р и с. 139. Двумерная хроматограмма фосфорных эфиров (Мортимер).

Системы: слева — I — этилацетат — формамид — пиридин в соотношении 1 : 2 : 1; II — этилацетат — уксусная кислота — вода в соотношении 3 : 3 : 1; справа — I — метилмоноэфир этиленгликоля (метилцеллозоль) — метилэтилкетон — 3 н. аммиак в соотношении 7 : 2 : 3; II — этилацетат — уксусная кислота — вода в соотношении 3 : 3 : 1. На бумагу нанесено около 20  $\mu$ г отдельных фосфатов.

условий эксперимента. При идентификации эфиров в биологическом материале наличие примесей в нем влияет на величины  $R_f$  и форму пятен. Для успешного разделения эфиров удаление примесей из анализируемого материала является обязательным.

По данным Хейнса и Ипервуда, для разделения фосфорных эфиров на бумаге целесообразно пользоваться системами, содержащими сильную кислоту или основание. Из таких систем пригодны диизопропиловый эфир — муравьиная кислота в соотношении 3 : 2 или этилацетат — пиридин — вода в соотношении 20 : 9 : 20. Для разделения более сложных смесей часто применяют двумерное хроматографирование по Бандурскому и Аксельроду; при этом в качестве первого растворителя применяют систему метанол — муравьиная кислота — вода в соотношении 80 : 15 : 5, а в качестве второго — систему метанол — аммиак — вода в соотношении 6 : 1 : 3. Мортимер аналогичной техникой разделения достиг хороших результатов при применении следующих систем: этилацетат — уксусная кислота — вода в соотношении 3 : 3 : 1 (снижение

скорости разделения достигалось путем помещения камеры в холодильный шкаф с температурой  $+4^{\circ}$ ), метилцеллозольв — метилэтилкетон — 3н. раствор аммиака в соотношении 7:2:3 или этилацетат — формамид — пиридин в соотношении 1:2:1 при температуре  $25^{\circ}$  и относительной влажности 20—35% (рис. 139). Комбинированием этих систем при дву-

### Таблица 31

### ЗНАЧЕНИЯ $R_f$ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ

Compound	R <sub>F</sub>
Метанол	16
Муравьиная кислота	3
Вода	1
Метанол	6
NH <sub>3</sub>	1
Вода	3
Этанол	80
Ацетат (pH 3,5)	0,8
Вода	19,2
Этилацетат	3
Уксусная кислота	3
Вода	1
Метилцеллозоль	7
Метилэтилкетон	2
3n NH <sub>3</sub>	3
Этилацетат	1
Формамид	2
Пиридин	1

**Бандурский и Аксельрод**

- Пиро-Ф
- 2-Ф-глицеринов
- Фру-1,6-диФ
- орто-Ф
- Гл-1-Ф
- Фру-6-Ф
- Гл-6-Ф
- Фру-1,6-диФ
- Пиро-Ф
- 2-Ф-глицеринов
- 3-Ф-глицеринов
- Гл-6-Ф
- Фру-6-Ф
- Гл-1-Ф
- орто-Ф

**Козн и Скотт [2]**

- Гл-6-Ф
- Фру-6-Ф
- Гл-4-Ф
- Риб-5-Ф
- Риб-3-Ф
- Ксил-3-Ф
- Ари-5-Ф
- Ксил-5-Ф
- Глицеральдегид-3-Ф
- 6-Ф-глюконов

**Мортимер**

- 2,3-Ди-Ф-глицеринов
- Фру-1,6-диФ
- 2,3-диФ-глицеринов
- Глицеральдегид-3-Ф
- орто-Ф
- 3-Ф-глицеринов
- Гл-6-Ф
- Фру-6-Ф
- Гл-1-Ф
- Риб-1-Ф
- 2-Ф-глицеринов
- Глицеро-1-Ф
- Риб-1-Ф
- Гл-6-Ф
- Глицеро-1-Ф
- Фру-6-Ф

**Рорто-Ф**

- Глицеральдегид-3-Ф
- Фру-1,6-диФ
- 2,3-диФ-глицеринов
- Гл-6-Ф
- Гл-1-Ф
- Риб-1-Ф
- Фру-6-Ф
- 3-Ф-глицеринов
- Глицеро-1-Ф
- 2-Ф-глицеринов
- орто-Ф
- (R<sub>F</sub> = 0,33)

мерном хроматографировании можно достигнуть хороших результатов. Величины  $R_f$  фосфорных эфиров в указанных системах приведены в табл. 31. Для отличия пентоз с *цис*-диолевой конфигурацией Козн и Скотт [2] применили систему с борной кислотой; таким путем, например, был отделен арабинозо-5-фосфат от рибозо-5-фосфата.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Хейнс и Ишервуд для количественного анализа фосфорных эфиров применили методику Беренблума и Чейна, согласно которой пятно фосфорного эфира вырезают, сжигают с серной и хлорной кислотами, полученный минеральный фосфат переводят в фосфорномолибденовый комплекс, последний восстанавливают и фотометрируют (*П41*). Этим методом можно количественно определить фосфор в количестве не менее 0,2  $\mu$ г. При анализе от 5 до 10  $\mu$ г фосфора точность определения составляет  $\pm 1,5\%$ .

### АМИНОСАХАРА

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБЫ

Аминосахара в большинстве случаев идентифицируют в гидролизатах природного материала. Для гидролиза аминоксахаров Фишер и Нельс [3] рекомендуют применять соляную кислоту (*П 42*), незначительно расщепляющую глюкозамин (приблизительно 5%). Другие авторы для гидролиза применяют серную кислоту; в этом случае следует пользоваться кислотой высокой концентрации (приблизительно 6 н.), а продолжительность нагрева значительно удлинить.

Масамунэ и Йосидзава [2] при хроматографировании сульфатов аминоксахаров наблюдали передвижение на хроматограмме двух пятен одного и того же сахара. Этого не наблюдалось при применении для разделения солянокислых аминоксахаров.

#### ПРОЯВЛЕНИЕ

Для проявления аминоксахаров чаще всего применяют рекомендованный Парtridgeм [2] реактив Моргана — Эльсона (*Д 47*), т. е. *n*-диметиламинобензальдегид и ацетилацетон. Этим реактивом можно пользоваться и для отличия свободных аминоксахаров от их ацетилированных производных. Аминную группу аминоксахаров можно обнаружить раствором нингидрина (*Д 112*); с последним хорошо реагируют только свободные аминоксахара. Для проявления аминоксахаров пользуются также реактивами, применяемыми для проявления простых сахаров; из них наиболее применимы азотнокислое серебро (*Д 4*) и кислый фталат анилина (*Д 34*). Однако, как показали Пейн и Кибер, на цветные реакции аминоксахаров с нингидрином или кислым фталатом анилина могут влиять содержащиеся в анализируемом растворе сахарные кислоты. Так, например, глюкозамин, в обычных условиях взаимодействующий с указанными выше реактивами, в смеси с галактуроновой или глюкозаминовой кислотами после их разделения на хроматограмме реагирует только с нингидрином и не

реагирует с кислым фталатом анилина. N-Ацетилглюкозамин в присутствии галактуроновой кислоты не реагирует с кислым фталатом анилина, но реагирует в присутствии глюкозаминовой кислоты.

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Подвижность аминсахаров подобно сахарным кислотам зависит от pH системы растворителей. Для разделения аминсахаров чаще всего применяют щелочные системы, в которых аминсахара передвигаются медленнее, чем соответствующие им незамещенные сахара. Только в системе фенол — аммиак аминсахара передвигаются быстрее. Наиболее применимой системой является коллидин, насыщенный водой; эта система пригодна для отделения глюкозамина от галактозамина. Приемлемой может оказаться также система по Лелуару и Кардини: этилацетат — пиридин — аммиак, в которой величина  $R_f$  глюкозамина составляет 0,61, а галактозамина — 0,36. Фишер и Небель [3] предпочитают систему пиридин — этилацетат — уксусная кислота — вода в соотношении 5 : 5 : 1 : 3, в которой, пользуясь камерой, насыщенной пиридином, этилацетатом и водой в соотношении 11 : 40 : 6, можно разделить глюкозамин, галактозамин и уроновые кислоты. Оба амина передвигаются между группой аминокислот: аланин, треонин, пролин и валин. В присутствии других веществ можно, по Аминофу и Моргану, пользоваться двумерным хроматографированием, применив в качестве первого растворителя коллидин, насыщенный водой, а в качестве второго — *n*-бутанол — 3%-ный аммиак в соотношении 1 : 1.

### Перевод аминсахаров в соответствующие пентозы

Идентификация в некоторых системах глюкозамина в присутствии галактозамина или большого количества других веществ, реагирующих с нингидрином, затруднена. Исходя из этого, Гарделл и сотрудники дезаминируют аминсахара нингидрином, а образовавшиеся при этом пентозы

Таблица 32  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АМИНОСАХАРОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

	n-Бутанол 4 Этанол 1 Вода 5	Пиридин 5 Этилацетат 5 Уксусная кислота 1 Вода 3
		Фишер и Небель [3]
<i>d</i> -Глюкозамин·HCl . . . . .	0,1	14,5 см а)
N-Ацетилглюкозамин . . . . .	0,24	—
<i>d</i> -Хондрозамин . . . . .	—	12,5 см а)
Глюкозаминовая кислота . . . . .	0,20	—
<b>Динитрофенилпроизводные:</b>		
<i>d</i> -Глюкозамин . . . . .	0,75	
<i>d</i> -Хондрозамин . . . . .	0,61	
Глюкозаминовая кислота . . . . .	0,60	

а) Расстояние, пройденное веществом за 48 час при разделении с перетеканием.

(арабиноза из глюкозамина, ликсоза из галактозамина) определяют хроматографическим методом. Стоффин и Янлоз дезаминирование проводят непосредственно на бумаге (II 43). Таким путем можно определить от 1 до 2  $\mu$ г аминов в смеси.

#### Перевод в N-(2,4-динитрофенил)-замещенные производные

Кент [1] и Кент с сотрудниками [2] проводят разделение глюкозамина и галактозамина и некоторых других аminosахаров, в частности смесей, содержащих нейтральные сахара или аминокислоты, пользуясь переводом их с помощью 2,4-динитрофторбензола (II 94) в соответствующие N-(2,4-динитрофенил)-производные. Результаты хроматографического разделения этих производных приведены в табл. 32.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для количественного определения аminosахаров применяют следующие методы: аminosахара элюируют и в элюате их колориметрически определяют с применением реактива Моргана — Элсона (Партридж [2]); по Фишеру и Небелю [3], колориметрическое определение проводят в элюате, полученном после проявления аminosахаров на хроматограмме нингидрином или хлористым трифенилтетразолием. Последнему реактиву авторы отдают предпочтение, так как, несмотря на зависимость реакции от температуры и сравнительно большое количество пустых мест на бумаге, проявление хлористым трифенилтетразолием дает более интенсивно окрашенные пятна по сравнению с окраской пятен, получаемых при проявлении нингидрином. По данным авторов расхождения в отдельных определениях по формазановому методу колеблются в пределах 1—3%, а при определении с применением нингидрина составляют 2—4%.

Для количественного анализа аminosахаров в гидролизатах белков наиболее пригодным является формазановый метод.

### ДРУГИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ САХАРОВ

Следует отметить работы по хроматографическому разделению ацетилированных сахаров на обычной бумаге (Абдель-Акер и Смит [2]) или на ацетилированной бумаге (Михеель и Швеппе), а также работы по разделению озонов сахаров (Петуел), диэтилсульфоновых производных пентоз (Хаф и Тейлор [2]) и замещенных дезоксигликозиламинов (Барклай и сотрудники).

## Полисахариды

### ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

Метод хроматографии на бумаге пока не пригоден для непосредственного анализа смеси высокомолекулярных веществ (полисахаридов, белков) в основном ввиду ограниченной растворимости этих веществ в органических растворителях. Имеет значение также и ситовой эффект. При хро-

матографировании полисахаридов определенные трудности связаны с проявлением их, что объясняется взаимодействием большинства проявителей с бумагой, являющейся полисахаридом.

До сих пор было проведено хроматографическое разделение кислых мукополисахаридов, гепарина и хондроитинсульфата; эти вещества не могли быть разделены при помощи электрофореза на бумаге (Ризнитс). Кирби, пользуясь в качестве растворителя 25%-ным раствором *n*-пропанола в 0,15 *M* фосфатном буфере (рН 6,4), проводит разделение указанных веществ в течение 33 час при 4°. По данным Ризнитса, для проявления хроматограммы наиболее пригодным оказался 0,125%-ный раствор толуидинового синего в метаноле. Полисахариды со свободными кислотными группами дают с этим реактивом красные пятна на синем фоне. Гамерман [41], подробно исследовав метод окрашивания полисахаридов, рекомендует хроматограмму перед проявлением фиксировать смесью формальдегида и этанола (Д 48). Тот же автор для проявления кислых полисахаридов рекомендует толуидиновый синий (Д 48), а для проявления смеси кислых и нейтральных полисахаридов — мупикармин (Д 49). Для проявления полисахаридов можно также из хроматограммы вырезать полоски длиной 1 см, полисахариды элюировать водой и в элюате определять гексозамин.

Следует иметь в виду и электрокинетический ультрафильтрационный метод анализа (стр. 40).

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ

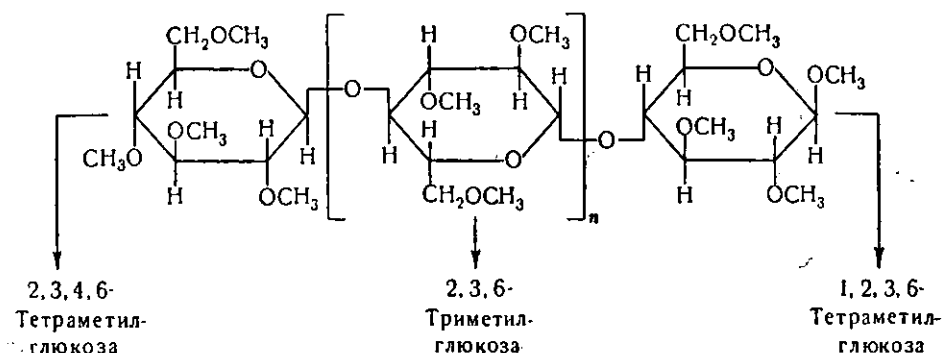
Хроматография сахаров на бумаге приобретает первостепенное значение при изучении строения полисахаридов, поскольку этот метод открывает перед исследователем новые возможности. В подтверждение значения хроматографии на бумаге в этой области рассмотрим вкратце направления в исследовании полисахаридов.

Экстрагированные из природного материала и тщательно очищенные полисахариды подвергают:

- 1) полному гидролизу с последующим качественным и количественным анализом отдельных компонентов полисахарида;
- 2) частичному гидролизу с последующим хроматографическим выделением продуктов гидролиза и определением их состава;
- 3) окислению перйодатом для определения величины молекулы;
- 4) полному метилированию полисахарида с последующим полным гидролизом полученного продукта и качественным и количественным анализом гидролизата.

Методы полного гидролиза полисахаридов, а также качественный и количественный анализ гидролизатов приведены в предыдущих разделах. Частичный гидролиз полисахаридов проводят разбавленными кислотами или ферментативным методом. Частичный гидролиз приобретает большое значение, в частности при исследовании сложных полисахаридов, содержащих уроновые кислоты. Так, например, при гидролизе растительных камедей разбавленными кислотами легко отщепляются пентофуранозы и остается группа сахаров пиранозного типа; при дальнейшем гидролизе из оставшихся сахаров отщепляются гексозы и остаются сравнительно устойчивые альдобиноновые кислоты (в случае растительных камедей чаще всего глюкуроновая кислота и гексоза). Способ связи альдобиноновых кислот определяют методом метилирования.

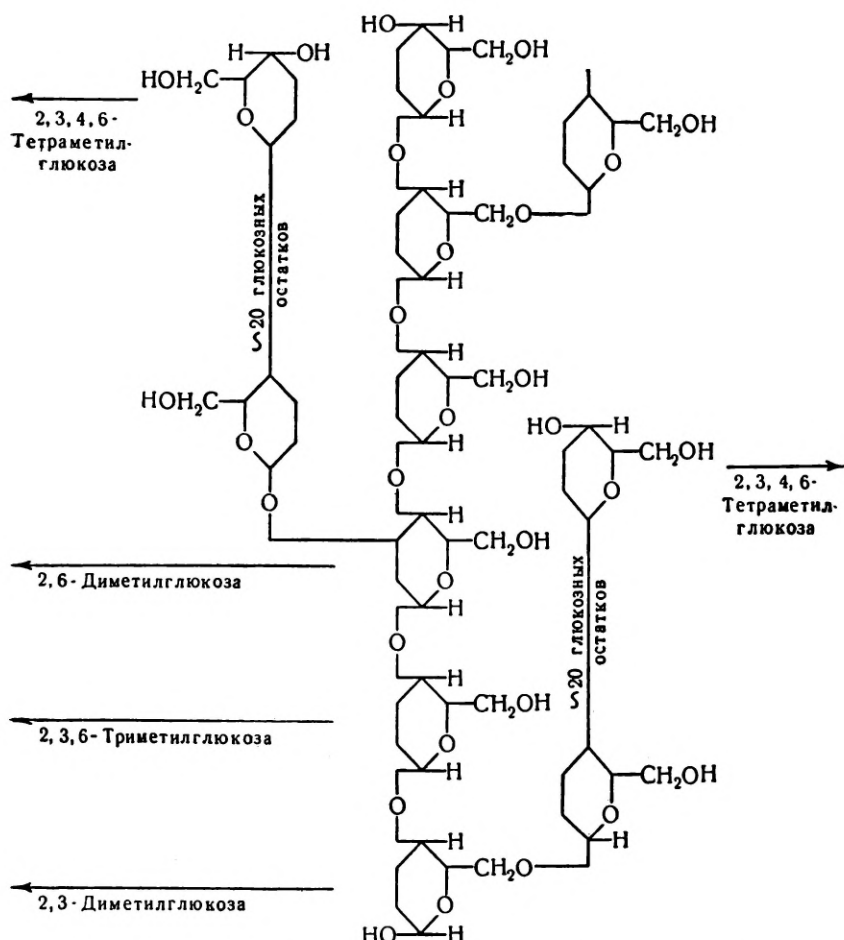
Сущность метода заключается в метилировании гидроксильных групп молекулы полисахарида (II 44) с последующим полным гидролизом полученного продукта (II 45); образовавшиеся при этом метилированные моносахариды определяют методом хроматографии на бумаге. Метилированию подвергаются только свободные гидроксильные группы; гидроксилы у атомов углерода, связывающих две молекулы сахара, не метилируются. Это можно продемонстрировать на примере метилирования целлюлозы.



При гидролизе метилированной целлюлозы получают триметилглюкозу и тетраметилглюкозу. Полисахариды с неразветвленной цепью дают лишь одну молекулу тетраметилглюкозы, так как четвертая метильная группа второй молекулы тетраметилглюкозы находится при углероде, связанном с редуцирующей группой. При гидролизе эта метильная группа отщепляется, в результате чего получают триметилпроизводные. Количественным анализом метилированных производных можно определить молекулярный вес полисахарида с неразветвленной цепью. Так, например, при гидролизе метилированного маннана получено 8% 2,3,4,6-тетраметилманнозы, а остальное приходится на долю 2,3,6-триметилманнозы. Отсюда следует, что неразветвленная молекула маннана состоит из 13 остатков маннозы (Джонс [1]). Остатки разветвленных полисахаридов, соединенные в точках разветвления с тремя соседними молекулами, содержат на один свободный гидроксил меньше. Такие соединения, например гексозаны, при гидролизе дают диметилгексозы, по количеству которых можно вычислить степень разветвления полисахарида. Ниже приведен пример метилирования разветвленного гексозана.

Таким образом, в результате полного гидролиза метилированного гексозана получают 2,3-диметилглюкозу, 2,6-диметилглюкозу, 2,3,6-триметилглюкозу и 2,3,4,6-тетраметилглюкозу. Аналогично определяют структуру меньших молекул, полученных при частичном гидролизе и разделенных хроматографированием на колонке порошкообразной целлюлозы. Абдель-Акер и Смит [1], учитывая сложность гидролиза и идентификации метильных производных альдобиноновых кислот, рекомендовали восстанавливать карбоксильную группу этих соединений алюмогидридом лития и уже с образовавшимися при этом гексозами проводить соответствующие операции.

Окислением полисахаридов перйодатом определяют величину их молекулы, а в отдельных случаях — и способ связи между отдельными молекулами. Йодная кислота окисляет два соседних атома углерода полисахарида, связанных, с одной стороны, с двумя гидроксильными



группами, а с другой — с двумя атомами углерода. В результате окисления возникают две альдегидные группы, а при наличии третьего свободного гидроксила и дальнейшего окисления образуется муравьиная кислота, которую можно оттитровать. Три подряд свободные окисляющиеся гидроксильные группы содержатся у гексозанов только в конце цепи; отсюда, определив количество образовавшейся муравьиной кислоты, устанавливают величину молекулы полисахарида, а по количеству последней на окисление йодной кислоты — и способ связи.

В качестве примера ниже приводится изучение Эндрюсом и сотрудниками строения галактоманнана из семян *Trigonella foenum-graecum*. Выделенный и очищенный полисахарид гидролизовали 1 н. серной кислотой, гидролизат нейтрализовали, после чего подвергали качественному и количественному анализу методом хроматографии на бумаге. При этом были идентифицированы галактоза и манноза в соотношении 1:1,2. Оба сахара были разделены на колонке порошкообразной целлюлозы и дополнительно идентифицированы по оптической активности и температуре плавления.

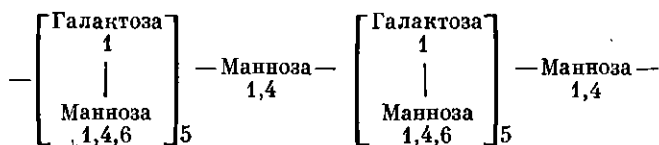
Окислением галактоманнана перйодатом калия с последующим титрованием выделяющейся при этом муравьиной кислоты было установлено,

что 43,6% анализируемых сахаров содержат подряд три свободные гидроксильные группы. Расход перйодата на окисление составил 1,49 моля.

После метилирования полисахарида метилсульфатом в щелочной среде полученный раствор нейтрализовали, подвергали диализу и концентрировали. Метилированный полисахарид гидролизовали соляной кислотой и после нейтрализации концентрировали. Затем смесь метилированных гексоз фракционировали на колонке порошкообразной целлюлозы с автоматическим отбором фракций. Полученные отдельные фракции анализировали методом хроматографии на бумаге; идентичность полученных веществ была подтверждена определением физико-химических констант. Таким путем были найдены 2,3,4,6-тетраметил-*d*-галактоза, 2,3,6-триметил-*d*-манноза и 2,3-диметил-*d*-манноза в соотношении соответственно 5 : 1 : 5.

*Сравнение результатов, полученных при окислении и метилировании.* Определение количества муравьиной кислоты, образовавшейся в результате окисления сахара йодной кислотой, выявило наличие 43,6% концевых групп. Из соотношения метилированных гексоз, полученных при метилировании и последующем гидролизе полисахарида, найдено 43,3% 2,3,4,6-тетраметил-*d*-галактозы, что хорошо совпадает с вышеприведенными данными определения по муравьиной кислоте. Расход йодной кислоты (1,49 моля) также хорошо совпадает с вычисленным количеством в опытах по метилированию (1,45 моля).

На основании приведенных данных Эндрюс и сотрудники предложили следующее строение галактоманнана:



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время, судя по количеству опубликованных работ, метод хроматографии сахаров на бумаге по своему значению занимает второе место в ряду после хроматографии аминокислот. В период с 1946 г., когда Партридж опубликовал первое исследование по хроматографии сахаров на бумаге, до 1956 г. в мировой литературе было опубликовано более 1000 работ, посвященных этому вопросу.

Разработка техники количественного и качественного хроматографического анализа проводилась в связи с исследованиями строения полисахаридов. Наибольшие заслуги в этом отношении принадлежат английским ученым: Флуду, Гирсту, Хафу, Джонсу, Партриджу и др.

Помимо огромного влияния метода хроматографии на бумаге на развитие химии полисахаридов, он не меньшее значение приобрел при исследовании процесса фотосинтеза, в частности первых стадий его, особенно в связи с применением радиоактивных изотопов. Работы в этом направлении в основном принадлежат сотрудникам Университета в Беркли — Калвину и Бенсону. Ряд биологически интересных данных был выявлен и при исследовании кинетики ферментативных реакций, протекающих в организме растений и животных.

Метод хроматографии сахаров на бумаге нашел практическое применение в ряде отраслей пищевой промышленности, например сахарной, пивоваренной, в производстве фруктовых вод и т. д.

В настоящее время основные проблемы техники применения хроматографии на бумаге для анализа сахаров решены. В дальнейшем надо модифицировать системы растворителей для более совершенного разделения некоторых смесей сахаров, изыскать наиболее избирательные проявители и уточнить методы количественного анализа.

Большое поле деятельности остается в области теории хроматографии на бумаге. Не решены, например, вопросы разделения изомеров сахаров, возможное разделение оптических антиподов. Отделение методом хроматографии на бумаге соответствующих *d*-сахаров от *l*-сахаров не было достигнуто даже при использовании систем, содержащих оптически активные растворители (Флуд и сотрудники [2]).

## ЛИТЕРАТУРА

- Abdel-Akher M., Smith F., *Nature*, **166**, 1037 (1950). [1]  
 Abdel-Akher M., Smith F., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5859 (1951). [2]  
 Airan J. W., Desai R. M., *Science and Culture*, **20**, 505 (1955).  
 Albon N., Gross D., *Analyst*, **77**, 406 (1952).  
 Aminoff D., Morgan W. T. J., *Nature*, **162**, 579 (1948).  
 Andrews P., Hough L., Jones J. K. N., *J. Chem. Soc.*, **1952**, 2744.  
 Aso K., Shibasaki K., Matsuda K., Yamauchi F., *J. Ferment. Technol. (Japan)*, **29**, 191 (1951).  
 Baar S., *Biochem. J.*, **58**, 175 (1954). [1]  
 Baar S., Bull J. P., *Nature*, **172**, 414 (1953). [2]  
 Bacon J. S. D., *Biochem. J.*, **50**, xviii (1952). [1]  
 Bacon J. S. D., Edelman J., *Arch. Biochem.*, **28**, 467 (1950). [2]  
 Bacon J. S. D., Edelman J., *Biochem. J.*, **48**, 114 (1951). [3]  
 Bandurski R. S., Axelrod B., *J. biol. Chem.*, **193**, 405 (1951).  
 Barclay J. L., Foster A. B., Overend W. G., *J. Chem. Soc.*, **1955**, 1541.  
 Barker G. R., Smith D. C. C., *Chemistry and Industry*, **1954**, 19.  
 Bartlett J. R., Hough L., Jones J. K. N., *Chemistry and Industry*, **1951**, 76.  
 Bayly R. J., Bourne E. J., *Nature*, **171**, 385 (1953). [1]  
 Bayly R. J., Bourne E. J., Stacey M., *Nature*, **169**, 876 (1952). [2]  
 Bell D. J., Manners D. J., Palmer A., *J. Chem. Soc.*, **1952**, 3760.  
 Benson A. A., Bassham J. A., Calvin M., Goodale T. C., Haas V. A., Stepka W., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1710 (1950).  
 Berenblum I., Chain E., *Biochem. J.*, **32**, 295 (1938).  
 Blanchard P. H., Albon N., *Arch. Biochem.*, **29**, 220 (1950).  
 Blass J., Macheboeuf M., Nunez G., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **32**, 130 (1950).  
 Boggs L. A., Cuendet L. S., Ehrenthal I., Koch R., Smith F., *Nature*, **166**, 520 (1950).  
 Бояркин А. Н., *Физиол. растений*, **2**, 298 (1955).  
 Borel E., Hostettler F., Deuel H., *Helv. chim. Acta*, **35**, 115 (1952).  
 Borkowski T., *Ann. Univ. M. C. S.*, **D 6**, 55 (1951).  
 Bradfield A. E., Flood A. E., *Nature*, **166**, 264 (1950).  
 Brown F., Hirst E. L., Hough L., Jones J. K. N., Wadman H., *Nature*, **161**, 720 (1948).  
 Buchan J. L., Savage R. I., *Analyst*, **77**, 401 (1952).  
 Buchanan J. G., Dekker C. A., Long A. G., *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3162.  
 Burrows S., Grylls F. S. M., Harrison J. S., *Nature*, **170**, 800 (1952).  
 Cerbulis J., *Anal. Chem.*, **27**, 140 (1955).  
 Cifonelli J. A., Smith F., *Anal. Chem.*, **26**, 1132 (1954).  
 Cohen S. S., Lanning M. C., *Federation Proc.*, **9**, 161 (1950). [1]  
 Cohen S. S., McNair Scott D. B., *Science*, **111**, 543 (1950). [2]

- Counsell J. N., Hough L., Wadman W. H., *Research*, 4, 143 (1951).  
 Das D. B., Mitra M. K., Wareham J. F., *Nature*, 174, 1058 (1954).  
 Dedonder R., *Compt. rend.*, 230, 997 (1950).  
 De Ley J., *Naturwissenschaften*, 42, 96 (1955).  
 De Whalley H. C. S., *Intern. Sugar J.*, 52, 127, 151, 267 (1950). [1]  
 De Whalley H. C. S., *Intern. Sugar J.*, 54, 158 (1952). [2]  
 Dimler R. J., Schaefer W. C., Wise C. S., Rist C. E., *Anal. Chem.*, 24, 1411 (1952).  
 Доман Н. Г., Каран З. С., *Биохимия*, 17, 719 (1952).  
 Duff R. B., Eastwood D. J., *Nature*, 165, 848 (1950).  
 Edington R. A., Percival E., *J. Chem. Soc.*, 1955, 3554.  
 Edward J. T., Waldron D. M., *J. Chem. Soc.*, 1952, 3631.  
 Fischer R. B., Parsons D. S., Morrison G. A., *Nature*, 161, 764 (1948).  
 Fischer F. G., Dörfel H., *Z. physiol. Chem.*, 297, 164 (1954). [1]  
 Fischer F. G., Dörfel H., *Z. physiol. Chem.*, 301, 224 (1955). [2]  
 Fischer F. G., Nebel H. J., *Z. physiol. Chem.*, 302, 10 (1955). [3]  
 Flood A. E., Hirst E. L., Jones J. K. N., *Nature*, 160, 86 (1947). [1]  
 Flood A. E., Hirst E. L., Jones J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 1948, 1679. [2]  
 Fletcher E., Malpress F. H., *Nature*, 171, 838 (1953).  
 Forsyth W. G. C., *Nature*, 161, 239 (1948).  
 French D., Wild G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 2612 (1953).  
 Gaillard B. D. E., *Nature*, 171, 1160 (1953).  
 Gardell S., Heijckenskjöld F., Rochnorlund A., *Acta chem. Scand.*, 4, 970 (1950).  
 Gardner K. J., *Nature*, 176, 929 (1955). [1]  
 Gardner K. J., *Intern. chocol. Rev.*, 9, 3 (1956). [2]  
 Geerdes J. D., Lewis B. A., Montgomery R., Smith F., *Anal. Chem.*, 26, 264 (1954).  
 Giri K. V., *Nature*, 173, 1194 (1954). [1]  
 Giri K. V., Nigam V. N., *Naturwissenschaften*, 40, 343 (1953). [2]  
 Giri K. V., Nigam V. N., *J. Indian Inst. Science*, 36, 49 (1954). [3]  
 Giri K. V., Nigam V. N., Srinivasan K. S., *Nature*, 173, 953 (1954). [4]  
 Giri K. V., Saroja K., Venkataraman R., Rao P. L. N., *Arch. Biochem. Biophys.*, 51, 62 (1954).  
 Glegg R. E., Eidinger D., *Anal. Chem.*, 26, 1365 (1954).  
 Godin P., *Nature*, 174, 134 (1954).  
 Goldschmidt S., Burkert H., *Z. physiol. Chem.*, 300, 188 (1955).  
 Gross D., Albon N., *Analyst*, 78, 191 (1953).  
 Gustafsson C., Sundman J., Lindh T., *Finish Paper and Timber J.*, B 33, 1 (1951).  
 Hackman R. H., Trikojus V. M., *Biochem. J.*, 51, 653 (1952).  
 Hamerman D., *Science*, 122, 924 (1955). [1]  
 Hamerman D., Bartz K. W., Reife A., *Anal. Chem.*, 27, 1524 (1955). [2]  
 Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature*, 164, 1107 (1949).  
 Harris G., MacWilliam I. C., *Chemistry and Industry*, 1954, 249.  
 Hawthorne J. R., *Nature*, 160, 714 (1947).  
 Hirase S., Araki C., Nakanishi S., *Bull. Chem. Soc. (Japan)*, 26, 183 (1953).  
 Hirst E. L., Hough L., Jones J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 1949, 928. [1]  
 Hirst E. L., Jones J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 1949, 1659. [2]  
 Hirst E. L., McGilvray D. I., Percival E. C. V., *J. Chem. Soc.*, 1950, 1297. [3]  
 Hockenhull D. J. D., *Nature*, 171, 982 (1953).  
 Horrocks R. H., *Nature*, 164, 444 (1949).  
 Hough L., Jones J. K. N., Wadman W. H., *J. Chem. Soc.*, 1950, 1702. [1]  
 Hough L., Taylor T. J., *J. Chem. Soc.*, 1955, 3544. [2]  
 Hulme A. C., *Nature*, 171, 610 (1953).  
 Chargaff E., Levine C., Green C., *J. biol. Chem.*, 175, 67 (1948).  
 Isherwood F. A., Jermyn M. A., *Biochem. J.*, 48, 515 (1951).  
 Jeanes A., Wise C. S., Dimler R. J., *Anal. Chem.*, 23, 415 (1951).  
 Jermyn M. A., Isherwood F. A., *Biochem. J.*, 44, 402 (1949).  
 Johanson R., *Nature*, 172, 956 (1953).  
 Jones J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 1950, 3292. [1]  
 Jones J. K. N., Pridham J. B., *Nature*, 172, 161 (1953). [2]  
 Kent P. W., *Research*, 3, 427 (1950). [1]  
 Kent P. W., Lawson G., Senior A., *Science*, 113, 354 (1951). [2]  
 Kerby G. P., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 83, 263 (1953).

- Kilgour G. L., Dutton G. G. S., *Canad. J. Chem.*, **31**, 1260 (1953).  
 Klevstrand R., Nordal A., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 1320 (1950).  
 Kowkabany G. N., *Advances in Carbohydr. Chem.*, **9**, 345 (1954).  
 Leloir L. F., Cardini C. E., *Biochim. et biophys. Acta*, **12**, 15 (1953).  
 Lemieux R. U., Bauer H. F., *Canad. J. Chem.*, **31**, 814 (1953). [1]  
 Lemieux R. U., Bauer H. F., *Anal. Chem.*, **26**, 920 (1954). [2]  
 Leuthardt F., Wolf H. P., *Helv. chim. Acta*, **37**, 1734 (1954).  
 McCready R. M., McComb E. A., *Anal. Chem.*, **26**, 1645 (1954). [1]  
 McCready R. M., Seegmiller C. G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **50**, 440 (1954). [2]  
 McDonald E. J., Goss B. K., *Anal. Chem.*, **24**, 422 (1952).  
 Macek K., Tadra M., *Chem. Listy*, **46**, 450 (1952).  
 McFarren E. F., Brand K., Rutkowski H. R., *Anal. Chem.*, **23**, 1146 (1951).  
 Malpress F. H., Morrison A. B., *Nature*, **164**, 963 (1949).  
 Martin A. J. P., *Biochem. Soc. Symposia*, **3**, 4 (1948).  
 Masamune H., Maki M., *Tohoku J. exper. Med.*, **54**, 229 (1952). [1]  
 Masamune H., Yosizawa Z., *Tohoku J. exper. Med.*, **59**, 1 (1953). [2]  
 Micheel F., Scheweppe H., *Naturwissenschaften*, **39**, 380 (1952).  
 Mortimer D. C., *Canad. J. Chem.*, **30**, 653 (1952).  
 Müller K., Täufel K., *Naturwissenschaften*, **40**, 140 (1953).  
 Novellie L., *Nature*, **166**, 745 (1950).  
 Опарин А. И., Бардинская М. С., *ДАН СССР*, **89**, 531 (1953); **94**, 305 (1954). [1,2]  
 Opieńska-Blauth J., Drozdowski E., Kański M., *Ann. Univ. M. C. S.*, **6**, 27 (1951). [1]  
 Opieńska-Blauth J., Madecka-Borkowska I., Borkowski T., *Acta physiol. Polonica*, **3**, 315 (1952). [2]  
 Parikh S. N., Parikh J. M., Godbole A. N., *Current Sci.*, **23**, 53 (1954).  
 Partridge S. M., *Nature*, **158**, 270 (1946). [1]  
 Partridge S. M., *Biochem. J.*, **42**, 238 (1948). [2]  
 Partridge S. M., *Nature*, **164**, 443 (1949). [3]  
 Payne W. J., Kieber R. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 1 (1954).  
 Petuely F., *Monatsh.*, **83**, 765 (1952).  
 Phillips J. D., Pollard A., *Nature*, **171**, 41 (1953).  
 Pon G., Staub A. M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **34**, 1132 (1952).  
 Porter W. L., Hoban N., *Anal. Chem.*, **26**, 1846 (1954).  
 Poterat M., *Intern. choc Rev.*, **10**, 4 (1955).  
 Рачинский В. В., Князютова Е. И., Равцова Б. Е., *Биохимия*, **17**, 551 (1952).  
 Rao P. S., Beri R. M., *Proc. Indian Acad. Sci.*, **33**, 368 (1951).  
 Rienits K. G., *Biochem. J.*, **53**, 79 (1953).  
 Ромилский И. Р., Сущкова А. С., *Биохимия*, **19**, 261 (1954).  
 Sattler L., Zerban F. W., *Anal. Chem.*, **24**, 1862 (1952). [1]  
 Sattler L., Zerban F. W., Clark G. L., Chia-Chen-Chu, Albion N., Gross D., De-Whalley H. C. S., *Ind. eng. Chem.*, **44**, 1127 (1952). [2]  
 Shu P., *Canad. J. Research*, **B28**, 527 (1950).  
 Soutar T. H., Hampton E., *Nature*, **174**, 801 (1954).  
 Stoffyn P. J., Jeanloz R. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 373 (1954).  
 Stoll A., Rüegger A., *Helv. physiol. Acta*, **10**, 385 (1952).  
 Szymona M., Sakiławska-Szymonova O., *Acta physiol. Polonica*, **3**, 329 (1952).  
 Täufel K., Reiss R., *Z. anal. Chem.*, **134**, 252 (1951).  
 Thompson J. F., Steward F. C., *Plant Physiol.*, **26**, 421 (1951).  
 Trevelyan W. E., Procter D. P., Harrison J. S., *Nature*, **166**, 444 (1950).  
 Vavruch I., *Listy cukrovar.*, **66**, 299 (1950). [1]  
 Vavruch I., *Listy cukrovar.*, **67**, 211 (1951). [2]  
 Vigyázo-Vámos L., *Magyar. Kém. Polyóirat*, **59**, 253 (1953).  
 Wade H. E., Morgan D. M., *Nature*, **171**, 529 (1953).  
 Wadman W. H., Thomas G. J., Pardee A. B., *Anal. Chem.*, **26**, 1192 (1954).  
 Wachtmeister C. A., *Acta chem. Scand.*, **5**, 976 (1951).  
 Waldron D. M., *Nature*, **170**, 461 (1952).  
 Walker D. G., Warren F. L., *Biochem. J.*, **49**, xxi (1951).  
 Wallenfels K., *Naturwissenschaften*, **37**, 491 (1950). [1]  
 Wallenfels K., *Ärztli. Forsch.*, **5**, 430 (1951). [2]  
 Wallenfels K., Bernt E., Limberg G., *Angew. Chem.*, **65**, 581 (1953). [3]

- Wanner H., *Helv. Chim. Acta*, **35**, 460 (1952).  
Westphall O., *Angew. Chem.*, **64**, 314 (1952). [1]  
Westphall O., Lüderitz O., Fromme I., Joseph N., *Angew. Chem.*,  
**65**, 555 (1953).  
Weygand F., Hofmann H., *Chem. Ber.*, **83**, 405 (1950).  
White L. M., Secor G. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 60 (1953).  
Wickberg B., *Acta chem. Scand.*, **8**, 436 (1954).  
Williams K. T., Bevenue A., *Science*, **113**, 582 (1951).  
Wolfrom M. L., Miller J. B., *Anal. Chem.*, **28**, 1037 (1956).  
Woodward C. C., Rabideau G. S., *Anal. Chem.*, **26**, 248 (1954).  
Woolf L. I., *Nature*, **171**, 841 (1953).  
Yosizawa Z., *Tohoku J. exper. Med.*, **53**, 125 (1950).  
Zerban F. W., Sattler L., Rosenthal G., Glaubach A., *Sugar*, 1952,  
№ 2.

# ФЕНОЛЫ И АРОМАТИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

---

*Ж. Прохазка*

## *Вещества фенольного характера (за исключением флавоноидов) и ароматические кислоты*

К этой главе, помимо простых фенолов, фенолкарбоновых кислот и некоторых фенольнокарбонильных соединений (продуктов расщепления лигнина и т. п.), отнесены также ароматические кислоты нефенольного характера. Для сравнения, а также из практических соображений иногда будут приводиться производные вышеуказанных соединений, даже если они утратили характер фенолов или кислот.

Число подвергавшихся хроматографированию веществ указанных типов велико, и в пределах этой книги нет возможности упомянуть о них достаточно подробно. Так, уже при выборе системы растворителей мы должны помнить, что среди фенольных соединений встречаются как легко растворимые в воде, так и в высшей степени липофильные вещества, а следовательно, и характер систем растворителей может быть чрезвычайно разнообразен. Равным же образом весьма различна и кислотность веществ фенольного характера. Кроме того, следует иметь в виду различия, обусловленные изомерией положения; именно разделение изомеров является главной проблемой при хроматографии. Уже авторы ранних работ установили, что изомеры положения обладают достаточно отличающимися значениями  $R_f$ ; из них *орто*-изомеры всегда имеют наиболее высокие значения  $R_f$ . Франц и Латилак [1, 2] показали, что в ряду ароматических соединений значения  $R_f$  являются функцией дипольных моментов упомянутых веществ. Они вывели эмпирическое уравнение  $R_f = K - 0,1 \mu$ , приведенное и обсуждавшееся уже ранее (стр. 82). Расчет величины  $\mu$  (дипольного момента в дебаях) производят векторным сложением величин дипольных моментов отдельных функциональных групп, приведенных в табл. 6. У дифенолов величина  $\mu$ , т. е. предполагаемый дипольный момент, имеет отрицательный знак. Константу  $K$  рассчитывают обычно из данных для *пара*-изомеров. Для *орто*-изомеров, поскольку у них имеет место образование прочного водородного мостика, значения  $R_f$  обычно несколько более высоки, нежели следует из уравнения (27а). Для гомологических рядов Франц и Йокль [1] вывели подобное же эмпи-

рическое уравнение (276), см. стр. 82. Этими расчетами, даже тогда, когда они не очень точны, можно пользоваться в тех случаях, когда некоторые из изомеров недоступны.

### ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Если налицо смесь истинных фенолов с веществами других типов, то для отделения от последних пользуются классическим способом, основанным на свойстве фенолов растворяться только в щелочных растворах (при высоких значениях  $pH$ ), в то время как кислоты и сильно кислые фенолы растворяются уже в растворах бикарбоната. Из раствора смеси кислот, фенолов, оснований и нейтральных (липофильных) веществ в органическом растворителе (чаще всего в эфире) встряхиванием с раствором бикарбоната натрия можно избирательно удалить кислоты. Фенолы можно затем извлечь взбалтыванием, например с 5%-ным раствором едкого натра, причем основания и нейтральные вещества (если они не слишком гидрофильны) останутся в органической фазе.

Из концентрированного водного раствора смеси кислот и фенолов в щелочи можно избирательно выделить фенолы пропусканием  $CO_2$  или вообще доведением  $pH$  до величины, близкой к 7.

Очень часто фенолы, особенно полифенолы с гидроксильными группами в *орто*- и *пара*-положениях, оказываются чрезвычайно чувствительными к окислению в щелочном растворе. Это необходимо иметь в виду при подготовке и нанесении проб. Если требуется хроматографировать образцы, содержащие летучие фенолы, сразу же после нанесения на бумагу следует начинать разделение между двумя стеклами (Гудечек), а по окончании хроматографирования — сразу же проявлять хроматограммы. Другая возможность заключается в превращении летучих фенолов в подходящие производные (азосоединения по Госсфельду или арилоксиуксусные кислоты по Шлеглю и Зигелю; *П* 46; табл. 36).

Наконец, некоторые полифенолы и полиоксикислоты можно выделить из смесей осаждением некоторыми катионами ( $Pb^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  и др.). Из осадков затем выделяют фенолы обычными способами (сероводородом, серной кислотой и пр.).

### ОБНАРУЖЕНИЕ

Обнаружение фенольных веществ на хроматограмме не вызывает никаких затруднений. Чаще всего пользуются реакциями сочетания, приводящими к образованию окрашенных азосоединений: с диазотированным *n*-нитроанилином (Хайс; Брей и сотрудники, *Д* 50), диазотированной сульфаниловой кислотой (реактив Паули, Брей и сотрудники; Кирби-Берри и сотрудники, *Д* 51), бис-диазотированным бензидином (Вахтмейстер [1, 2]; Витек; *Д* 52), диазониевыми солями нафтионовой кислоты и  $\alpha$ -нафтиламина (Эрспамер и Боретти).

Очень часто применяют аммиачный раствор окиси серебра (Бейт-Смит и Уэстолл, *Д* 4), а также водный или спиртовый раствор хлорного железа (*Д* 53).

Помимо этих основных способов обнаружения, применяли также многие другие, хотя и менее употребительные способы, например собственную флуоресценцию, пары аммиака и  $NO_2$ , 2,6-дихлорхинон-хлоримид (реактив Гиббса; Брей и сотрудники; *Д* 54), реактив Фолина

и его видоизменения (Эрспамер и Боретти; Кудзин и сотрудники; Д 55 и Д 56), реактив Миллона (Дюрант, Д 57),  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтол (реактив Гернгросса — Фосса — Герфельда), феррицианид с нитропруссидом, флороглюцин с соляной кислотой (Кудзин и сотрудники), фруктозу с соляной кислотой (для *m*-диоксипроизводных), сахарозу (для двух- и трехатомных фенолов), ванадат аммония (Шмидт и Ладеманн), борофтористоводородный *n*-нитробензолдiazоний, смесь хлорного железа и красной кровяной соли (Бартон и сотрудники, Д 58), фосфорновольфрамную кислоту и пары аммиака, железоаммиачные квасцы, 4-аминоантипирин с цианистым железом(III), бензохинон, *n*-нитрозодиметиланилин, уксуснокислый магний для оксиантрахинонов (Сибата и сотрудники, Д 59) и т. п.

Для редуцирующих полифенолов пригоден также 2,6-дихлорфенол-индофенол, для оксальдегидов — *o*-фенилендиамин, для ароматических кислот — кислотно-основные индикаторы (Д 6), для арилоксиуксусных кислот — сильно флуоресцирующие индикаторы, например умбеллиферон и флуоресцеин, для флороглюцина и некоторых его производных — ванилин с соляной кислотой и т. п.

Мы вышли бы за рамки данной главы, если бы стали перечислять для всех исследованных веществ окраски, возникающие при действии различных реактивов. Мы приведем поэтому лишь несколько обычных примеров окрашивания фенольных веществ с наиболее употребительными реактивами; сведения об остальных реактивах (большей частью менее доступных или имеющих меньшее значение) и о цветных реакциях с ними читатель сможет найти в оригинальной литературе. В ряде наиболее важных и характерных случаев мы приводим в таблицах цвет окрашивания с некоторыми реактивами.

Так, например, аммиачный раствор окиси серебра (Д 4) с *o*-диоксипроизводными дает коричнево-красное окрашивание почти мгновенно уже на холоду. С *n*-диоксипроизводными он реагирует несколько медленнее, с *m*-диоксипроизводными — лишь после нагревания в сушильном шкафу.

Дiazотированный *n*-нитроанилин (Д 50), с помощью которого удастся иногда открыть около 1  $\mu$ г вещества, с простыми фенолами дает окрашивание от ярко-желтого до коричневого, а с аминфенолами — пятна различной окраски. Подобные же, но несколько более темные окраски дает diaзотированная сульфаниловая кислота (Д 51). Оттенки пятен в обоих случаях зависят от pH бумаги или соответственно реактива; от этого зависит также, пойдет ли вообще реакция или нет. Бисdiaзотированный бензидин (Д 52) с фенолами дает красно-коричневое окрашивание. Реакция весьма чувствительна. Сведения об этих реактивах см. на стр. 170—171.

Хлорное железо (Д 53) не очень чувствительно, но более специфично, нежели все ранее упомянутые реактивы. С различными типами фенолов оно дает различное окрашивание: с вицинальными триоксипроизводными — темное (от серого до синего), с *o*-оксисбензойной группой и с  $\beta$ -резорциловой кислотой — красно-фиолетовое, с протокатеховой кислотой, пирокатехином и т. п. — оливково-зеленое и т. д. Раствор хлорного железа и красной кровяной соли с фенолами дает сразу синее окрашивание (Д 58). Реактив очень чувствителен, но не обладает специфичностью, так как дает ту же весьма четкую реакцию и с другими редуцирующими веществами, например с аскорбиновой кислотой и пр.

Реактивы Миллона (Д 57), Фолина — Дениса (Д 56) или соответственно Фолина — Чокальте (Д 55) для фенолов хотя и обладают избирательностью, но не лишены некоторых недостатков. Первый образует нестойкие пятна, и сам способ проявления не так прост, как с другими

реактивами, остальные дают синее окрашивание, поэтому исследуемые вещества нельзя различать по окраске.

Пятна различной окраски дает *n*-нитрозодиметиланилин (Накабаяси, Нисида, Д 60) (табл. 33).

Таблица 33

## ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НЕКОТОРЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Фенольное соединение	FeCl <sub>3</sub> (Д 53), Бейт-Смит и Уэстолл	<i>n</i> -Нитрозодиметилани- лин и HCl (Д 60), Накабаяси и Нисида	Диазотированная сульфанилсвая кис- лота (Д 51), Гейсман
Пирокатехин	Черная	Черная	Розовая
Резорцин	Серая	Зеленая	Красная
Гидрохинон	»	Красно-фиолетовая	
Пирогаллол	Красно-коричне- вая	Синяя	Синяя
Флороглюцин	Серая	Красно-фиолетовая	Красно-фиолетовая
Орцин	»		
Галловая кислота	»	Синяя	Синяя
Протокатеховая кис- лота	Зеленая	Черная	

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

При хроматографировании на бумаге более чем 300 веществ, относящихся к данному разделу, было использовано около 100 различных систем растворителей, нередко различавшихся лишь соотношением компонентов. Чаще всего пользовались *n*-бутанолом с добавлением уксусной кислоты или аммиака, а также бензолом с добавлением кислот (точный состав приведен в табл. 34; см. также рис. 140). Часто применяют бензин, фенол, амиловый спирт, изопропанол и др. Выбор системы растворителей в этой группе определяется степенью гидрофильности разделяемых веществ. В том случае, когда вещество мало растворимо в воде, органическую фазу также выбирают такую, в которой вещество мало растворимо, при этом коэффициент распределения между водой и органической фазой по возможности должен находиться в пределах 1—7. Этому условию лучше всего удовлетворяют растворители неполярного характера. Чтобы снизить адсорбцию на бумаге в таких растворителях или подавить частичную диссоциацию веществ, в систему или в атмосферу камеры вводят сильные органические кислоты (муравьиную или уксусную).

Растворимость веществ, трудно растворимых в воде, можно повысить, превращая их в соли (феноляты, еноляты или соли органических кислот); нередко этого можно достичь добавлением аммиака (или какого-либо другого основания, в некоторых случаях также основного буфера) в систему или в атмосферу камеры.

С летучими одноатомными фенолами Гудечек рекомендует работать между стеклянными пластинами в системе циклогексан — хлороформ — этанол (27 : 3 : 0,6). Для фенолоспиртов пригодна эта же система с соотношениями 6 : 24 : 0,6. Монокарбоновые кислоты в недиссоциированной форме (в нейтральной или кислой среде) также можно хроматографировать в первой системе или вообще в подобных мало полярных системах.

Таблица 34

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ФЕНОЛОВ И АРОМАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Боратный буфер <sup>а)</sup> н-Бутанол, насыщенный водой	Фосфатный буфер <sup>б)</sup> н-Бутанол, насыщенный водой	н-Бутанол 2 Бензол 10 Уксусная кислота 2 Вода 1	Вода, насы- щенная $\text{CO}_2$ до pH 4,2 (21°)	0,1н Гликоло- вый буфер, pH 10,2/н-Бутанол, насыщенный водой (Ш-Ш20406, восходящая)	н-Бутанол, насы- щенный 1,5 н. $\text{NH}_3$ ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> $\text{CO}_3$ (ватман 4, 15°)
Вахтмейстер <sup>в)</sup>	Накабаяси и Нисида	Бартон и сотрудники	Вагнер	Фьюстер и Хэлл	
0,0	● Протокате- ховая к-та	● Галловая к-та	● 3,4-ДиОН	Кислоты	
0,1	● Протокате- ховая к-та	● Флороглю- цин	● 3,5-ДиОН	● п-Аминобен- зойная	
0,2	● Пирогаллол	● Оксигидро- хинон	● 4-ОН	● п-ОН-Бензой- ная	
0,3			● 3-ОН	● Сульфанило- вая	
0,4	● Пирокате- хин		● 2,4-ДиОН	● Антралиловая	
0,5	● 3- $\text{CH}_3\text{O}$ -Пиро- катехин	● Пирогаллол	● 2,3-ДиОН	● о-Кумаровая	
0,6	● 4- $\text{CH}_3\text{O}$ -Пиро- катехин	● Протокате- ховая к-та	● 2,5-ДиОН	● Миндальная	
0,7		● Гидрохинон		● Гиппуровая	
0,8	● Флороглю- цин	● Резорцин	● 2-ОН	● Бензойная	
0,9	● $\text{CH}_3\text{O}$ -Гидро- хинон	● Пирокатехин	● 2,6-ДиОН	● Фенилуксу- сная	
1,0	● Резорцин, гидрохинон			● Фенилпропио- новая	
	● Пирокатехин			● Коричная	

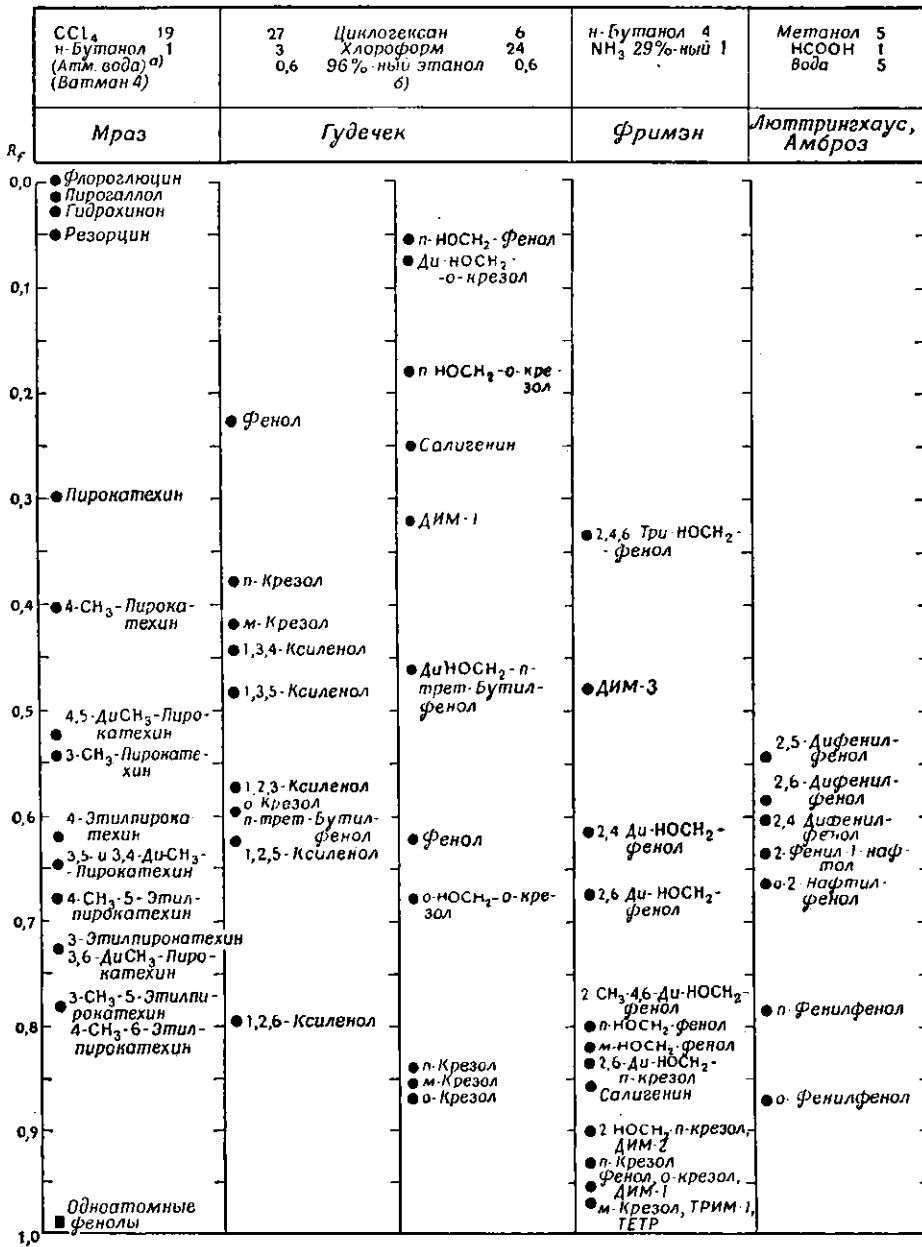
а) Боратный буфер: смесь 1000 мл 0,1М борной кислоты и 30 мл 1М NaOH, pH 8,7. Перед разделением высушенные полосы доводят до равновесного состояния в течение 3-6 час. в камере.

б) Фосфатный буфер: смесь 1000 мл 0,1М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 8 мл 0,1М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,7. Перед разделением доводят до равновесного состояния (3-6 час. в камере).

в) Значения  $R_f$  некоторых фенолальдегидов в этих системах приведены в табл. 47 (примечание ж). Салигенин в системе бензол-вода на бумаге, пропитанной боратым буфером, имеет  $R_f$  0,07, а на бумаге, пропитанной фосфатным буфером, 0,31.

г) Перед разделением высушенную пропитанную бумагу насыщают парами воды.

Таблица 35

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АЛКИЛФЕНОЛОВ, МЕТИЛОЛФЕНОЛОВ И АРИЛФЕНОЛОВ

а) Вода на дне камеры. В процессе работы необходимо поддерживать постоянную температуру. Перед началом хроматографирования следует поместить бумагу на несколько часов в камеру для насыщения водой.

б) Бумажу перед хроматографированием увлажняют в течение 4 суток (хранение над водой). Горизонтальная хроматография между двумя стеклянными пластинками. Уплотнение по краям достигается с помощью двух полосок фильтровальной бумаги, приклеенных к нижней пластинке раствором поливинилового спирта.

Для сильно липофильных фенолов пригодна система с обращенными фазами по Михеелю и Швеппе. Для двухатомных фенолов, метилолфенолов и монооксикислот, у которых диссоциация подавлена, пригодны системы бензол—уксусная кислота—вода, четыреххлористый углерод—*n*-бутанол и другие. Соотношения указаны в табл. 35. Для трехатомных фенолов и недиссоциированных ароматических ди- и триоксикислот рекомендуются следующие системы: амилацетат—вода, *n*-бутанол—бензол—уксусная кислота—вода, фенол—вода, *m*-крезол—вода. Для сильно гидрофильных фенолов, т. е. с еще большим числом гидроксильных и карбоксильных групп, пригодны такие системы, как *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5), и даже однофазные системы, например водный изопропанол и т. д. В системе *n*-бутанол—аммиак можно разделять также монокарбоновые кислоты, так как в нацело диссоциированной форме они гидрофильны.

Таблица 36

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АРИЛОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ  
(Шлегль и Зигель)

Растворитель: изоамиловый спирт—аммиак—вода (30:15:5), восходящий ток

Проявление: нагреванием до 140—150° в течение 30 мин удаляют аммиак, кислоты проявляют индикатором (Д 6 или 0,025%-ный раствор умбеллиферона в 33%-ном этаноле при pH 8—9)

Соединения подвергались хроматографированию в виде арилоксиуксусных кислот после реакции с монохлоруксусной кислотой (П46)

Производное	$R_f$	Производное	$R_f$
Фенола . . . . .	0,17	2,4,6-Триметилфенола . . . . .	0,63
<i>o</i> -Крезола . . . . .	0,33	<i>o</i> -Этилфенола . . . . .	0,53
<i>m</i> -Крезола . . . . .	0,31	<i>m</i> -Этилфенола . . . . .	0,49
<i>p</i> -Крезола . . . . .	0,31	<i>p</i> -Этилфенола . . . . .	0,49
2,3-Диметилфенола . . . . .	0,44	2-Метил-5-этилфенола . . . . .	0,66
2,4-Диметилфенола . . . . .	0,48	2,4,6-Триметил-5-этилфенола . . . . .	0,77
2,5-Диметилфенола . . . . .	0,47	<i>o</i> -Пропилфенола . . . . .	0,65
2,6-Диметилфенола . . . . .	0,51	<i>p</i> -Пропилфенола . . . . .	0,62
3,4-Диметилфенола . . . . .	0,41	<i>n</i> -трет-Бутилфенола . . . . .	0,67
3,5-Диметилфенола . . . . .	0,46	<i>n</i> -трет-Амилфенола . . . . .	0,70
2,3,5-Триметилфенола . . . . .	0,55		

Таблица 37

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОДОФИЛЛИНА  
(Иергенсен и Кофод)

Неподвижная фаза: формамид (0,58 г на 1 г бумаги)

Подвижная фаза: бензол

Проявление: см. Д 78 или Д 51

$\alpha$ -Пельтатин В . . . . .	0,01
$\alpha$ -Пельтатин А . . . . .	0,03
$\beta$ -Пельтатин В . . . . .	0,23
Пикроподофиллотоксин . . . . .	0,23
Подофиллотоксин . . . . .	0,30
$\beta$ -Пельтатин А . . . . .	0,35
$\beta$ -Нафтол . . . . .	0,46

Таблица 38

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  И КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ  
(Армстронг и сотрудники)

Приводимые значения получены при относительной влажности воздуха 20—60% и давлении 640 мм рт. ст.

Кислота	Изопропа- нол 8 Аммиак 1 Вода 1 а)	Бензол 2 Пропио- новая кис- лота 2 Вода 1	20%-ный водный KCl	н-Бута- нол 14 Пиридин 4 Диоксан 1 Вода 1	Флуорес- ценция в ультра- фиолетовых лучах	Диазотиро- ванная сульфани- ловая кислота (Д 51)	Диазотиро- ванный 4-нитро- анилин (Д 50)	Прочие реактивы	
								№ в разделе Д	окраши- вание
<b>o-Окси-</b>									
бензойная . . . . .	0,78	0,88	0,66	0,43	син.	св. ж.	кр.	53 102з	ф. о.
гиппуровая . . . . .	0,22	0,43	0,68	0,30	»	» »	»		
фенилуксусная . . . . .	0,76	0,57	0,86	0,49		к. о.	кр. ф.		
миндальная . . . . .	0,58 (0,68)	0,13	0,82 (0,88)	0,30 (0,68)		ж.	кр.		
фенилпропионовая . . . .	0,70	0,74	0,77	0,72		о.	кр. ф.	4	тм.
коричная . . . . .	0,35	0,70	0,44	0,75	св.	ж. о.	» »		
фенилмолочная . . . . .	0,59	0,29	0,84	0,28		» »	ф. кр.		
фенилпировиноградная	б) (0,54)	0,21 (0,88)	0,85 (0,44)	0,43 (0,87)	св.	о. (ж. о.)	кр. ф. (о. к.)		
<b>m-Окси-</b>									
бензойная . . . . .	0,39	0,53	0,70	0,50	тм. син.	о. ж.	тм. кр.	102з	о.
гиппуровая . . . . .	0,33	0,09	0,75	0,19	» »	» »	» »		
фенилуксусная . . . . .	0,46	0,49	0,83	0,46	» »	ж. о.	ф. кр.		
миндальная . . . . .	0,37	0,07	0,87	0,19		о. ж.	тм. кр.		
фенилпропионовая . . . .	0,54	0,61	0,77	0,68		ж. о.	ф. кр.	4	к.
коричная . . . . .	0,44	0,58	0,39	0,60		о. ж.	тм. кр.		
фенилмолочная . . . . .	0,51	0,12	0,86	0,21		ж. о.	ф. кр.		
фенилпировиноградная в)	б) (0,54)	0,13 (0,88)	«Хвост» (0,44)	0,50 б) (0,87)	син.	о. ж-к.	з.		
<b>p-Окси</b>									
бензойная . . . . .	0,23	0,55	0,54	0,68	Гашение	о. ж.	кр.	102з	о.
гиппуровая . . . . .	0,15	0,07	0,72	0,18	»	ж. о.	»		
фенилуксусная . . . . .	0,42	0,49	0,82	0,50	»	кр. ф.	син. ф.		

миндальная . . . . .	0,33	0,07	0,87	0,16	Гашение	о. ж.	кр.	4	з.
фенилпропионовая . . . . .	0,51	0,61	0,73	0,69		кр. ф.	кр. ф.		
коричная . . . . .	0,28	0,58	0,31	0,67		кр.	син. з.		
фенилмолочная . . . . .	0,45	0,13	0,85	0,19		кр. ф.	кр. ф.		
фенилпировиноградная	б)	0,15	«Хвост»	в)		о. кр.	тм. з.		
3-Метокси-4-окси-бензойная . . . . .	0,22	0,80	0,66	0,60	св.	кр. о.	кр. ф.	102а	о.
гиппуровая . . . . .	0,16	0,18	0,66	0,16	св. син.	о. кр.	» »		
фенилуксусная . . . . .	0,39	0,66	0,82	«Хвост»		кр.	з. к.		
миндальная . . . . .	0,28	0,16	0,84	0,20	син.	о. кр.	син. з.		
фенилпропионовая . . . . .	0,43	0,81	0,74	0,65		ф. кр.	з.		
коричная . . . . .	0,27	0,80	0,35	0,63		кр. (св.)	син. з.	4	з. к.
фенилпировиноградная	б)	0,25	«Хвост»	б)	»	о. кр.	з.		
n-Оксидинамоилглицин . . . . .	0,23	0,09	0,46	0,20	тм. син.	тм. кр.	син. з.	102а	о.
Ферулоилглицин . . . . .	0,18	0,19	0,35	0,18	син.	кр. ф. (св.)	» »	102з	»
Протокатеховая . . . . .	0,06	0,16	0,73	«Хвост»	Гашение	о. к.	к.	4	ч.
Гентизиновая . . . . .	0,68	0,26	0,53	0,34	син.	св.	ж.	4	»
α-Резорциловая . . . . .	0,35	0,09	0,64	0,39	тм. син.	к. о.	к.	4	з.
β-Резорциловая . . . . .	0,39	0,38	0,48	0,34	син.	тм. к.	тм. к.		
γ-Резорциловая . . . . .	0,77	0,11	0,50	0,48	тм. син.	» »	о. к.		
Сиреневая . . . . .	0,18	0,79	0,57	б)	Гашение	кр. (св.)	ж.		
Гомопротокатеховая . . . . .	0,06б)	0,15	0,75	«Хвост»		о. к.	к.	4	ч.
Кофейная . . . . .	0,05б)	0,19	0,36	0,53		» »	»	4	»
Гомогентизиновая . . . . .	0,05б)	0,09	0,90	0,34		» »	»	4	»
Кинуреновая . . . . .	0,52	0,16	0,37	0,21	син.	тм. кр.	кр. ф.	4	ч.
Ксантуреновая . . . . .	0,08	0,03	0,24	0,23	»		з.		
3-Оксиантраниловая . . . . .	0,12б)	0,38	«Хвост»	0,65	»	о. к.			

- а) Камера должна быть хорошо герметизирована.  
б) Вещество разлагается.  
в) Вещество в ряде систем давало несколько пятен.

Вахтмейстеру удалось добиться удачного распределения значений  $R_f$  для некоторых изомерных фенолов в системе *n*-бутанол — вода благодаря тому, что он хроматографировал бутанолом на бумаге, пропитанной боратым буфером. Все фенолы, которые могли образовать с борной кислотой комплексы (т. е. содержавшие гидроксильные группы в *орто*-положении), обладали сильно пониженными значениями  $R_f$ .

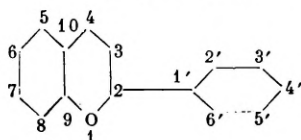
### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Помимо обычного визуального сравнения величин пятен с эталонами или в отдельных случаях их планиметрирования и сравнения с калибровочной кривой, что позволяет работать с точностью 5—6% (Фримэн [1, 2]), для количественных определений пользовались также колориметрической или спектрофотометрической оценкой элюатов. Так, например, Мраз, Вагнер и другие исследователи сначала элюировали определяемые вещества, в элюате проводили цветные реакции и колориметрировали возникающее окрашивание (II 47). Вагнер установил, что из простейших фенолов можно сравнительно точно определять лишь некоторые ди- и триоксibenзолы (резорцин и флороглюцин) путем азосочетания с диазотированной сульфаниловой кислотой и притом лишь с точностью 10%.

Широко распространенную в растительном мире хлорогеновую кислоту Джонсон и Шааль определяют, измеряя поглощение спиртовой вытяжки пятна при 324 мμ (II 48). Другие авторы измеряют интенсивность флуоресценции элюата (Куилли и Смит). Наннинга и Бинк измеряли непосредственно на хроматограмме при помощи фотоэлемента интенсивности флуоресценции пятен гентизиновой кислоты, содержащейся в моче после приема салицилатов.

## Флавоноиды

Флавоноиды имеют скелет, состоящий из 15 атомов углерода.



Они весьма распространены в растительном мире. Флавоноиды обладают значительной физиологической активностью. К ним в первую очередь относится большинство растительных красящих веществ, далее некоторые дубильные вещества, «витамины Р», регулирующие хрупкость и проницаемость капилляров и экономящие использование аскорбиновой кислоты в организме; некоторые спазмолитически активные растительные вещества и др. С химической точки зрения они являются свободными или связанными в форме гликозидов катехинами<sup>1)</sup>, дигидрохалконами, халконами, флаванонами, изофлаванонами, флаванолами, флавонами, изофлавонами, антоцианами, аурунами и флавонолами (перечисляемыми в порядке степени окисленности).

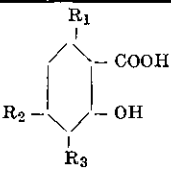
<sup>1)</sup> Катехины встречаются в природе лишь в свободном виде.— *Прим. ред.*

Классическими методами изучения этих веществ служили реакции осаждения и цветные реакции, определение растворимости, коэффициента распределения, температуры плавления и вращения плоскости поляризации, спектральный анализ и, наконец, получение производных. К новейшим способам относятся полярография и хроматография. При этом хроматография на бумаге не только сделала возможной работу с микроколичествами и анализ сложных смесей, но и охватила большинство цветных реакций, позволила заменить определение коэффициентов распределения (возможное лишь для чистых веществ) значительно более простым

Таблица 39а

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ — СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ  
ДЕНСИДОВ (ИЗ ЛИШАЙНИКОВ)

Все перечисленные кислоты флуоресцируют (большой частью синяя флуоресценция)

Кислота				<p><math>n</math>-Бутанол, насыщенный концен- трированным аммиаком (Мицунэ)</p>	<p>0,1 М <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>/ <math>n</math>-Бутанол 1 Бензол 1 Вода 1 (Вахтмейстер)</p>
	$R_1$	$R_2$	$R_3$		
Орселлиновая . . . . .	$\text{CH}_3$	$\text{OH}$	$\text{H}$	0,15	0,08
Эвернинная . . . . .	$\text{CH}_3$	$\text{OCH}_3$	$\text{H}$	0,53	0,30
Диваровая . . . . .	$\text{C}_3\text{H}_7$	$\text{OH}$	$\text{H}$	0,41	0,44
Диварикатиновая . . . . .	$\text{C}_3\text{H}_7$	$\text{OCH}_3$	$\text{H}$	0,77	0,75
Оливетолкарбоновая . . . . .	$\text{C}_5\text{H}_{11}$	$\text{OH}$	$\text{H}$	0,55	
Сферофолкарбоновая . . . . .	$\text{C}_7\text{H}_{15}$	$\text{OH}$	$\text{H}$	0,80	0,90
$\beta$ -Орцинкарбоновая . . . . .	$\text{CH}_3$	$\text{OH}$	$\text{CH}_3$	0,33	0,16
Гематомовая . . . . .	$\text{CH}_3$	$\text{OH}$	$\text{CHO}$		0,38
Ризоновая . . . . .	$\text{CH}_3$	$\text{OCH}_3$	$\text{CH}_3$	0,64	
Монометилловый эфир ор- циндикарбоновой кисло- ты . . . . .	$\text{CH}_3$	$\text{OCH}_3$	$\text{COOH}$	0,04	0,00

определением величины  $R_f$ , пригодным и для сложных смесей, и сделалась образцом для некоторых препаративных процессов, а именно распределительной хроматографии на колонках и противоточного распределения. Хроматография на бумаге облегчила изучение строения веществ на основании измерений значений  $R_f$  и  $R_M$ . Таким способом легко удалось доказать наличие водородного мостика, показать присутствие *о*-дигидроксильной группировки, определять число гидроксильных групп и т. д.

Бейт-Смит и Уэстолл дали несколько правил, касающихся связи между химическим строением и хроматографическим поведением в системах с менее полярной подвижной фазой, а именно для систем  $n$ -бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) и  $m$ -крезол — уксусная кислота — вода (48 : 2 : 50).

1. Величина  $R_f$  понижается с увеличением числа гидроксильных групп.  $\text{C}_{15}$ -вещества (флавоноиды), содержащие одинаковое число гидроксильных групп, имеют приблизительно равные значения  $R_f$  (см. правило 5).

2. Метилирование гидроксильной группы вызывает повышение величины  $R_f$  примерно на  $1/3 - 1/2$  того повышения, которое имело бы место при полном устранении гидроксильных групп из молекул. Другими словами, величина групповой константы ( $\Delta R_M$ ) для метоксильной группы значительно ниже, чем для гидроксильной.

3. Ацилирование может способствовать как повышению, так и понижению величины  $R_f$  в зависимости от характера ацильного радикала (ацетилирование обычно сильно повышает  $R_f$ ).

4. Гликозидирование обуславливает понижение величины  $R_f$ . Введение одного остатка глюкозы вызывает эффект приблизительно такой же, как и введение одной гидроксильной группы. Однако образование биозида (т. е. замещение одной гидроксильной группы биозой) понижает величину  $R_f$  менее, нежели образование дигликозида. Гликозидирование с помощью рамнозы не оказывает определенного влияния на  $R_f$ .

5. Орто- или вицинальное положение заместителей может обусловить исключения из вышеупомянутых правил, а именно в направлении повышения  $R_f$ .

Если, однако, желательно использовать хроматографические данные для определения структуры и расчета  $R_f$  (см. раздел о групповых константах на стр. 78), т. е. если речь идет о точной воспроизводимости  $R_f$ , следует придерживаться условий, указанных Бейт-Смитом и Уэстоллом (см. стр. 148).

Интересны также результаты, полученные другими авторами при изучении строения флавоноидов и других веществ по хроматографическим данным. Так Линдстедт на примере некоторых веществ (флавонов и флаванов, стильбенов и дибензилов) установила, что при гидрировании двойной связи  $R_f$  в сильно липофильных системах повышается<sup>1)</sup>.

Вахтмейстер доказал наличие вицинальных (орто-) гидроксильных групп в молекулах флавоноидов, хроматографируя исследуемое вещество в *n*-бутаноле, насыщенном водой, одновременно на двух полосках, из которых одна пропитана фосфатным, а другая — боратным буфером. Вещества с гидроксильными группами у соседних атомов углерода на бумаге с боратным буфером обладают значительно более низкими  $R_f$ .

Для изучения флавоноидов, а также других веществ большое значение имеют работы Симпсона и сотрудников, которые применяли хроматографию не только для доказательства наличия водородных мостиков в молекуле, но и для количественной оценки их прочности. Таким способом они определили, что оксигруппа в положении 3 и еще более в положении 5 ядра хромона образует с оксогруппой в положении 4 внутримолекулярный водородный мостик (хелатная структура), благодаря чему гидрофильность по сравнению с веществами, не содержащими гидроксильных групп при  $C_3$  или  $C_5$ , снижается ( $R_f$  повышается) вместо того, чтобы повышаться. Из значений  $R_f$  веществ, у которых гидроксильные группы при  $C_3$  и  $C_5$  были замещены, авторы сделали заключение, что в молекуле одновременно присутствуют два хелатных цикла, в которых участвуют водородные мостики. Изучение влияния заместителей в положениях 3', 4' и 7 дало дальнейшие сведения об электронной структуре этих веществ (Шоу и Симпсон).

Осима и Накабаяси показали существование параллелизма между значениями  $R_f$  некоторых флавоновых гликозидов и значениями  $R_f$

<sup>1)</sup> См. также в табл. 112 (стр. 570) в разделе индиолов значение групповой константы для двойной связи в подобной системе.

сахаров, входящих в их состав;  $R_f$  этих гликозидов зависели от характера сахара, присоединенного в положении 3.

Таким образом, хроматография на бумаге может дать нам целый ряд экспериментальных данных, позволяющих на основании хроматографического поведения составить представление о характере и соответственно о строении и тонкой структуре исследуемых неизвестных или неидентифицированных флавоноидных веществ.

### ПОДГОТОВКА ПРОБ

Ввиду значительных различий в растворимости флавоноидных веществ в воде и органических растворителях нет возможности дать единый способ выделения их из природных материалов. Следует прежде всего указать, что гликозиды оказываются значительно более растворимыми в воде, чем их агликоны, которые чаще всего извлекают из свежесобранных растений, растительных соков или из высушенного материала экстракцией органическими растворителями. Так, например, катехины, а также и другие типы веществ удается извлечь из растительных соков, водных вытяжек или лекарственного сырья продолжительной экстракцией эфиром или этилацетатом. Часто свежее растительное сырье, как, впрочем, и высушенный материал, экстрагируют полярными органическими растворителями, например метанолом, этанолом или ацетоном, остаток после упаривания растворителя растворяют в воде и водный фильтрат экстрагируют этилацетатом. Можно также сначала извлечь из остатка хлорофилл и воска с помощью сильно липофильных растворителей, перевести остаток в водный раствор и лишь тогда экстрагировать его органическим растворителем средней полярности. При последней операции очень часто происходит хорошее разделение гликозидов и агликонов.

Для сухих материалов, однако, удобнее систематическая экстракция несколькими растворителями с возрастающей полярностью: петролейным эфиром, бензолом, хлороформом, эфиром, этилацетатом. При экстракции петролейным эфиром из материала обычно удаляются только воска и прочие липофильные вещества, так как лишь немногие флавоноиды растворимы в петролейном эфире [например, некоторые флавоноиды негликозидного характера из коры и сердцевин хвойных растений (Линдстедт)].

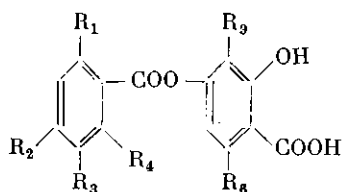
Очень удобны для выделения флавоноидов (в том числе и гликозидов) средний и основной ацетаты свинца, с помощью которых из водного раствора удается более или менее избирательно осадить вещества флавоноидного характера. Средний ацетат свинца является значительно более избирательным реактивом, так как он осаждает лишь флавоноиды, содержащие две свободные оксигруппы в *орто*-положении в кольце В. В тех случаях, когда в материале (растворе) флавоноиды такого типа отсутствуют, средний ацетат свинца осаждает главным образом балластные вещества, причем раствор осветляется, после чего основным ацетатом свинца осаждают флавоноиды. Суспензию свинцового осадка флавоноидов в спирте насыщают сероводородом, при этом флавоноидные вещества вновь выделяются и выпадает осадок  $PbS$ . Последний отфильтровывают или центрифугируют, а фильтрат упаривают. Из концентрированного раствора флавоноидные вещества нередко выкристаллизовываются.

Следует помнить, что антоцианы вследствие их сильно гидрофильного характера нельзя экстрагировать неполярными органическими растворителями. По данным Хаяси и сотрудников, лучше всего поэтому свежий

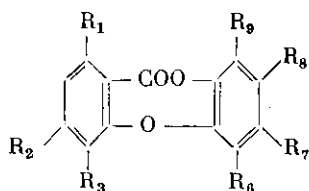
Таблица 396

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ФЕНОЛОКИСЛОТ ИЗ ЛИШАЙНИКОВ (ДЕПСИДЫ,  
ДЕПСИДОНЫ И УСНИНОВАЯ КИСЛОТА)  
(по данным Мицуно)

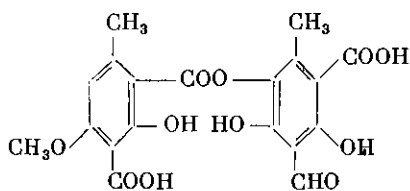
Обозна- чение соедине- ния	Кислота	н-Бутанол, насыщенный концентри- рованным NH <sub>3</sub>	н-Бутанол 5 Ацетон 1 Вода 2
		(восходящая)	
I	Леканоровая . . . . .	0,33	
II	Эверниновая . . . . .	0,61	
III	Диварикатиновая . . . . .	0,83	
IV	Сферофориновая . . . . .	0,88	
V	Перлатоловая . . . . .	0,93	
VI	Обтузатовая . . . . .	0,60	
VII	Барбатовая . . . . .	0,65	0,87
VIII	Дифрактовая . . . . .	0,80	0,83
IX	Беомицесовая . . . . .	0,50	0,64
X	Скваматовая . . . . .	0,28	0,28
XI	Атранориновая . . . . .	0,63	
XII	Оливеторовая . . . . .	0,74	
XIII	Микрофилловая . . . . .	0,91	
XIV	Тамноловая . . . . .	.	0,37
XV	Лобаровая . . . . .	0,54	
XVI	$\alpha$ -Коллатоловая . . . . .	0,66	
XVII	Алектороновая . . . . .	0,45	
XVIII	Салациновая . . . . .		0,50
XIX	Стиктовая . . . . .		0,52
XX	Норстиктовая . . . . .		0,62
XXI	Протоцетраровая . . . . .		0,45
XXII	Фумарпротоцетраровая . . . . .		0,38
XXIII	Физодаловая . . . . .		0,68
XXIV	Псоромовая . . . . .		0,62
XXV	Усниновая . . . . .	0,92	



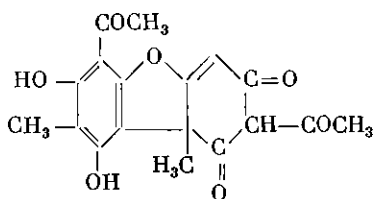
Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	Примечания
I	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	H		
II	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H		
III	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H		
IV	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	H		
V	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub>	H		
VI	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H		
VII	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		
VIII	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		
IX	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CHO	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		
X	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	COOH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		
XI	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CHO	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		Метилловый эфир
XII	CH <sub>2</sub> COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	OH	H	OH	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H		
XIII	CH <sub>2</sub> COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	OH	H	OH	CH <sub>2</sub> COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H		



Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
XV	COC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	COOH	OH		H	
XVI	CH <sub>2</sub> COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	COOH	OH		H	
XVII	CH <sub>2</sub> COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	OH	H	CH <sub>2</sub> COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	COOH	OH		H	
XVIII	CH <sub>3</sub>	OH	CHO	-C(OH)-O-CO-	OH	OH		CH <sub>2</sub> OH	
XIX	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CHO	-C(OH)-O-CO-	OH	OH		CH <sub>3</sub>	
XX	CH <sub>3</sub>	OH	CHO	-C(OH)-O-CO-	OH	OH		CH <sub>3</sub>	
XXI	CH <sub>3</sub>	OH	CHO	CH <sub>3</sub>	COOH	OH		CH <sub>2</sub> OH	
XXII	CH <sub>3</sub>	OH	CHO	CH <sub>3</sub>	COOH	OH		CH <sub>2</sub> OH	
XXIII	CH <sub>3</sub>	OH	CHO	CH <sub>3</sub>	COOH	OH		CH <sub>2</sub> OH	
XXIV	CH <sub>3</sub>	OH	CHO	COOH	H	OCH <sub>3</sub>		CH <sub>3</sub>	



XIV



XXV

материал (1—10 г) в первую очередь экстрагировать 1%-ным раствором HCl в метаноле (5—10 мл). Часть раствора можно сразу же исследовать хроматографически на присутствие антоциановых гликозидов с помощью подходящих реактивов. Для получения агликонов (антоцианидинов) часть раствора разбавляют равным объемом 20%-ной HCl, метанол удаляют на водяной бане и раствор затем кипятят в течение 2 мин, причем происходит гидролиз антоцианов. Из этого раствора агликоны извлекают изоамиловым спиртом. Дальнейшего концентрирования удается добиться,

Таблица 40

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ПУЛЬВИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ  
(пигментов из лишайников)  
(по данным Мицуно)

Вещество	н-Бутанол 4 28%-ный $\text{NH}_3$ 1	н-Бутанол 2 Этилацетат 2 28%-ный $\text{NH}_3$ 1	н-Бутанол 1 Этилацетат 8 28%-ный $\text{NH}_3$ 1	Этилацетат, насыщенный 28%-ным $\text{NH}_3$
Пульвиновая кислота (I) . . . . .	0,70	0,70	0,44	0,19
Ангидрид пульвиновой кислоты (II) . . . . .	0,40	0,40	0,06	0,00
Вульпиновая кислота (III) . . . . .	0,92	0,91	0,80	0,50
Пинастровая кислота (IV) . . . . .	0,90	0,88	0,73	0,40
Калицин (V) . . . . .	0,64	0,63	0,26	0,06
Эпанорин (VI) . . . . .	1,00	1,00	1,00	1,00

Строение	Обозначение соединения	$R_1$	$R_2$
	I III IV VI		

Строение	Обозначение соединения	R
	II V	H OH

Калицин обладает красной, прочие вещества — желтой флуоресценцией.

разбавляя вытяжку эфиром (4—10 частей по объему) и извлекая водой. Водную вытяжку, в которую перешел антоцианидин, промывают этилацетатом и взбалтывают снова с небольшим объемом амилового спирта. Эту последнюю вытяжку наносят на бумагу для хроматографирования.

### ОБНАРУЖЕНИЕ

Большинство флавоноидов отличается либо окраской, либо флуоресценцией. Бесцветны только флаваноны и катехины. Реактивы, с помощью которых флавоноидные вещества можно не только обнаружить, но нередко одновременно и охарактеризовать и даже идентифицировать, являются преимущественно обычными реактивами на фенолы, например аммиачный раствор окиси серебра (Бейт-Смит и Уэстолл, *Д* 4), хлорное железо (Бейт-Смит и Уэстолл, Шмидт и Ладеманн и др., *Д* 53) или железоаммонийные квасцы (Робертс и Вуд, *Д* 61). Можно применять и соли других металлов, например хлористый алюминий (Гейдж и сотрудники, *Д* 62), средний и основной ацетаты свинца, с которыми многие флавоноиды дают интенсивно окрашенные лаки (Гейдж и сотрудники, *Д* 63), и, наконец, бис-дiazотированный бензидин (Линдстедт, *Д* 52), а также и другие diaзотированные амины, например сульфаниловую кислоту (*Д* 51).

Кроме перечисленных реактивов, пользовались также реактивом Бенедикта (Гейдж и сотрудники, *Д* 64), спиртовым раствором едкого кали, раствором хлорида сурьмы (III) в четыреххлористом углероде, реактивом Уилсона на флавоны (Гейдж и сотрудники, *Д* 65), ванадатом аммония (Шмидт и Ладеманн, *Д* 66), тетрафенилдиборокисью (Ней), некоторыми стойкими солями diaзония (Ней), ванилином с соляной кислотой (Запрометов и Соболева, *Д* 67) и хлористым цирконием с лимонной кислотой (Хёрхаммер и Мюллер, *Д* 68).

В некоторых случаях на одной и той же хроматограмме можно применить несколько реактивов. Так, например, проявление хлорным железом не препятствует применению ванилина с соляной кислотой или diaзотированной сульфаниловой кислоты и т. п.

Хотя в табл. 41—43 будет указано, какое окрашивание дают отдельные вещества с перечисленными реактивами, здесь мы отметим предварительно, какие типы или даже какие функциональные группы в отдельных типах флавоноидов дают определенное характерное окрашивание. Такой обзор, впервые опубликованный Гейсманом, который мы здесь приведем в основных чертах, может оказаться полезным для более совершенного применения проявляющих реактивов с целью идентификации или установления строения хроматографируемых веществ.

### Ультрафиолетовое освещение

Флуоресценция флавоноидов может дать лишь некоторые сведения о их строении. В данном случае не существует никакой закономерности. Агликоны нередко ведут себя совершенно иначе, чем гликозиды. Кроме того, гликозиды одной группы (например, флавонол-3-гликозид) могут вести себя подобно агликонам другой группы (например, некоторым флавоном). Флавонолы флуоресцируют ярким зелено-желтым цветом. Это явление следует отнести за счет гидроксильной группы в положении 3, поскольку флавонол-3-гликозиды поглощают ультрафиолетовые лучи и проявляются на хроматограмме в виде темных пятен. Подобно этому пятна флавонов, не имеющих гидроксильной группы в положении 3,

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ПРОИЗВОД

Соединение	Системы растворителей				
	н-С <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ОН 4 уксусная кислота 1 вода 5	этилацетат, насыщенный водой	м-крезол 50 уксусная кислота 2 вода 48	уксусная кислота 15 вода 85	уксусная кислота 6 вода 4
	Гейсман <sup>б)</sup>	Гейдж и сотрудники	Гейсман	Гейдж и сотрудники	
<b>Флавоны, агликоны</b>					
флаван . . . . .	0,96		0,99		
4'-оксифлаван . . . . .	0,95		0,99		
5-оксифлаван . . . . .	0,96		0,98		
7-оксифлаван . . . . .	0,96		0,99		
3', 4'-диоксифлаван . . . . .	0,90		0,99		
акацетин . . . . .	(0,93)	0,94		0,00	0,71
апигенин . . . . .	0,92	0,87	0,88	0,15	0,66
ауранетин . . . . .	(0,92)	0,92		0,63	0,90
байкалеин . . . . .	(0,91)	0,97		0,24	0,79
хризин . . . . .	(0,94)	0,86		0,00	0,75
генкванин . . . . .	(0,92)	0,93		0,00	0,72
изовогонин . . . . .	(0,91)	0,92		0,00	0,81
лутеолин . . . . .	0,86		0,63		
норвигонин . . . . .	(0,89)	0,85		0,26	0,73
ороксилин А . . . . .	(0,95)	0,97		0,00	0,84
тектохризин . . . . .	(0,97)	0,98		0,27	0,89
трицин . . . . .	0,83				
вогонин . . . . .	(0,93)	0,94		0,00	0,79
<b>Флавоны, гликозиды</b>					
апигенин-7-глюкозид . . . . .	0,69		0,73		
апигенин-7-рамноглюкозид . . . . .	0,64		0,61		
диосмин . . . . .	(0,56)	0,07			
рейфолин . . . . .	(0,70)	0,08			0,87
<b>Флавонолы, агликоны</b>					
флавонол . . . . .	0,96	0,98	0,99	—	0,86
4'-метоксифлавонол . . . . .	0,96		0,99		
7-метоксифлавонол . . . . .	0,96		0,99		
3',4'-диоксифлавонол . . . . .	0,84		0,80		
галангин . . . . .	(0,97)	0,98		0,15	0,75
госсипетин . . . . .	(0,42)	0,59		0,12	0,43
гиперин . . . . .	0,70		0,38		
✓ кемпферол . . . . .	0,90	0,90	0,53	0,10	0,50
морин . . . . .	(0,92)	0,71		0,27	0,68
✓ мирицетин . . . . .	(0,64)	0,78		0,12	0,31
нортангеретин . . . . .	(0,76)	0,79		0,10	0,54
пагулетин . . . . .	(0,78)	0,81		0,10	0,50
кверцетин . . . . .	0,45	0,17	0,07	0,19	0,63
✓ кверцетин . . . . .	0,77	0,81	0,23	0,07	0,40
рамнетин . . . . .	0,87	0,92	0,69	0,08	0,60
робинетин . . . . .	(0,65)	0,41		0,08	0,32
<b>Флавонолы, гликозиды</b>					
госсидин . . . . .	(0,87)	0,02			
госсицитрин . . . . .	(0,59)	0,11		0,14	0,44
изокверцитрин . . . . .	0,72	0,40	0,21	0,46	0,74
кемпферитрин . . . . .	(0,79)	0,26		0,77	0,86
мирицитрин . . . . .	(0,74)	0,35		0,52	0,72

Таблица 41

НЫХ ФЛАВОНА

Проявление									
окраска пятен		щелочная среда <sup>а)</sup>		AlCl <sub>3</sub> (Д 62)		основной ацетат свинца (Д 63)		средний ацетат свинца (Д 63)	
види- мый свет	УФ	види- мый свет	УФ	види- мый свет	УФ	види- мый свет	УФ	види- мый свет	УФ
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	св. син.	ж. з.	ж. з.	—	син.	—	—	—	—
—	ч.	ж.	ч.	ж.	син.	—	—	—	—
—	ж. к.	ж.	ж.	—	—	—	—	—	—
—	син.	ж.	ж. з.	—	син.	—	—	—	—
—	кр. к.	—	—	з. ж.	з. ж.	ж.	ж.	—	з. к.
—	кр. к.	—	—	—	з. ж.	ж.	з. ж.	—	о. ж.
—	св. син.	—	—	—	син. б.	—	син. б.	—	син. б.
—	кр. к.	—	—	св. ж.	св. ж.	ж.	о. ж.	—	к.
—	кр. к.	—	—	—	ж.	ж.	з. ж.	—	о.
б. ж.	к.	ж.	з. ж.	ж.	к.	ж.	ж.	ж.	ж.
ж.	к.	ж.	з. ж.	св. ж.	ж.	ж.	ж.	ж.	ж.
св. ж.	кр. к.	—	—	к.	св. к.	ж.	к. ж.	ж. к.	к.
—	—	—	—	св. ж.	кр. к.	ж.	к.	ж. б.	тм. к.
б. ж.	ф.	—	—	ж.	ж.	св. ж.	к.	св. ж.	кр. к.
св. ж.	к.	ж.	ж. з.	—	—	—	—	—	—
—	к.	—	—	ж.	к.	ж.	к.	—	к. ж.
св. ж.	ж. к.	ж.	ж.	—	—	—	—	—	—
св. ж.	ж. к.	ж.	ж.	—	—	—	—	—	—
ж.	о.	—	—	—	ж. з.	ж.	о. ж.	ж.	ж.
св. ж.	ж. з.	ж.	ж.	св. ж.	син.	—	—	—	—
св. ж.	ж. з.	ж.	ж. з.	ж.	ж.	—	—	—	—
св. ж.	ж. з.	ж.	ж.	ж.	син.	—	—	—	—
св. ж.	ж. з.	ж.	ж. о.	св. ж.	ж.	—	—	—	—
ж.	св. ж.	—	—	ж.	ж.	к.	тм. к.	к.	тм. к.
св. ж.	к.	ж.	ж. к.	ж.	ж.	ж.	ж.	ж.	ж. з.
ж.	ж. з.	ж.	к. ж.	ж.	ж. з.	ж.	ж.	ж.	ж.
ж.	ж.	—	—	ж. з.	з. ж.	ж.	ж.	ж.	ж.
ж.	ж.	—	—	тм. ж.	ж. з.	св. ж.	о.	о.	кр.
ж.	ж. к.	—	—	ж.	ж. к.	ж.	ж. к.	ж.	ж.
ж.	з. ж.	—	—	ж.	з. ж.	к.	о. к.	кр. к.	кр. к.
св. ж.	о. кр.	ж.	ж. з.	к.	син.	ж. к.	к.	св. к.	к.
ж.	ж.	ж.	св. ж. з.	ж.	з. ж.	к.	о.	к.	о. к.
ж.	ж.	ж.	ж.	ж.	з. ж.	к.	о.	к.	ж.
ж.	ж. з.	—	—	ж.	з. ж.	кр. о.	о.	ж. б.	з. ж.
—	св. ж.	—	—	св. ж.	св. ж.	ж. б.	св. к.	ж. б.	к.
св. ж.	к.	—	—	ж.	ж.	к. ж.	к. ж.	ж. к.	к.
св. ж.	к.	ж.	з. ж.	ж.	ж.	ж.	о.	ж. к.	о. ж.
—	о. к.	—	—	ж.	ж. з.	ж.	о. ж.	ж.	ж.
тм. ж.	к.	—	—	св. ж.	ж. о.	к. ж.	к.	тм. ф.	к.

Соединение	Системы растворителей				
	н-С <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ОН 4 уксусная кислота 1 вода 5	этилаце- тат, на- сыщен- ный водой	м-крезол 50 уксусная кислота 2 вода 48	уксусная кислота 15 вода 85	уксусная кислота 6 вода 4
	Гейсман <sup>б)</sup>	Гейдж и сотруд- ники	Гейсман	Гейдж и сотрудники	
кверцемеритрин . . . .	0,48	0,50	0,19	0,45	0,73
кверцитрин . . . . .	0,85	0,50	0,38	0,46	0,74
робинин . . . . .	0,62	0,21	0,43	0,77	0,84
рутин . . . . .	0,66	0,15	0,18	0,62	0,75
ксанторамнин . . . .	0,62	0,02	0,35	0,68	0,82

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ФЛАВОНОВ.

Соединение	Системы растворителей				
	н-С <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ОН 4 уксусная кислота 1 вода 5	этилаце- тат, на- сыщен- ный водой	м-крезол 50 уксусная кислота 2 вода 48	уксусная кислота 15 вода 85	уксусная кислота 6 вода 4
	Гейсман <sup>б)</sup>	Гейдж и сотруд- ники	Гейсман	Гейдж и сотрудники	
Флаваноны, агликоны					
бутин . . . . .	0,91	0,98	0,73	0,55	0,81
эриодиктиол . . . . .	0,61		0,16		
гесперетин . . . . .	0,90	0,97	0,95	0,50	
гомозериодиктиол . . .	0,90	0,97	0,96	0,55	0,80
капуранин . . . . .	(0,90)	0,97		0,63	0,82
ликвиритигенин . . . .	0,95	0,97	0,90	0,62	0,86
нарингенин . . . . .	0,92		0,88		
пинобанксин . . . . .	(0,96)	0,98		0,68	0,87
пиноцембрин . . . . .	(0,97)	0,99		0,58	0,88
3,3',4',5,7-пентаокси- флаванон . . . . .	(0,78)	0,79		0,13	0,73
7-оксифлаванон . . . .	(0,95)		0,99		
Флаваноны, гликозиды					
гесперидин . . . . .	0,58	0,12	0,67	0,80	0,88
гесперетин-7-глюкозид	0,67				
нарингенин-7-глюкозид	0,71		0,72		
нариягин . . . . .	0,61	0,51	0,56	0,80	0,88
неогесперидин . . . . .	0,59	0,38	0,64	0,81	0,90
Флаванонол					
таксифолин . . . . .	0,86		0,50		
Халконы					
бутеин . . . . .	0,83		0,65		
кореопсин . . . . .	0,67		0,39		
стилопсидин . . . . .	0,65		0,14		
стилопсин . . . . .	0,47		0,14		
гесперидин-метилхал- кон . . . . .	(0,81)	0,79		0,98	0,89
2',3,4-триоксихалкон	(0,85)	0,93		0,19	0,68

К табл. 41 и 42:

а) Вещества были проявлены парами аммиака или опрыскиванием 1%-ным водным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

б) Интерполированы значения, приведенные в работе Гейджа и сотрудников.

Продолжение табл. 41

Проявление									
окраска пятен		щелочная среда <sup>а)</sup>		AlCl <sub>3</sub> (Д 62)		основной ацетат свинца (Д 63)		средний ацетат свинца (Д 63)	
видимый свет	УФ	видимый свет	УФ	видимый свет	УФ	видимый свет	УФ	видимый свет	УФ
св. ж.	кр. к.	ж.	ж.	ж.	ж.	ж.	о.	ж.	о. ж.
св. ж.	к.	ж.	тм. ж.	ж.	ж.	ж.	о.	ж. к.	о. ж.
св. ж.	ж. о.	ж.	ж. з.	ж.	ж.	ж.	ж.	ж.	ж.
св. ж.	о. к.	ж.	тм. з.	ж.	о. ж.	ж.	о.	ж.	о. к.
ж.	к.	ж.	ж.	ж.	ж.	ж.	о.	ж. к.	о. ж.

Таблица 42

## ФЛАВАНОНОЛОВ И ХАЛКОНОВ

Проявление									
окраска пятен		щелочная среда <sup>а)</sup>		AlCl <sub>3</sub> (Д 62)		основной ацетат свинца (Д 63)		средний ацетат свинца (Д 63)	
видимый свет	УФ	видимый свет	УФ	видимый свет	УФ	видимый свет	УФ	видимый свет	УФ
—	св. ж.	—	св. ж.	—	—	—	—	—	—
—	—	—	св. ж.	—	св. ж. з.	—	к.	к.	к.
—	св. з.	—	ж. з.	ж. б.	з.	—	ж. з.	—	св. ж.
—	св. ж.	—	св. ж.	—	—	ж.	ж. з.	—	—
—	св. ж.	—	св. ж.	—	ж. з.	—	—	—	—
св. ж.	ж. к.	—	ж. з.	ж. б.	ж. з.	ж.	ж. к.	—	к.
—	св. з.	—	—	ж. б.	з.	ж.	ж.	—	ж.
—	—	—	—	ж.	ж. з.	ж.	тм. к.	ж. к.	тм. к.
св. ж.	син. б.	—	ж.	св. ж.	син. б.	—	кр. к.	ж.	син. б.
—	—	—	ж.	—	ж. з.	—	—	—	—
—	—	—	ж.	—	ж. з.	—	—	—	—
—	св. ж.	—	ж.	—	син. б.	—	з. ж.	—	син. б.
—	—	—	ж.	—	з. ж.	—	ж.	—	ж.
—	—	—	ч.	—	—	—	—	—	—
ж.	ж. з.	о.	о.	ж. о.	ж. з.	—	—	—	—
ж.	к.	о.	кр. о.	—	—	о.	ж.	—	св. ж.
ж.	ж. к.	о.	о.	—	—	о.	кр. о.	о. ж.	кр. к.
ж.	ж. к.	о.	о.	—	—	о.	ж.	—	—
—	—	—	—	—	ж.	о.	ж.	—	св. ж.
ж.	ж.	—	—	о. ж.	о. ж.	о.	кр. о.	о. ж.	кр. к.

Таблица 43

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  И СПОСОБЫ ПРОЯВЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ВЕЩЕСТВ, РОДСТВЕННЫХ  
ФЛАВОНОИДАМ  
(по Гейсману)

Соединение	Системы растворителей				Проявление			
	н-бута- нол-ук- сусная кислота- вода (4 : 1 : 5)	м-кре- зол-ук- сусная кислота- вода (50 : 2 : 48)	фенол- вода (73 : 27)	дистил- лирован- ная вода	без прояви- теля		пары аммиа- ка	
					види- мый свет	УФ	види- мый свет	УФ
Дигидрохалконы флоретин <sup>а)</sup> . . .	0,93 )		0,81 <sup>в)</sup>					
флоридзин . . .	0,78	0,58	0,75		—	св. о.	—	св. о.
Изофлавоны псевдобаптизин	0,75	0,75		0,51	—	св. ж.	—	св. ж.
Бензилкумарано- ны дигидроауреу- зидин . . .	0,85	0,47	0,66	0,27	—	—	—	син.
Бензалькумарано- ны бензалькума- ранон . . . .	0,99	0,99	0,93	0,00	св. ж.	тм. ж.	св. ж.	тм. ж.
4,4',6-триокси- бензалькума- ранон . . . .	0,82	0,52	0,74	0,01	ж.	ж. з.		
4,4',6-тримето- ксибензальку- маранон . . .	0,97	0,99		0,01	св. ж.	син.	св. ж.	син.
3',4,4',6-тетра- метоксибен- залькумара- нон . . . . .	0,90	0,99	0,99	0,01	ж. з.	ж. з.	ж. з.	ж. з.
сульфуретин . .	0,87	0,65	0,70	0,01	ж.	ж.	ж. о.	ж. о.
Ауроны								
сульфуреин . .	0,60	0,48	0,69	0,03	ж.	ж.	кр. о.	о.
ауреузидин . .	0,66	0,18	0,29	0,01	ж.	ж. з.	о.	ж. о.
ауреузин . . .	0,36	0,09	0,35	0,01	ж.	ж.	о.	о.
чернуозид . . .	0,56	0,20	0,45	0,02	ж.	ж.	ж. о.	о.
лептозидин . .	0,80	0,79	0,80	0,01	ж.	ж.	о.	о.
лептозин . . .	0,55	0,54	0,79	0,03	ж.	ж.	кр. о.	о.
3',4',6,7-тетра- метоксинаурон	0,87	0,99	0,99	0,01	ж.	ж.	ж.	ж.

а) Данные заимствованы из работы Гейджа и сотрудников. В 15%-ной уксусной кислоте флоретин имеет  $R_f$  0,42, в 60%-ной уксусной кислоте — 0,73. С  $AlCl_3$  дает светло-синюю флуоресценцию.

кажутся коричневыми в ультрафиолетовом свете. Флаваноны и катехины<sup>1)</sup> не могут быть обнаружены в ультрафиолетовых лучах. Антоцианы обычно видны в ультрафиолетовом свете как темно-коричневые или черные пятна. Для халконов и ауранов, которые обладают собственной

<sup>1)</sup> L-Эпикатехингаллат и l-эпигаллокатехингаллат дают в ультрафиолетовом свете темно-синюю флуоресценцию.—Прим. ред.

желтой окраской (иногда и желтой флуоресценцией), наиболее характерным признаком служит резкое изменение окраски и флуоресценции при подщелачивании.

### Щелочные реактивы

Выдерживание хроматограмм в парах аммиака или опрыскивание их раствором соды вызывает характерные изменения окраски и флуоресценции флавоноидов.

При действии аммиака окраска флавонов в видимом свете углубляется до ярко-желтой, розовая или красная окраска антоцианов изменяется в серо-синюю или синюю, а желтая или оранжевая окраска халконов и аурунов превращается в интенсивно оранжевую или красную. Флаваноны и катехины даже при действии щелочей остаются в видимых лучах бесцветными. В ультрафиолетовом свете изменения цветов флуоресценции при действии паров аммиака происходят очень резко. Некоторые флавонол-3-гликозиды и флавоны (не имеющие заместителей в положении 3) при действии аммиака изменяют свою слабую желто-коричневую флуоресценцию на ярко-желтую или желто-зеленую. Флаваноны обнаруживаются в виде бледно-желтых, а катехины — в виде бледно-синих пятен.

Кроме того, известно, что соединения более чем с двумя соседними гидроксильными группами всегда дают цветные реакции со щелочами (образование окрашенных продуктов окисления).

### Соли металлов

С хлористым алюминием характерную флуоресценцию дают преимущественно флавоны, халконы и ауруны. С хлорным железом возникает хотя и характерное, но слабое окрашивание в видимом свете, однако в изменении интенсивности окраски не наблюдается никакой закономерности. В общих чертах можно сказать (см. предыдущий раздел о фенолах), что вицинальные триоксипроизводные (в кольце *B*) дают с хлорным железом темно-синее, а *орто*-диоксипроизводные — зеленое окрашивание. 3-Оксиполиалкоксифлавоны обычно образуют коричневое окрашивание. 5-Оксиполиалкоксифлавоны могут дать зеленое, фиолетовое или коричневое окрашивание. Хлористый цирконил с флавонолами дает желтую флуоресценцию, флавоны при этом не флуоресцируют. Дальнейшие сведения можно получить, опрыскивая хроматограмму лимонной кислотой. Цирконовый циклический комплекс с участием третьего и четвертого атомов углерода более прочен, нежели комплекс с участием четвертого и пятого атомов. Если гидроксильная группа в положении 3 гликозидирована, флуоресценция с хлористым цирконилом после гидролиза может быть обнаружена непосредственно на бумаге.

Основной и средний ацетаты свинца с некоторыми флавоноидами образуют интенсивно окрашенные лаки. Такие же лаки дают и другие соли (например, соли хрома, алюминия, железа, циркония и т. д.) с флавоноидами, обладающими следующими характерными чертами строения:

- 1) *о*-оксикарбонильная группировка, как в 5-оксифлавонах и 2'-оксихалконах;
- 2) 3-оксихромоновая группировка, как у флавонолов;
- 3) *о*-диоксигруппировка, как у производных пирокатехина.

С хлоридом сурьмы (III), а также с концентрированной серной кислотой халконы дают окрашивание от красного до красно-фиолетового, флаво-

ны — от желтого до желто-оранжевого. Дигидрохалконы, у которых отсутствует сопряжение между карбонильной группой и кольцом В, с этими реагентами не дают характерных цветных окрасок.

### Борная кислота

Флавонолы и флавоны, содержащие гидроксильную группу в положении 5, и 2'-оксихалконы дают ярко-желтые пятна, обладающие желто-зеленой флуоресценцией. Более яркие и разнообразные окраски дает тетрафенилдиборокись (Ней).

### Соли диазония

При помощи этих реактивов (диазотированного 4-амино-3,6-диметокси-4'-нитроазобензола — прочного черного К, диазотированного 1-амино-4-бензоиламидо-2,5-диэтоксibenзола — прочного синего ВВ, бис-диазотированного ди-*o*-анизидина — прочного синего В и диазотированного 5-нитро-2-аминоанизола — прочного красного В) также удастся различать флавоноидные вещества по возникновению различной окраски.

### Ванилин с соляной кислотой

Катехины с этим реактивом (Д 67) дают красное окрашивание. Эта реакция характерна для флороглюцина<sup>1)</sup> и флавоноидов с подобным же расположением гидроксильных групп.

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Для хроматографии флавоноидных веществ на бумаге было применено более 30 различных систем растворителей от наименее полярных, каков, например, верхний слой смеси лигроин — бензол — метанол — вода (50 : 50 : 1 : 50) (Линдстедт) или смеси эфир — лигроин — вода (5 : 1 : 5), до наиболее полярных, как, например, 15- или 60%-ная уксусная кислота (Гейдж и сотрудники), 2н. соляная кислота (Бейт-Смит) и, наконец, чистая вода, с помощью которой Робертсу и Вуду [2] удалось разделить оптически изомерные (+) и (—)-галлокатехины. Разделение при помощи воды пригодно и для отделения гликозидов от агликонов, остающихся в отличие от гликозидов на линии старта или имеющих низкие значения  $R_f$ . Однако в случае флавоноидов чаще всего пользуются системами *n*-бутанол (или амиловый спирт) — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5), фенол — вода и *m*-крезол — уксусная кислота — вода (48 : 2 : 50).

Для разделения гликозидов пригодны более гидрофильные, а для разделения агликонов — более липофильные системы.

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Для количественного определения можно пользоваться обычными методами; чаще всего применяют измерение поверхности пятен и сравнение их с эталонами (Кауч и сотрудники, Осима и сотрудники [1, 2] и др.).

<sup>1)</sup> Также и для резорцина.—Прим. ред.

Таблица 44

## ЗНАЧЕНИЯ R, АНТОЦИАНОВ И АНТОЦИАНИДИНОВ

Соединение	н-Бутанол 4 Уксусная кислота 1 Вода 5		Изоамиловый спирт 5 36%-ная HCl Вода 1		м-Крезол 48 Уксусная кислота 2 Вода 50		2н. HCl
	Бейт-Смит и Уэстолл <sup>ж)</sup>		Хаяси и со- трудники		Бейт-Смит и Уэстолл		
Апигенидин <sup>а)</sup>			0,82		1,00		
Цианидина <sup>а)</sup>			Разрушается	0,75	Разрушает- ся		0,69
3-глюкозид хризантемин			0,33	0,13			0,27
3-рамноглюкозид антирринин, космоцианин			0,37		0,25		0,28
3-гептробозирид мекоцианин			0,29		0,18		0,22
3,5-диглюкозид цианин . . . . .			0,16	0,03	0,19		0,08
3-галактозид идеин . . . . .			0,40	0,09			
3-ксилоглюкозид ликорицианин			(0,35) <sup>ж)</sup>	0,13			
3-ксилоглюкозид <sup>б)</sup> илицицианин			(0,32)	0,10			
Дельфинидина <sup>а)</sup>			Разрушается	0,30	Разрушает- ся		0,35
3-монозид из вербены . .			0,16		0,11		0,14
3-галактозид эмпетрин . . .			(0,14)	0,06			
3-глюкозид гиацин . . . . .			(0,09)	0,01			
3,5-диглюкозид дельфин . . . . .			0,11		0,03		0,06
Гирсутидина <sup>а)</sup>			Разрушается		Разрушает- ся		0,72
3-глюкозид . . . . .			0,61				
3,5-диглюкозид гирсутин . . . . .			0,38		0,69		0,07
Мальвидина <sup>а)</sup>			Разрушается	0,41	Разрушает- ся		0,53
3-глюкозид энин . . . . .			0,40		0,75		0,23
3-галактозид <sup>в)</sup> примулин . .			0,40		0,76		0,24
3-галактозид <sup>в)</sup> улигинозин			(0,32)	0,10			
3,5-диглюкозид мальвин . . . .			0,22	0,02	0,54		0,07
Пеларгонидина <sup>а)</sup>			Разрушается	0,75	Разрушает- ся		0,80
3-глюкозид каллистефин			0,59		0,67		0,52
3,5-диглюкозид пеларгонин			0,34	0,05	0,42		0,20
Пеонидина <sup>а)</sup>			Разрушается	0,62	Разрушает- ся		0,72
3-глюкозид оксикоксицианин			0,47		0,72		0,31
3,5-диглюкозид пеонин . . . . .			0,26	0,04	0,48		0,10
Сальвианин <sup>г)</sup> . . . . .			(0,42)	0,34			
Шизонин <sup>а)</sup> . . . . .			(0,43)	0,28			
Энсатин <sup>е)</sup> . . . . .			(0,36)	0,20			

а) Свободные антоцианидины можно разделить в системе уксусная кислота—HCl — вода (5 : 1 : 5) или молочная кислота — вода (1 : 1), по Хаяси и Абэ.

б) Не идентичен ликорицианину.

в) Вероятно, тождественны друг другу.

г) Сальвианин представляет собой соединение пеларгонина с 2 молекулами малоновой кислоты и 1 молекулой п-оксикоричной кислоты.

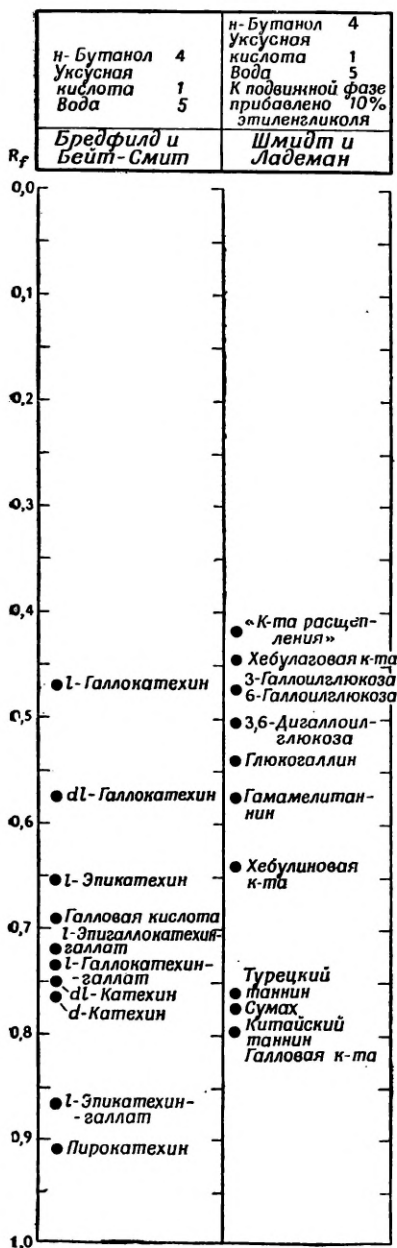
а) Шизонин — соединение цианина с п-оксикоричной кислотой.

е) Энсатин — соединение мальвидина с 2 молекулами глюкозы (в положении 3) и 1 молекулой п-оксикоричной кислоты.

ж) Данные, указанные в скобках, интерполированы из значений, приводимых Хаяси и со-трудниками.

Таблица 45

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ, КАТЕХИНОВ И РОДСТВЕННЫХ ИМ СОЕДИНЕНИЙ



При количественном определении этим методом катехинов и родственных веществ в чае Осима и сотрудники наблюдали поразительную закономерность: при одинаковой концентрации произведение поверхности пятна на величину  $R_f$  постоянно. Таким образом, можно было бы количественно определять даже неидентифицированные вещества этого же типа. Для системы *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 2 : 6) и проявления диазотированной сульфаниловой кислотой (бумага Тойо № 2) они нашли следующее соотношение:

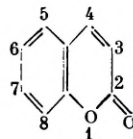
$$\lg Q = A \cdot R_f \cdot 0,004 + 1,2,$$

где  $Q$  — количество катехина в миллиграммах на 1000 мл и  $A$  — поверхность пятна в квадратных миллиметрах.

Тройер пользовался непосредственным измерением поглощения (в ультрафиолетовой области при 350 мμ) хроматограмм рутина и четырех других флавоноидных веществ для полуколичественного определения рутина в гречихе. Рутин и кверцетин из-за их значения в фармации и медицине чаще других подвергались количественным определениям. Другая возможность определения основана на спектрофотометрировании в ультрафиолетовой области элюата пятен после реакции с хлористым алюминием (Нагский и сотрудники, см. также работы Накабаяси и др.).

## Кумарины

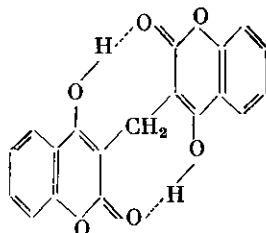
Кумарины по своему строению являются ненасыщенными ароматическими лактонами, имеющими следующий скелет:



До настоящего времени из природных источников выделено около пятидесяти кумаринов. Физиологическое значение этих веществ велико. К ним относятся рыбы яды растительного происхождения, ингибиторы

роста, душистые вещества, лекарственные средства и т. д. Большое число наиболее важных кумаринов не содержит свободных фенольных гидроксильных групп.

Большинство из рассматриваемых здесь веществ по своей полярности близко к флавонам; они относятся к мало гидрофильным веществам. О связи между строением и величиной  $R_f$  можно сказать то же, что и для флавоноидов. Любопытное обстоятельство было обнаружено для 3,3'-метилен-бис-(4-оксикумарина), т. е. для дикумарина и его производных, применяемых в качестве агентов против свертывания крови (пелентан, тромексан и др.). В противоположность простейшему 4-оксикумарину эти производные оказываются липофильными. Кноблох и Прохазка объясняют это образованием прочных внутримолекулярных хелатных комплексов (см. формулу), прочность которых еще более повышается благодаря возможности кумарино-хромоновой таутомерии. В то время как 4-оксикумарин в системе четыреххлористый углерод — уксусная кислота (100 : 2) имеет  $R_f$  0,1,  $R_f$  дикумарина составляет около 0,9 (вытянутое пятно).



В этой системе, подавляющей диссоциацию, вещество ведет себя на хроматограмме так, как если бы оно не обладало ни одной свободной гидроксильной или карбонильной группой.

### Подготовка образцов

Чаще всего кумарины извлекают из растительного сырья с помощью эфира. Свендсен выделил также смесь кумаринов из корней *Pimpinella magna* и *P. saxifraga* прямой микровозгонкой сухого сырья при атмосферном давлении. Полученные вещества он растворял в хлороформе и наносил на бумагу.

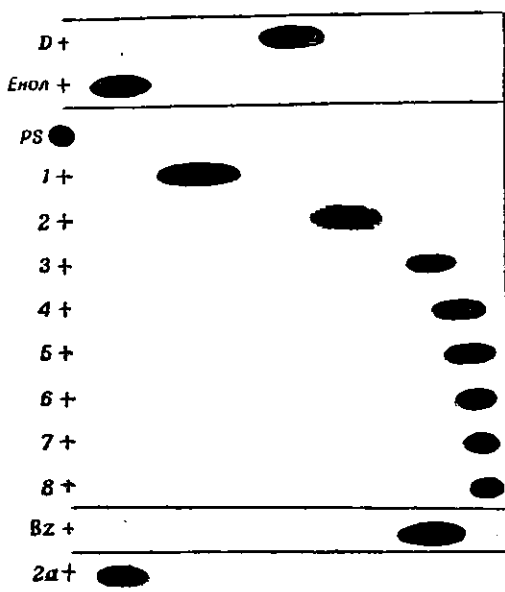
Сильнокислые производные 4-оксикумарина (широко применяемые при лечении болезней крови), которые обладают значениями рК ниже, чем у уксусной кислоты, можно извлечь из природных материалов (из подкисленной среды) встряхиванием с каким-либо органическим растворителем, применяемым для экстрагирования жиров. На практике оказалось удобным осаждать белковые вещества ацетоном или этанолом, подкислять фильтрат и экстрагировать последний эфиром, хлороформом или бензолом. Вытяжку можно непосредственно наносить на бумагу. Однако при достаточной концентрации веществ жидкий биологический материал (например, мочу, растительные соки и пр.) можно непосредственно нанести на бумагу.

### Обнаружение

Бесцветные производные кумарина большей частью открывают по их сильной флуоресценции в ультрафиолетовых лучах. Сам кумарин не флуоресцирует, но, по Фейглю, при освещении ультрафиолетовыми

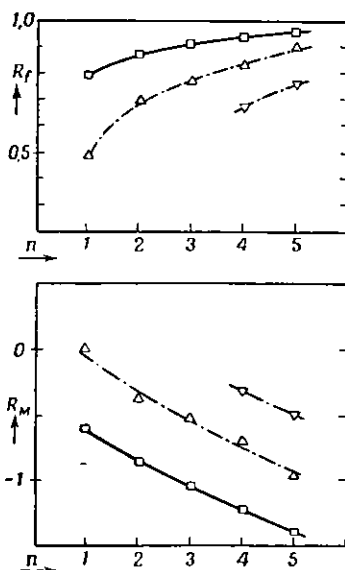
лучами начинают сильно флуоресцировать продукты его фотолиза. Производные 4-оксикумарина обычно флуоресцируют лишь слабо или не флуоресцируют вовсе.

При действии щелочей (1%-ное едкое кали, Д 69) флуоресценция растительных кумаринов обычно характерным образом изменяется. Некоторые производные 4-оксикумарина под действием щелочи при нагревании на бумаге благодаря декарбоксилированию превращаются в вещества,



Р и с. 141. Зависимость значений  $R_f$  от длины цепи эфирного остатка производных кумарина (Хайс).

Система: *n*-октанол, насыщенный 10%-ным аммиаком. *D*—дикумарин, *Енол*—1,1-бис-(4'-оксикумаринил-3')-пропен-1-ол-2; *PS*—бис-(4-оксикумаринил-3)-уксусная кислота; 1—8—сложные эфиры *PS* от метилового до *n*-октилового; *Bz*—бензиловый эфир *PS*; 2а—гликолевый эфир *PS*.



Р и с. 142. Значения  $R_m$  и  $R_f$  как функция числа атомов углерода в спиртовом остатке сложных эфиров (Хайс и Моравек).

Система: *n*-бутанол с аммиаком. □ — сложные эфиры бис-(4-оксикумаринил-3)-уксусной кислоты; △, ▽ — продукты обмена веществ из мочи кроликов.

флуоресцирующие желтым цветом. Многие производные 4-оксикумарина, содержащие свободную гидроксильную группу, вступают в сочетание с диазотированным *n*-нитроанилином, образуя окрашенные в желтый цвет производные (Хайс, Д 50); их можно также проявлять реактивом Фучика и Коржистека (хлористый сульфурил или хлор и основание; Д 70), с которым они дают окрашивание от оранжевого до красного. С помощью этого реактива удастся также проявлять и некоторые производные хромо-на и 4-оксикарбостирола (азотистого аналога 4-оксикумарина), а также другие ароматические кетоны. 4-Оксикумарины со свободной енольной гидроксильной группой благодаря их кислотности можно проявлять кислотно-основными индикаторами. Кумарины со свободной енольной гидроксильной группой можно проявлять с помощью реактивов на фенолы. Большинство кумаринов можно проявить также перманганатом калия.

Гаузнер и сотрудники проявляли радиоактивные пеллетан и дикумарин при помощи радиоавтографии.

## Системы растворителей

Благодаря разнообразию свойств этих веществ для их разделения пользовались системами различных типов: мало полярными системами, такими, как петролейный эфир — бензол — метанол — вода (50:40:19:1), петролейный эфир — гликоль (бумагу пропитывают гликолем, подвижной фазой служит петролейный эфир), бензин с бензолом или хлороформом в различных соотношениях — формамид (бумага пропитана формамидом, подвижная фаза — неполярные растворители), четыреххлористый углерод — уксусная кислота (100:2) и т. д.; системами средней полярности, например этилацетат — вода, а также типичными полярными системами, например водная фаза системы *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5) и даже чистая вода.

В системе петролейный эфир — гликоль Ридлю и Нейгебауэру легко удалось разделить даже изомерные кумарины, такие, как пимпинеллин и изопимпинеллин и др.

## Количественное определение

Количественные определения в этом ряду веществ до сих пор производились лишь редко.

Хайс (частично неопубликовано) определял продукты обмена пелентана и других антикоагулянтов визуальным сравнением интенсивности пятен или их колориметрированием после извлечения продуктов взаимодействия с реактивом Фучика и Коржистека.

Таблица 46

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА

$R_f$	Бумага, пропитанная 20%-ным водным раствором пропиленгликоля и высушенная на воздухе (15 час.) Бензин (65-70°) Разделение при 10°	Пропитка 0,1M $Na_2CO_3$ и <i>n</i> -бутанол, насыщенный водой	Пропитка 0,1M $Na_2HPO_4$ и <i>n</i> -бутанол, насыщенный водой
	Ридль и Нейгебауэр	Суэин	
0,0	● Бензотетраона-вая к-та ● Пимпинеллин ● 8-Метоксикумарин ● Ксантотоксин ● Герниарин ● Псорален ангели-цин	● Эскулин	
0,1	● изопимпинеллин ● Кумарин ● 4-Метилкумарин ● Бергаптен	● Дафнетин ● Эскулетин ● <i>p</i> -Кумаровая к-та ● Скиммин ● <i>o</i> -Кумаровая к-та	● Эскулин ● <i>p</i> -Кумаровая к-та ● <i>o</i> -Кумаровая к-та
0,2	● Императорин ● Изовергаптен		
0,3	● 4,7-Диметил-кумарин		● Эскулетин ● Скиммин
0,4		● Скополетин	● Дафнетин
0,5	● 3-Метилкумарин ● Сеселин ● изопимператорин ● 5-Фенилкумарин		
0,6		● Умбеллиферон	
0,7			● Скополетин
0,8			● Умбеллиферон
0,9		● Ксантотоксин ● Кумарин, герница ● Остол ● Лиметтин ● Бергаптен ● Императорин ● Острутин	● Ксантотоксин ● Герниарин ● Кумарин ● Бергаптен ● Лиметтин ● Остол ● Императорин ● Острутин
1,0			

## Фенолоальдегиды и фенолокетоны. Лигнины

По Фрейденбергу, лигнины являются скорее морфологическим понятием, нежели определенными химическими веществами. Практическое их значение состоит преимущественно в том, что окислением их можно превратить в ванилин и родственные фенолоальдегиды, имеющие широкое применение в химической и пищевой промышленности, фармацевтическом деле и т. д. В последнее время лигнины нашли применение в химии пластических масс.

Летучесть продуктов окисления лигнина в противоположность прочим альдегидам настолько невелика, что их большей частью удастся хроматографировать, не превращая в производные. Лишь наиболее летучие ароматические альдегиды нефенольного характера, как бензальдегид, фурфурол и др., удобнее хроматографировать в виде 2,4-динитрофенилгидразонов. Что касается связи между структурой и величиной  $R_f$ , то здесь справедливы те же правила, что и в случае фенолов.

### Подготовка проб

Лигнины можно получить экстракцией древесины (опилок) метанолом при повышенной температуре (150°, в автоклаве). Вытяжка представляет собой неоднородную смесь с характерным ультрафиолетовым спектром, которую можно непосредственно наносить на бумагу.

Окисление лигнинов в ванилин, сиреневый альдегид и *n*-оксибензальдегид чаще всего проводили нитробензолом в сильно щелочной среде (II 49, Бланд и сотрудники).

Ароматические альдегиды и прочие вещества, которыми пользуются для отдушки десертных вин (анисовый альдегид, ванилин, коричный альдегид, эвгенол, кумарин и пр.), экстрагируют из вина эфиром и сконцентрированную эфирную вытяжку наносят непосредственно на бумагу. С помощью хроматографии на бумаге можно открыть даже 1 мг альдегида в 1 л вина.

### Обнаружение

Продукты окисления лигнинов и прочие ароматические альдегиды и кетоны чаще всего проявляют классическим способом — 2,4-динитрофенилгидразином (Д 71). Большей частью, однако, их удастся обнаруживать уже на основании их цветной флуоресценции. Из прочих реактивов применяли, например, гидразинсульфат (Бергнер и Сперлих; Мюльбергер; Д 72), дающий с фенолоальдегидами пятна, обладающие характерной интенсивной флуоресценцией, бензидин (Ланьо и др., Д 73), флороглюцин с соляной кислотой (Кудзин и сотрудники), орцин с трихлоруксусной кислотой (Бевеню и Уильямс, Д 74), а также другие реактивы на фенолы (стр. 302).

### Системы растворителей

Наиболее часто используют очень мало полярные растворители, например бензин, бензол, дибутиловый эфир и др. Состав систем растворителей приведен в табл. 47. При использовании таких систем необходимо особенно следить за тем, чтобы перед разделением бумага была основа-

Таблица 47

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ФЕНОЛОАЛЬДЕГИДОВ И ФЕНОЛОКЕТОНОВ

Соединение	Бензин 7 Хлороформ 2 Метанол 1 Вода 5	Бензин 6 ди- <i>n</i> -Бутило- вый эфир 1 Вода 1	Гексан 9 Хлороформ 1 Вода 10 а)	Изобутанол 1 Бензол 9 Вода 10 г)	Бен- зол 1 Вода 1 г)
	Крафцль и Швейерс		Ньюкомб и Рид	Бланд	
<i>n</i> -Оксибензальдегид . . . . .		0,19		0,52	0,06
<i>m</i> -Оксибензальдегид . . . . .				0,93	0,40
Ванилин . . . . .			0,00 <sup>в)</sup>	0,45	0,34
Изованилин . . . . .				0,90	0,77
Вератровый альдегид . . . . .			0,21 <sup>б)</sup>	0,97	0,98
Сиреневый альдегид . . . . .	0,22			0,38	0,25
Триметоксибензальдегид . . . . .				0,98	0,98
<i>n</i> -Оксиацетофенон . . . . .				0,70	0,09
Ацетогваякон . . . . .			0,47 <sup>в)</sup>	0,75	0,65
Ацетосирингон . . . . .			0,88 <sup>б)</sup>	0,64	0,49
Ацетовератрон . . . . .					
4,α-Диоксипропиофенон . . . . .		0,05			
4-Окси-α-этоксипропиофе- нон . . . . .		0,45		0,32	0,15
α-Оксипропиованилон . . . . .	0,06				
α-Оксипропиосирингон . . . . .	0,63				
α-Этоксипропиосирингон . . . . .		0,20			
4-Оксифенилацетон . . . . .					
Сирингилацетон . . . . .	0,33				
1-Этокс-1-(4-оксифенил)- пропанон-2 . . . . .		0,42			
1-Этокс-1-(4-окси-3,5-диме- токсифенил)-пропанон-2 . . . . .	0,61				
4-Оксибензоилацетил . . . . .		0,38			
Сирингоилацетил . . . . .	0,44				
Бензил . . . . .				0,98	0,99
Ванилил . . . . .				0,05	0,03
Сирингил . . . . .				0,03	0,02
Прочие вещества <sup>а)</sup> , <sup>е)</sup> , <sup>ж)</sup>					

а) Бумага пропитана сульфитом натрия.

б) Эти вещества не разделяются на непропитанной бумаге; их значение  $R_f$  составляет 0,8.в) Эти вещества не разделяются на непропитанной бумаге; их значение  $R_f$  составляет 0,35

г) Бумага пропитана 0,05 М раствором бург.

д) В *n*-бутаноле, насыщенном аммиаком, ванилин имел  $R_f$  0,42, этилванилин—0,55 и пиперонал—0,89 (Ланьо).е) В *n*-бутаноле, насыщенном водой, на бумаге, пропитанной 0,1 М фосфатным буфером с pH 7,5, 5-формилванилиновая кислота имела  $R_f$  0,31, а 5-карбоксиванилин— $R_f$  0,67 (Леопольд).ж) В *n*-бутаноле, насыщенном водой, на бумаге, пропитанной 0,1 М боратым буфером с pH около 8,7, 3,4-диоксибензальдегид имел  $R_f$  0,28, а 2,4-диоксибензальдегид— $R_f$  0,92. Атранол при применении в качестве подвижной фазы бензола, насыщенного водой, имел  $R_f$  0,48 (Вахтмейстер).

тельно насыщена парами полярной фазы (воды) из атмосферы камеры, так как иначе пятна получаются растянутыми и разделение происходит плохо. Хорошей формы пятен удастся также добиться, пропитывая бумагу буферными растворами, например фосфатным буфером с pH 6,8 (Леопольд) или боратым буфером (Бланд и Стамм, II 50). Хорошее разделение происходило также в *n*-бутаноле, насыщенном 3—5%-ным аммиаком.

Особое значение имеет пропитка бумаги сульфитом натрия по Ньюкомбу и Риду. Ароматические альдегиды, которые реагируют с сульфитом

значительно легче, чем кетоны, дают на обработанной таким образом бумаге значительное понижение значений  $R_f$ , тогда как с кетонами (производные ацетофенона) этого не наблюдается. Этим явлением можно воспользоваться для достижения более благоприятного распределения значений  $R_f$  смеси альдегидов и кетонов, а также для микрооткрытия альдегидной группы. Ванилин, ацетованилон, вератровый альдегид и ацетовератрон на бумаге, пропитанной сульфитом, хорошо удалось разделить в системе гексан — хлороформ — вода (9:1:10), тогда как на непропитанной бумаге ванилин не отделялся от ацетованилона, а вератровый альдегид — от ацетовератрона.

### Количественное определение

Наиболее простой способ определения основывается на визуальной оценке величин (т. е. интенсивности пятен) в сравнении с эталонами (Леопольд). Более точен способ Бланда и Стампа, которые хроматографировали смесь продуктов окисления лигнина на бумаге, пропитанной бурой, вырезанные пятна элюировали в пробирке метанолом, а затем спектрофотометрировали элюат ( $\Pi$  50). При сушке хроматограмм и разделении происходили потери веществ вследствие летучести. Наибольшими были потери ванилина, доходившие за четыре часа (главным образом в течение первых 30 мин) до 6%. Поэтому следует работать возможно более быстро.

### ЛИТЕРАТУРА

- Armstrong M. D., Shaw K. N. F., Wall P. E., J. biol. Chem., 218, 293 (1956).
- Barton G. M., Evans R. S., Gardner J. A. F., Nature, 170, 249 (1952).
- Bate-Smith E. C., Westall R. G., Biochim. biophys. Acta, 4, 427 (1950).
- Bergner K. G., Sperlich H., Deutsche Lebensm. Rundschau, 47, 134 (1951).
- Bevenue A., Williams K. T., Chemist Analyst, 41, 5 (1952).
- Bland D. E., Australian J. appl. Sci., 6, 511 (1955). [1]
- Bland D. E., Ho G., Cohen W. E., Austral. J. sci. Res., 3, 642 (1950). [2]
- Bland D. E., Stamp C., Austral. J. appl. Sci., 6, 353 (1955). [3]
- Bose P. K., Chakraborty D. P., Abstr. Proc. 43rd Indian Sci. Congr., Part III.
- Bradfield A. E., Bate-Smith E. C., Biochim. biophys. Acta, 4, 441 (1950).
- Bray H. G., Clowes R. C., Thorpe W. V., Biochem. J., 51, 70 (1952). [1]
- Bray H. G., Lake H. J., Thorpe W. V., Biochem. J., 48, 400 (1951). [2]
- Bray H. G., Thorpe W. V., White K., Biochem. J., 46, 271 (1950). [3]
- Bray H. G., Thorpe W. V., Wood P. B., Biochem. J., 48, 394 (1951). [4]
- Casteel H. W., Wender S. H., Anal. Chem., 25, 508 (1953).
- Corcilius F., Arch. Pharm., 289, 81 (1956).
- Couch J. F., Naghski J., Krewson C. F., J. Am. Chem. Soc., 74, 424 (1952).
- Dalgliesh C. E., J. Chem. Soc., 1952, 3943.
- Durant J. A., Nature, 169, 1062 (1952).
- Erspamer V., Boretti G., Arch. intern. Pharmacodyn., 88, 296 (1951).
- Feigl F., Feigl H. E., Goldstein D., J. Am. Chem. Soc., 77, 4162 (1955).
- Fewster M. E., Hall D. A., Nature, 168, 78 (1951).
- Franc J., Jokl J., Chem. Listy, 49, 373 (1955). [1]
- Franc J., Latinák J., Chem. Listy, 49, 317 (1955). [2]
- Franc J., Latinák J., Chem. Listy, 49, 328 (1955). [3]
- Freeman J. H., Anal. Chem., 24, 955 (1952). [1]
- Freeman J. H., Anal. Chem., 24, 2001 (1952). [2]
- Freudenberg K., Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, III (red. Paech u. Tracey), Springer Verlag, Berlin, стр. 499 (1955).
- Fučík K., Kofístek S., Chem. Listy, 46, 190 (1952).
- Gage T. G., Douglas C. D., Wender S. H., Anal. Chem., 23, 1582 (1951).
- Geissman T. A., Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, III (red. Paech u. Tracey), Springer Verlag, Berlin, стр. 450 (1955).

- Hais I. M., Chem. Listy, 45, 76 (1951).  
 Hausner E. P., Shafer C. L., Corson M., Johnson O., Trujillo T.,  
 Langham W., Circulation, 3, 171 (1951).  
 Hayashi K., Abe Y., Noguchi T., Suzushino K., Pharm. Bull. (Japan),  
 1, 130 (1953).  
 Hörhammer L., Müller K. H., Arch. Pharm., 287, 310 (1954).  
 Hossfeld R. L., J. Am. Chem. Soc., 73, 852 (1951).  
 Hudeček S., Chem. Listy, 49, 60 (1955).  
 Johnson G., Schaal L. A., Science, 115, 627 (1952).  
 Jørgensen C., Kofod H., Acta chem. Scand., 8, 941 (1954).  
 Kirby-Berry H., Sutton H. E., Chain L., Berry J. S., Univ. Texas  
 Publ., 5109, 22 (1951).  
 Knobloch E., Procházka Ž., Chem. Listy, 47, 1285 (1953).  
 Kratzl K., Schweers W., Chem. Ber., 89, 186 (1956).  
 Kudzin S. F., De Baun R. M., Nord F. F., J. Am. Chem. Soc., 73, 4615 (1951).  
 Lagneau C., Ann. Falsific. Fraudes, 46, 432 (1953).  
 Latinák J., Chem. Listy, 48, 1354 (1954).  
 Leopold B., Acta chem. Scand., 6, 38, 49 (1952).  
 Lindstedt G., Acta chem. Scand., 4, 447 (1950).  
 Lüttringhaus A., Ambros D., Angew. Chem., 67, 305 (1955).  
 Maurice A., Mentzer C., Bull. Soc. Chim. biol., 36, 369 (1954).  
 Micheel F., Schweppe H., Mikrochim. Acta, 1954, 53.  
 Mitsuno M., Pharm. Bull. (Japan), 1, 170 (1953).  
 Mráz V., Chem. Listy, 44, 259 (1950).  
 Mühlberger F. H., Z. anal. Chem., 143, 21 (1954).  
 Naghski J., Fenske C. S., Couch J. F., J. Am. pharm. Assoc., 40, 613 (1951).  
 Nakabayashi T., Nishida S., J. agr. chem. Soc. Japan, 26, 333 (1952).  
 Nakanishi K., Fieser J. F., J. Am. Chem. Soc., 74, 3910 (1952).  
 Nanninga L., Bink B., Nature, 168, 389 (1951).  
 Neu R., Z. anal. Chem., 151, 321, 328 (1956).  
 Newcombe A. G., Reid S. G., Nature, 172, 455 (1953).  
 Oshima Y., Nakabayashi T., Imagawa H., J. agr. Chem. Soc. Japan,  
 25, 487 (1952). [1]  
 Oshima Y., Nakabayashi T., Nishida S., J. agr. Chem. Soc. Japan,  
 26, 367 (1952). [2]  
 Paris R., Bull. Soc. Chim. biol., 34, 767 (1952).  
 Quilley E., Smith M. J. H., J. Pharm. Pharmacol., 4, 624 (1952).  
 Riedl K., Neugebauer L., Monatsh. Chem., 83, 1083 (1952).  
 Riley R. F., J. Am. Chem. Soc., 72, 5782 (1950).  
 Roberts E. A. H., Wood D. J., Biochem. J., 49, 414 (1951). [1]  
 Roberts E. A. H., Wood D. J., Biochem. J., 49, xxxiii (1951). [2]  
 Shaw B. L., Simpson T. H., J. Chem. Soc., 1952, 5027.  
 Shibata S., Takito M., Tanaka O., J. Am. Chem. Soc., 72, 2789 (1950).  
 Schlögl K., Siegel A., Mikrochemie, 40, 202 (1953).  
 Schmidt O. T., Lademann R., Ann., 571, 41 (1951).  
 Simpson T. H., Garden L., J. Chem. Soc., 1952, 4638.  
 Stone I. E., Blundell M. J., Anal. Chem., 23, 771 (1951).  
 Svendsen A. B., Pharm. Acta Helv., 27, 44 (1952).  
 Swain T., Biochem. J., 53, 200 (1952).  
 Troyer J. R., Plant Physiol., 31, 71 (1955).  
 Vitek V., Českoslov. Farmacie, 1, 252 (1952).  
 Wagner G., Arch. Pharm., 286, 269 (1953). [1]  
 Wagner G., Pharmazie, 9, 741 (1954). [2]  
 Wachtmeister C. A., Acta chem. Scand., 5, 976 (1951). [1]  
 Wachtmeister C. A., Acta chem. Scand., 6, 818 (1952). [2]  
 Запрометов М. Н., Соболева Г. А., ДАН СССР, 46, 1205 (1954).

# СТЕРОИДЫ

---

*О. Сибликова*

Хроматография на бумаге является в настоящее время одним из аналитических методов, открывающих широкие возможности для химии, и прежде всего для биохимии стероидов. Этот метод позволил изучить многие насущные проблемы физиологии и биохимии желёз, выделяющих стероидные гормоны, и в первую очередь надпочечной железы. С помощью метода хроматографии на бумаге в сочетании с биохимическими методами анализа был, например, открыт один из активнейших минералокортикоидов — альдостерон. В настоящее время мы уже не можем представить себе изучение обмена стероидов исключительно с помощью обычных методов анализа, например колориметрического или флуорометрического, так как материал, предоставляемый биохимией, весьма широк и разнообразен. Контроль методом хроматографии играет важную роль при получении различных стероидных производных микробиологическим путем. Смесь образующихся при этом веществ бывает столь сложна, что применение других аналитических методов исключается.

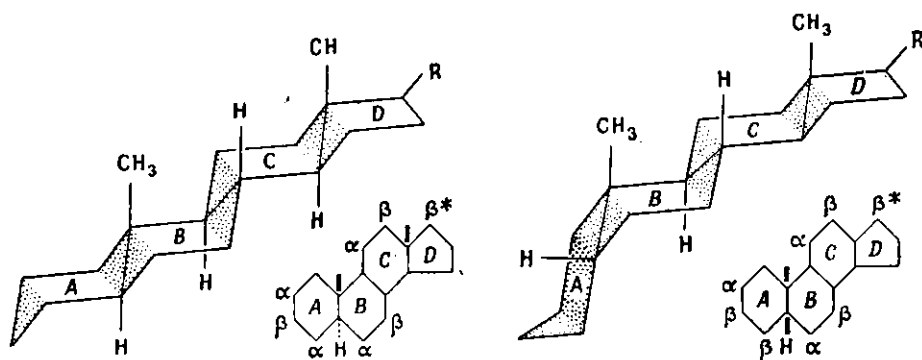
## *Связь между строением стероидов и значением $R_f$*

Хроматографическое поведение стероидов зависит от числа атомов углерода в молекуле, от количества и характера кислородсодержащих заместителей и наличия двойных связей. В системах с более полярной неподвижной фазой и менее полярной подвижной фазой стероиды с большим числом атомов углерода имеют более высокое значение  $R_f$ . Здесь имеются в виду атомы углерода, входящие в скелет молекулы стероида, атомы углерода алифатической цепочки, а также атом углерода ангулярного метильного радикала.

Норстероиды имеют более низкое значение  $R_f$ , нежели вещества, от которых они произошли, однако иногда их разделение бывает менее четким (Буп [3]). На величину  $R_f$  сложных эфиров оказывает влияние количество атомов углерода в ацильном радикале: например, пропионат кортизона имеет более высокое значение  $R_f$ , нежели его ацетат.

Хроматографическое поведение стероидных гликозидов зависит не только от строения генина, но и от числа и характера молекул сахаров.

Кислородсодержащие функциональные группы понижают величины  $R_f$ ; наибольшее влияние в этом отношении оказывает карбоксильная



Р и с. 143. Предпочтительная конформация стероидов (по Бартону).

Слева изображена 5a (алло-, транс- A/B), справа — 5b (изо- A/B). Для большей наглядности пространственное расположение изображено в виде модели из плотной бумаги. Заместители конфигурации β направлены вверх над плоскостью ядер. В соответствии с приведенными формулами заместителям было дано обозначение α и β по углу, который смыкается с плоскостью соответствующего цикла (конформация экваториальная — ε, аксиальная — α, см. стр. 81 и рис. 28). Некоторые экваториальные положения приведены в плоскостных формулах. Обозначение \* касается конформации по отношению к плоскости цикла C.

группа, далее следует гидроксильная и карбонильная группы и, наконец, сложноэфирная группа. Эпоксидная группа также сильно влияет на понижение величины  $R_f$ ; некоторые родственные вещества, отличающиеся друг от друга, например, лишь изолированной двойной связью, можно весьма тщательно разделить хроматографическим методом, переводя их предварительно в соответствующие эпоксиды (Рубин и сотрудники). Однако если при образовании эпоксида происходит экранирование гидроксильной группы, то такой эпоксид является более липофильным. Примером тому служит 14α, 15α-эпоксиацетат 17α-оксидезоксикортикостерона (Блум и сотрудники [1, 2]), в случае которого, вероятно, имеет место образование внутримолекулярных мостиков между 17α-гидроксильной группой и атомом кислорода эпоксигруппы, в результате чего величина  $R_f$  повышается по сравнению с соответствующей величиной для ацетата 17α-оксидезоксикортикостерона. Изменение величины  $R_f$  стероидов за счет окисления последних в кетоны или кислоты или путем их превращения в соответствующие эпоксисоединения или сложные эфиры с большим успехом можно использовать для идентификации стероидов на хроматограммах в микроанализе.

При наличии в молекулах стероидов гидроксильных групп имеет место следующая закономерность: наибольшее снижение величины  $R_f$  вызывает первичная гидроксильная группа, далее следует вторичная и, наконец, третичная (Шулл и сотрудники). Снижение величины  $R_f$

стероидов, обусловленное наличием гидроксильной группы, зависит от того, в каком месте молекулы находится эта группа, поскольку этим определяется возможность доступа к ней молекул более гидрофильного растворителя. О величине  $R_f$  в парных конфигурациях изомеров ( $\alpha$  и  $\beta$ ) в значительной степени можно судить по конформации группы. Эту зависимость изучал Савард [1, 2]. На рис. 143 приведена вероятная конформация стероидов по Бартону. Экваториальные заместители с пространственной точки зрения экранированы в меньшей мере, нежели аксиальные, и, следовательно, обладают большей способностью к образованию водородных мостиков с неподвижной полярной фазой. Эта зависимость иллюстрируется данными, приведенными в табл. 48.

Таблица 48

ВЛИЯНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ГИДРОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ НА ПОВЕДЕНИЕ  
НА ХРОМАТОГРАММЕ  
(по Саварду [2])

Значения подвижности взяты по отношению к подвижности андростерона, принятой за 1,0

Основные соединения	—	6 $\alpha$	16 $\alpha$	11 $\alpha$	6 $\beta$	11 $\beta$	14 $\alpha$	17 $\alpha$	21
---------------------	---	------------	-------------	-------------	-----------	------------	-------------	-------------	----

Система пропиленгликоль/бензин (лигроин)

Прогестерон . . . . .	2,30	0,026	0,047	0,068	0,137	0,178	0,175	0,280	0,45
$\Delta^4$ -Андростен-3,17-дион	1,70	0,023	—	0,028	0,080	0,100	0,044	—	—
Дезоксикортикостерон	0,45	0,005	—	0,006	0,016	0,025	—	0,029	—

Система пропиленгликоль/толуол

Дезоксикортикостерон	4,50	0,53	0,50	0,56	0,99	1,94	—	1,34	—
17 $\alpha$ -Оксидезоксикортикостерон . . . . .	1,34	—	—	0,025	0,075	0,15	—	—	—

Примечание: Сравнение 6 $\alpha$ - и 16 $\alpha$ -оксистероидов не проводилось.

Хорошим примером влияния конформации является поведение 5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ -ол-17-она и 5 $\beta$ -андростан-3 $\alpha$ -ол-17-она. В первом случае, при *транс*-соединении ядер A/B, 3 $\alpha$ -оксигруппа расположена аксиально и вещество имеет большую величину  $R_f$ ; во втором случае, при *цис*-соединении ядер A/B, 3 $\alpha$ -оксигруппа является экваториальной и вещество имеет меньшую величину  $R_f$  (Буш [3]). У производных прогестерона величину  $R_f$  в меньшей степени сокращает гидроксильная группа, находящаяся в положении 21 и 17, что можно объяснить образованием водородного мостика между гидроксилом, находящимся в положении 21, и соседней кетогруппой. Подвижность производных прегнана и андростана сильнее всего снижается гидроксильной группой, находящейся в положении 6  $\alpha$ . Эта группа далеко выдвинута, благодаря чему хуже всего защищена (Савард [1, 2]).

Изолированная двойная связь не оказывает заметного влияния на величину  $R_f$ , и лишь с большим трудом можно отделить ненасыщенное соединение от насыщенного (например,  $\Delta^5$ -андростен-3  $\beta$ -ол-17-он от 5  $\alpha$ -андростан-3  $\beta$ -ол-17-она, Буш [3]). Величина  $R_f$  3-кетостероидов уменьшается благодаря влиянию двойной связи в следующем порядке:  $\Delta^0$ ,  $\Delta^1$ ,  $\Delta^4$ ,  $\Delta^{1,4}$ ,  $\Delta^{1,4,6}$  (Савард [1, 2]). Согласно Диршерлу и Герхардсу [2], уменьшение величины  $R_f$  в системе с неподвижным пропиленгликолем после

Таблица 49

ВЛИЯНИЕ ХАРАКТЕРА РАСТВОРИТЕЛЯ В НЕПОДВИЖНОЙ И ПОДВИЖНОЙ  
ФАЗАХ НА ВЕЛИЧИНУ ГРУППОВЫХ КОНСТАНТ ( $G$ ) ПРОИЗВОДНЫХ  
ПРЕГНАНА (Мадек)

		Циклогексан 1 Бензол 1	Бензол	Бутилацетат <sup>а)</sup>
	Прогестерон, $R_M$	-0,8	-1,5	-0,95
		$G_0^б)$	$\Delta G_1^в) = G_1 - G_0$	$\Delta G_2 = G_2 - G_0$
Пропиленгликоль	11-CO	+0,5	+0,1	-0,05
	21-OH	+0,75	+0,1	-0,2
	11 $\alpha$ -OH	+1,75	-0,05	-0,74 $\downarrow$ г)
	11 $\beta$ -OH	+1,15	+0,05	-0,55 $\downarrow$
	14 $\alpha$ -OH	+1,25	+0,05	-0,64
	17 $\alpha$ -OH	+1,05	+0,05	-0,55 $\downarrow$
Формамид	Прогестерон, $R_M$	-1,0	-1,75	-1,35
		$G_3$	$\Delta G_4 = G_4 - G_3$	$\Delta G_5 = G_5 - G_3$
	11-CO	+0,8	+0,1	-0,1
	21-OH	+1,05	0,0	-0,1
	11 $\alpha$ -OH	+1,9	-0,25	-0,74
	11 $\beta$ -OH	+1,35	-0,15	-0,64
	14 $\alpha$ -OH	+1,45	-0,15	-0,54
	17 $\alpha$ -OH	+1,1	0,0	-0,45 $\downarrow$

а) При пропитывании бумаги пропиленгликолем был использован бутилацетат с бензолом (1 : 1).

б)  $G = R_{M\text{произв.}} - R_{M\text{прогестерон.}}$

в) Величины  $\Delta G$  представляют собой разность между групповой константой в данной системе и в системе циклогексан-бензол, которую мы взяли за основу. Знак минус означает, что величина групповой константы в данной системе ниже, чем в основной, знак плюс показывает, что имеет место обратная зависимость.

г) Величины со знаком  $\downarrow$  гораздо ниже, чем значения кетогруппы или 20-кето-21-оксиселатного соединения в данной системе, поскольку, вероятно, происходит взаимодействие их свободной гидроксильной группы с бутилацетатом, который является акцептором протонов.

введения одной или двух двойных связей, сопряженных с карбонильной группой, можно объяснить тем, что при пространственно более выгодном приближении донора протонов (пропиленгликоля) происходит сдвиг электронов системы сопряженных связей в направлении к кислороду. Последний, таким образом, становится отрицательно заряженным и, следовательно, способным образовывать более прочные водородные мостики.

Зависимость между строением стероида и его хроматографическим поведением в различных системах, в которых используется одна и та же неподвижная фаза, изучал Мацек с помощью групповых констант и констант положения (частное сообщение). Данные табл. 49 показывают, что при использовании растворителей, которые могут быть акцепторами протонов (например, бутилацетат), соединения со свободными гидроксильными группами перемещаются относительно быстрее, нежели соединения с кетогруппой или хелатообразующей гидроксильной группой (21-окси).

Упомянутую зависимость между структурой стероидов и их хроматографическим поведением изучали преимущественно в системах с пропиленгликолем и формамидом в качестве неподвижной фазы. В основном эта зависимость распространяется и на другие системы с более полярной неподвижной фазой, например на системы Буша с неподвижным водным раствором метилового спирта. При замене метилового спирта водным раствором *трет*-бутилового спирта имеет место аномальное явление, состоящее в том, что кетогруппа уменьшает величину  $R_f$  более сильно, нежели гидроксильная группа (например, у 11-дегидрокортикостерона по сравнению с кортикостероном; Эберлейн и Бонджиованни; см. табл. 52). Это обстоятельство легко можно объяснить тем, что образование водородного мостика между третичной гидроксильной группой спирта неподвижной фазы и вторичной гидроксильной группой стероида пространственно менее выгодно, нежели образование водородного мостика между третичной гидроксильной группой спирта неподвижной фазы и кетогруппой стероида. Зависимость между структурой изомеров положения и их хроматографическим поведением также носит аномальный характер в системах Пехета, который пользовался комбинацией растворителей, аналогичных растворителям Буша, но с той лишь разницей, что бумагу пропитывал неподвижной фазой, содержащей воду. Дигидрокортизон с экваториальной 3  $\beta$ -гидроксильной группой, 11-кетогруппой и двойной связью в кольце А имеет в некоторых системах, в противоположность своему изомеру, кортизолу с аксиальной 11 $\beta$ -гидроксильной группой и  $\Delta^4$ -3-кетогруппой, меньшее значение  $R_f$ , а в других, наоборот, большее.

Мы предполагаем, что зависимости, которые имеют место в системах с более полярной неподвижной фазой, будут иметь противоположное значение в системах с противоположным характером фаз, т. е. с более полярным подвижным растворителем.

## Методика

### ОБНАРУЖЕНИЕ

Для обнаружения пятен стероидов можно использовать физические свойства (например, способность  $\Delta^4$ -3-кетостероидов поглощать в ультрафиолетовой области) или цветные и флуоресцентные реакции с различными реактивами. Поглощение в ультрафиолетовой области фиксируется фотографиями (Буш [21]), фотокопиями (Диршерл и Дарденне [1]) или прямой фотометрией (Хейнс и Дрейк; Тенпент и сотрудники). Поверхностная активность или несмачиваемость поверхности находит применение при негативном окрашивании (Д 16).

Механизмы многих цветных и флуоресцентных реакций стероидов точно не установлены. С практической точки зрения эти реакции можно разделить на три группы.

### РЕАКЦИИ С НИЗКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

К наименее специфичным реактивам относятся серная и 15%-ная фосфорная кислоты (Негер и Ветштейн [1]), а также хлориды металлов. Обе упомянутые кислоты вызывают весьма сильную флуоресценцию (Д 1 и Д 75). Окрашивание, вызываемое серной кислотой в видимом свете, является более интенсивным по сравнению с окрашиванием, вызываемым фосфорной кислотой, которое весьма чувствительно к условиям проведения реакции. Преимуществом обоих методов является их значительная чувствительность (для некоторых веществ до 1 мкг на хроматограмму). Проявление фосфорной кислотой можно усилить, прибавляя к реактиву фосфорный ангидрид (100%-ная фосфорная кислота; Новажинский и Штейермарк [2]). Недостатком серной кислоты является обугливание

Таблица 50

РЕАКЦИЯ НЕКОТОРЫХ СТЕРОИДОВ С СЕРНОЙ И ФОСФОРНОЙ КИСЛОТАМИ

Стероид	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
	видимый свет	УФ	видимый свет	УФ
Δ <sup>4</sup> -Андростен-3,17-дион		ж. ++		ж. о. ++
5α-Андростан-3,17-дион		ж. к. ++		ф. (H) <sup>a</sup>
Андростерон . . . . .		ж. к. ++		б. ++
Дегидроэпиандростерон	ж. к. ++	Гашение	к. з. ++	ж. +
Тестостерон . . . . .		з. ++	р. +	о. р. ++
17α-Тестостерон . . . . .			ф. (H)	ж. (H)
17α-Метилтестостерон	о. ++	о. ++	ж. +	кр. (H)
Эстрон . . . . .	ж. к. +	ж. +++		ж. о. +
17β-Эстрадиол . . . . .	ж. к. +	ж. з. +++		син. з. +++
Этинилэстрадиол . . . . .	кр. ++	ж. о. ++		з. ++
17α-Эстрадиол . . . . .			кр. (H)	р. +
Эстриол . . . . .		ж. к. ++		ж. (H)
Прогестерон . . . . .		з. +++		ж. з. +++
17α-Окспипрогестерон			к. ++	р. ф. +++
11-Кетопрогестерон . . . . .	син. +	син. ++		
Дезоксикортикостерон	кр. к. +	б. ++	ж. +	о. +++
Ацетат дезоксикортикостерона . . . . .				кр. (H)
Кортизон . . . . .	ж. ++	ж. +		ж. ++
Кортикостерон . . . . .				син. +++
Кортизол . . . . .				з. +++ (H)
17α-Оксидезоксикортикостерон . . . . .			син. ф.	ж. з. +++
				о. кр. ++ (H)

<sup>a</sup>) Данные, обозначенные (H), заимствованы из работы Негера и Ветштейна [1].

и разрушение бумаги. Галохромию и галофторию стероидов с кислотами можно объяснить на основе явлений мезомерии, имеющих место при двойных связях исходных веществ или продуктов их дегидратации (Пезэ [1, 2]), и в частности образованием карбониевых ионов (Заффарони [2]).

Хлориды металлов применяются в различных реактивах: хлористый цинк, по Нику с сотрудниками (Д 76); хлористый цинк с хлористым бензоилом, по Негеру и Ветштейну [2] (Д 77); треххлористая сурьма (различные авторы) и пятихлористая сурьма, по Мак-Магону с сотрудниками, Кричевскому, Кирку и др. Наиболее пригодна реакция с треххлористой сурьмой (Д 78). При этом цвет флуоресценции различен. Окрашивание в видимом свете является более сильным по сравнению с окрашиванием, вызываемым фосфорной кислотой. Чувствительность в большинстве случаев меньшая, нежели при проявлении кислотами. При сравнении отдельных видоизменений в получении реактивов, содержащих треххлористую сурьму, например прибавление уксусного ангидрида, хлорирование (Шулл и сотрудники, Д 78б и Д 78в), растворение в ледяной уксусной кислоте (см. Д 78в) или в нитробензоле (Розенкрантц, Д 78д), нельзя говорить

Таблица 51

РЕАКЦИЯ НЕКОТОРЫХ СТЕРОИДОВ С ТРЕХХЛОРИСТОЙ СУРЬМОЙ<sup>а)</sup>

Стероид	SbCl <sub>3</sub> в CHCl <sub>3</sub>						SbCl <sub>3</sub> в нитробензоле	
	Д 78а		Д 78б (ацетангидрид)		Д 78в (хлорирование)		Д 78д	
	Негер и Ветштейн [1]		видимый свет	УФ	видимый свет	УФ	Розенкрантц	
	видимый свет	УФ					видимый свет	УФ
5α-Андростан-3,17-дион	—	ф.	ж.	ж.	з.к.	ж.о.	—	тм.
Δ <sup>4</sup> -Андростен-3,17-дион	—	ф.	—	ж.	—	ж.	кр.	кр.о.
Андростерон . . . . .	—	—	с.син.	ж.	ф.син.	ж.	к.кр.	кр.о.
Дегидроэпиандростерон	—	кр.	с.ф.	о.	ф.	о.	син.з.	кр.о.
Тестостерон . . . . .	син.	кр.	—	—	—	—	син.	кр.о.
17α-Тестостерон . . . . .	—	—	ф.	тм.	кр.о.	тм.	р.о.	о.
Эстрон . . . . .	—	—	ж.о.	тм.ж.	о.	ж.ф.	ж.о.	ж.ф.
Эквилян . . . . .	—	—	с.р.	тм.ж.	о.	ж.ф.	к.ф.	—
Эквиленин . . . . .	—	—	—	син.ф.	р.	ж.о.	р.	о.
Эстриол . . . . .	—	—	ж.	ж.	ж.	о.	—	тм.
Прогестерон . . . . .	кр.	кр.	—	о.	ж.к.	о.	р.	кр.
Δ <sup>5</sup> -Прегнен-3β-ол-20-он	—	о.	ж.к.	о.	ж.к.	о.	кр.к.	тм.
Дезоксикортикостерон	—	с.син.	ж.	—	—	—	—	тм.
Кортикостерон . . . . .	—	с.син.	—	—	—	—	—	тм.
Кортизон . . . . .	—	з.	—	—	—	—	—	тм.
Кортизол . . . . .	ж.	син.	син.ф.	р.ф.	р.ф.	син.	—	—
Холевая кислота . . . . .	кр.	ф.	р.	р.	р.о.	син.р.	—	—
Дезоксихолевая кислота	—	—	р.ф.	тм.о.	—	тм.	син.ф.	син.
Холестерин . . . . .	с.	с.	з.ф.	тм.к.	с.з.	син.	—	—
Эргостерол . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—

<sup>а)</sup> Данные относятся к 20–50 мкг стероидов; однако для многих соединений чувствительность более высокая.

о том, какой способ проявления является наилучшим. Проявление треххлористой сурьмой имеет то преимущество, что позволяет сохранять хроматограммы в течение длительного времени.

С помощью упомянутых реакций можно разделять многие изомеры, как это показано в табл. 50 и 51.

Из способов проявления с помощью альдегидов и серной кислоты (Негер и Ветштейн [1]; Санье и сотрудники [1, 2]) хорошо зарекомендовало себя для определения некоторых стероидных кислот проявление *n*-диметиламинобензальдегидом (Д 102, Прохазка [1]).

Большое число стероидов (главным образом  $\Delta^4$ -3-кетостероиды) дает с йодом цветные реакции, имеющие оттенок от желтого до красно-бурого. Лучше всего зарекомендовал себя водный раствор йода (Д 2а, Заффарони и сотрудники [5]).

### СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ГРУППОВОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ

Можно считать избирательным проявление, основанное на восстановительной способности  $\alpha$ -кетольной группы при  $C_{17}$ . Для этой цели можно пользоваться аммиачным раствором азотнокислого серебра (Заффарони и сотрудники, Д 4), фосфорномолибденовой кислотой (Кричевский и Кирк [2], Д 22), арсеномолибдатом (Шварц, Д 79) или солью тетразолия (Бертон и сотрудники [3], Д 5). Наиболее чувствительна реакция со щелочным раствором хлористого 2,2-*n*-(ди-*o*-метокси)-дифенилен-3,3', 5,5'-тетрафенилдитетразолия, так называемого синего тетразолия (до 1  $\mu$ г на хроматограмму), в результате которой возникает фиолетово-синее окрашивание. У ацетатов реакция восстановления протекает тоже интенсивно, но несколько медленнее за счет гидролиза. Ускорить эту реакцию можно путем повышения концентрации щелочи или тетразолиевой соли (Новажинский и сотрудники [1], Д 5б). Кроме  $\alpha$ -кетолов, с тетразолием реагируют и некоторые  $\Delta^4$ -3-кетостероиды, но гораздо слабее (Мейер и Линдберг), и уже совсем слабо реагируют с этим реактивом ( $\Delta^{1,4}$ - и  $\Delta^{4,6}$ -диен-3-оны (Мейер и Бук). В случае  $\Delta^4$ -андростен-3,17-диона было установлено его окисление в положение 6 (Мейер и Линдберг).

Некоторые стероиды, например эстрон, эстрадиол, эквилин, эквilenин, дают с синим тетразолием желтое окрашивание. Более слабое окрашивание дают некоторые стероидные кислоты, например дезоксихолева кислота.

Многие реакции являются специфическими для стероидов с сопряженной  $\Delta^4$ -3-кетогруппой. Наиболее распространенным и хорошо изученным реактивом является 2,4-динитрофенилгидразин (Д 71). Для  $\Delta^4$ -3-кетостероидов в значительной степени характерна реакция, в результате которой возникает оранжевая окраска, однако некоторые вещества дают с этим реактивом желто-оранжевое окрашивание, а изолированная 3-кетогруппа дает желтое окрашивание. Весьма специфична реакция со щелочью, в результате которой возникает желтая флуоресценция (Буш [2], Д 80), а также реакция с фталатом *n*-фенилендиамина (Боданская и Коллонич, Д 81), в результате которой возникает желтое или желто-коричневое окрашивание, однако изолированная кетогруппа не дает при этом характерной реакции. Для большей надежности при идентификации неизвестных соединений мы рекомендуем пользоваться всеми тремя перечисленными методами, поскольку, с одной стороны, некоторые  $\Delta^4$ -3-кетостероиды дают весьма слабое окрашивание или флуоресценцию, а с другой стороны,

имеют место реакции некоторых стероидов, не содержащих характерной  $\Delta^4$ -3-кетогруппировки.

Заслуживает внимания синяя флуоресценция, возникающая в результате реакции некоторых стероидов со щелочами. Особенно это относится к фенольным стероидам, таким, как эстрадиол, эквиленинацетат (Бупш [2]), эквиленин, эквилин, эстрон, и к некоторым кислотам, например дегидро-холевой.

Из реактивов, действующих на кетонную функциональную группу стероидов, хорошо зарекомендовал себя щелочной раствор *m*-динитробензола, реактив Циммермана (Хаскинс и сотрудники, Кричевский и Тизелиус, *D* 82). Здесь имеется в виду реакция группы  $R-CH_2-CO$ , где *R* представляет собой углеводородный остаток или водород (Пезе [2]). Со щелочным раствором *m*-динитробензола реагируют 17-кетостероиды (фиолетовые пятна), 3-кетостероиды (голубые пятна; Кохакян и Стивдорти) и большинство 20-кетостероидов (розовые пятна). Чувствительность реакции относительно низкая (для некоторых 17-кетостероидов до 20  $\mu$ г на хроматограмму, для остальных соединений еще ниже). Для *D*-гомостероидов, которые содержат группу  $CH_2$  при углероде  $C_{16}$ , также характерна фиолетовая реакция Циммермана (Фукусима и сотрудники). Пятна, образующиеся в результате реакции Циммермана, меняют затем в большинстве случаев свою окраску до коричневой и серой; устойчивыми являются только фиолетовые пятна 17-кетостероидов (сохраняются в течение нескольких дней). Реакцию с *m*-динитробензолом можно комбинировать с проявлением 2,4-динитрофенилгидразином (*D* 83, Кохакян и Стивдорти).

Кетостероиды можно идентифицировать так же, как и гидразоны Т Жирара, т. е. йодоплатинатом (*D* 84) или реактивом Краута—Драгендорфа (Бертон и сотрудники [1]).

Кроме того, реактив Драгендорфа реагирует со многими свободными стероидными соединениями, как это наблюдала Пельцова (частное сообщение), и главным образом с  $\Delta^4$ -3-кетогруппой.

#### РЕАКЦИИ, СПЕЦИФИЧНЫЕ ЛИШЬ ДЛЯ НЕБОЛЬШОЙ ГРУППЫ ВЕЩЕСТВ

К этой группе можно отнести упомянутые выше случаи образования желтого пятна при реакции с синим тетразолием и возникновение синей флуоресценции со щелочью у некоторых фенольных стероидов и стероидных кислот.

Весьма специфично также возникновение синего окрашивания при реакции некоторых стероидов с водным раствором йода (*D* 2a). До сих пор это было отмечено лишь для нескольких веществ, например для кортизона (Заффарони и сотрудники [5]), холевой кислоты, 17  $\alpha$ -оксипрогестерона, дегидроэпиандростерона, 5 $\alpha$ -прегнан-3 $\beta$ -ол-20-она (Заффарони и сотрудники [3]; Бэсил и Боскотт), 11  $\alpha$ -оксипрогестерона (Тумова и сотрудники), норпрогестерона (Заффарони [2]) и др.

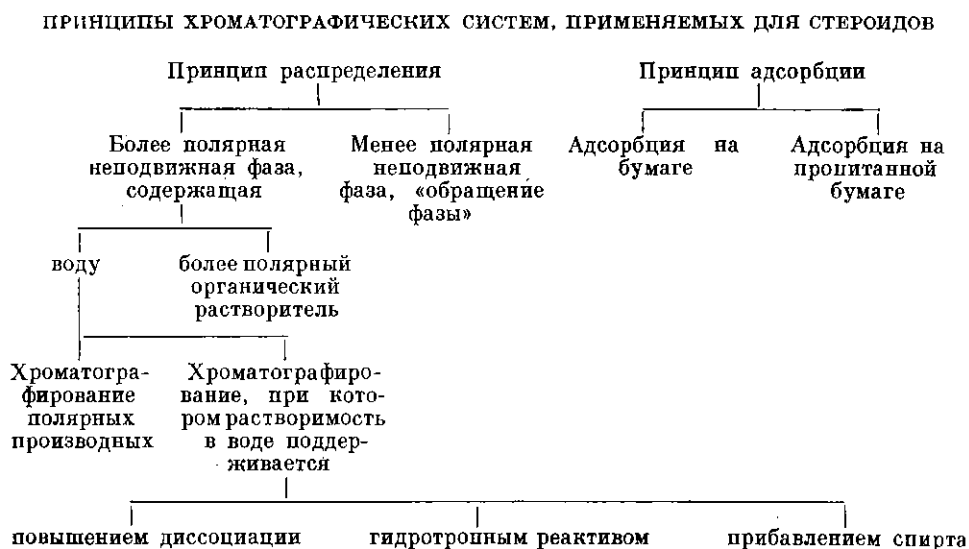
Для холестерина рекомендуют реакцию Либермана с серной кислотой в уксусном ангидриде (*D* 85). Эта реакция специфична для  $\Delta^5$ -ненасыщенных 3 $\beta$ -стеролов, которые дают зеленую окраску (зеленое окрашивание образуется тотчас же или спустя некоторое время из первоначально возникающего розового или синего окрашивания). Трудность при определении состоит в том, что интенсивность и тон окраски заметно меняются со вре-

менем. Некоторые соединения образуют с реактивом Либермана неспецифичное окрашивание.

Для фенольных стероидов специфическая реакция заключается в сочетании с солями диазония, например с *n*-нитробензолазодиметоксанилином (Гефتمان [1], Д 86), однако эту реакцию проводят в растворе и хроматографируют уже окрашенный продукт сочетания.

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Из липофильного характера стероидных веществ вытекает выбор систем растворителей, которые для большей наглядности изображены на следующей схеме:



## РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

### Неподвижная фаза, содержащая воду

Разделение стероидов в системе, содержащей органический растворитель и воду, обусловлено тем, что либо поддерживают растворимость в водной фазе, либо хроматографируют более полярные производные.

Хроматографирование более полярных производных, например гидразонов (Бертон и сотрудники [1], Заффарони и сотрудники [4], Камбер) или продуктов сочетания эстрогенов с диазотированным *n*-нитробензолазодиметоксанилином (Гефتمان [1, 2], Д 86), в настоящее время почти не применяют ввиду того, что реакция не является количественной, а сам метод неудобен.

Диссоциацию стероидных оснований или кислот можно повысить хроматографированием в кислых или щелочных системах. Первые содержат преимущественно уксусную кислоту, а вторые представляют собой главным образом водные растворы спиртов, подщелоченные аммиаком

(Проходка [1, 2], см. стр 352.). Так, например, фенольные стероиды разделяют в щелочных системах в виде фенолятов (Гейсгем).

Таблица 52

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ПРОИЗВОДНЫХ АНДРОСТАНА И ПРЕГНАНА<sup>a)</sup>

$R_f$	Буш А	Буш В <sub>5</sub>	Е <sub>5</sub>	Е <sub>9</sub>
	Бензин (86-100°) 5 Метанол 4 Вода 1	Бензол 2 Метанол 1 Вода 1	Изопропиловый эфир 40 трет.-бутанол 25 Вода 30	Гексан 100 трет.-бутанол 45 Метанол 45 Вода 40
	равновесие и хроматографирование ( $\pm 0,5-1^\circ$ ) при 30-38° Рейнеке		равновесие при 35-37°, хроматографирование при комнатной температуре Эберлейн, Бонджиованни	
0,0	○ 15α-ОН ○ 11α-ОН ○ 15β-ОН		○ 11β, 17α, 21-ОН ○ 17α, 21-ОН-11-СО ● Н <sub>2</sub> Е ● Н <sub>2</sub> Ф ● Н <sub>2</sub> Е	
0,1	○ 14α-ОН ○ 6β-ОН ○ 11β-ОН	● Δ <sup>4</sup> -Прегнен-11β, 17α, 20α, 21-тетрол ○ 11α, 17α, 21-ОН	● Н <sub>2</sub> Ф ○ 21-ОН-11-СО ○ 11α, 21-ОН ● Прегнан-3α, 17α, 20α-Триол	● Альдостерон ○ 11β, 17α, 21-ОН
0,2	○ 17α-ОН ● Тестостерон ○ 21-ОН ○ 11-ОН	○ 6β, 17α, 21-ОН («хвост») ○ Δ <sup>1</sup> -11β, 17α, 21-ОН	○ 17α-ОН-21-АцО-11-СО ○ 11β, 17α-ОН-21-АцО ○ 17α, 21-ОН	○ 17α, 21-ОН-11-СО ○ 21-ОН-11-СО ● Н <sub>2</sub> Е ● Н <sub>2</sub> Ф ● Н <sub>2</sub> Е
0,3		○ 11β, 17α, 21-ОН ○ 6β, 11α-ОН	● Н <sub>2</sub> Е-Ацетат ● Н <sub>2</sub> Ф-Ацетат	○ 11β, 21-ОН ● Н <sub>2</sub> В
0,4		● 11α-ОН-Тестостерон		● 17α, 21-ОН
0,5		○ 15α, 21-ОН ○ Δ <sup>1</sup> -17α, 21-ОН-11-СО 11α, 17α-ОН ○ 11α, 21-ОН 17α, 21-ОН-11-СО	○ 11β-ОН-21-АцО	
0,6	● Δ <sup>5,16</sup> -Прегнадиен-3β-ОН-20-СО ● Δ <sup>5</sup> -Прегнен-3β-ОН-20-СО ○ < Δ <sup>6</sup> <sub>Δ<sup>9</sup></sub>	● 14α-ОН-Тестостерон	● 3α, 20α-Прегнадиол	○ 21-ОН
0,7	● ○ < Прогестерон Δ <sup>16</sup>	● 11β-ОН-Тестостерон ○ < 6β, 17α-ОН ○ 6β, 21-ОН ○ 14α, 21-ОН ● < 11β-ОН-Андростендион ○ < 15α-ОН ○ 11β, 17α-ОН ○ 14α-ОН-Андростендион ○ 11β, 21-ОН ○ 17α, 21-ОН	○ 21-ОН ○ 17α-ОН ● Н <sub>2</sub> Е-Диацетат ● Н <sub>2</sub> Ф-Диацетат	
0,8		● 11α-ОН-Андростендион ○ 21-ОН-11-СО		
0,9				
1,0				

<sup>a)</sup> Между системами Буша А и В<sub>5</sub> имеется ряд других систем, например система В<sub>3</sub>: бензин-бензол — метанол — вода (66,7 : 33,3 : 80 : 20) или система В<sub>4</sub>: толуол — метанол — вода (100 : 50 : 50); знак ○ означает, что в названии соединения опущено «Δ<sup>4</sup>-прегнен-3,20-дион».

Применение гидротропных реактивов, предложенное Боскоттом [2], который пропитывает бумагу раствором *n*-толуолсульфоната, не получило распространения (см., однако, стр. 648).

Благоприятное влияние на хроматографическое поведение в системах с неподвижной фазой, содержащей воду, оказывает повышение растворимости стероидов путем прибавления спирта, чаще всего метанола. Изменением соотношения метанола с другими постоянными компонентами растворяющей смеси можно отчасти влиять на положение веществ на хроматограмме. Наглядным примером тому служит метод, разработанный Свендсеном и Йенсеном для разделения гликозидов, содержащихся в дигиталисе. В этой группе мы рассмотрим также комбинацию растворителей, предложенную Бушем [2, 3], хотя, по-видимому, главным компонентом неподвижной фазы системы является органический растворитель, и, согласно другой классификации, ее можно отнести к системам с неподвижной органической фазой (см., например, раздел о выборе систем растворителей, стр. 118). Системы Буша в настоящее время значительно расширены (например, II 10). Их преимущество заключается в относительно высокой разделяющей способности, в быстром хроматографировании и летучести растворителей, что обеспечивает быструю сушку хроматограмм и хорошее проявление. Недостатком систем является их высокая чувствительность к температуре, которую необходимо поддерживать строго в заданном интервале ( $34^\circ \pm 1^\circ$  и т. п.), так как от этого зависит степень насыщенности камеры и бумаги и соответственно взаимное соотношение воды и летучих растворителей в атмосфере. В результате этого применение реактивов Буша ограничено рамками лаборатории, где хроматографирование можно проводить при термостатировании. Эти трудности в известной мере были устранены Эберлейном и Бонджиованни, которые насыщали камеру и хроматограммы при слегка повышенной температуре (5—12 час при  $32-37^\circ$ ), а хроматографировали при комнатной температуре, колебания которой уже не существенны. Аномальное поведение кетостероидов по сравнению с оксипроизводными (кетогруппа уменьшает  $R_f$  в большей

Таблица 53

РАЗДЕЛЕНИЕ НАИБОЛЕЕ ПОЛЯРНЫХ СТЕРОИДОВ ПО ПЕХЕТУ  
( $R_{\text{кортизон}}$ )

Система	1	2	3	4	5	6
Петролейный эфир . . . . .	100	200	100			
Толуол . . . . .	200	100	200			150
Бензол . . . . .				150	200	
Этилацетат . . . . .					10	
<i>n</i> -Бутанол . . . . .	15	12				
Этанол . . . . .	15	12	100	400		400
H <sub>2</sub> O . . . . .	70	80	100	200	50	200
5 $\beta$ -Прегнан-3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,19,21-пентол-20-он . . . . .	0,0	0,06	0,02	0,10	0,03	0,23
Тетрагидрокортисол . . . . .	0,34	0,29	0,20	0,43	0,31	0,35
Тетрагидрокортисон . . . . .	0,67	0,67	0,47	0,62	0,49	0,55
Дигидрокортисон . . . . .	0,68	0,72	0,48	0,67	0,50	0,58
Кортисол . . . . .	0,50	0,39	0,43	0,68	0,62	0,62
Альдостерон . . . . .	0,58					
Кортисон . . . . .	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

степени, нежели, гидроксильная группа) можно в комбинации с системами Буша использовать для идентификации стероидов. Данные табл. 52 иллюстрируют разделение некоторых веществ в системах Буша и Эберлейна и Бонджиованни.

Различия между величинами  $R_f$  стероидов с большим числом кислородсодержащих функциональных групп (например, тетрагидрокортизона, тетрагидрокортизола) более благоприятны в системах, предложенных Пехетом, который пропитывает бумагу неподвижной фазой непосредственно перед нанесением образца (II 8). В табл. 53 приведен пример разделения некоторых более полярных стероидов: в системах 1, 2 и 3 тетрагидрокортизон и дигидрокортизон передвигаются быстрее, чем кортизол, в системах 4, 5 и 6, наоборот, медленнее, что можно использовать для их идентификации в смесях. Закрепление водной фазы путем непосредственного пропитывания бумаги будет, вероятно, целесообразным при использовании систем с водным раствором спиртов для хроматографирования при нормальной температуре. Системы Пехета 1 и 2 похожи на системы растворителей для кортикоидов (бутанол — метанол — вода; бутанол — бензол — метанол — вода), которые использовали Рахандраха и Раджимаманга.

#### Более полярный органический растворитель как неподвижная фаза

В системах этого типа неподвижную фазу (как правило, высококипящий растворитель) закрепляют на бумаге путем пропитывания хроматограммы.

В качестве неподвижной фазы используют в большинстве случаев формамид или пропиленгликоль (Заффарони и сотрудники [5], Бертон и сотрудники [2]) для хроматографирования более полярных веществ с большим числом кислородсодержащих функциональных групп; для менее полярных стероидов применяют фенилцеллозольв («гликолевый эфир», этиленгликольмонофениловый эфир) или бензиловый спирт (Негер и Ветштейн [2]). Для липофильных стероидов пригоден также N-метил- или диметилформамид (Хорнер и Кирмсе). Использование глицерина и этиленгликоля в качестве неподвижной фазы не привилось.

Пропиленгликоль существенно не отличается от формамида, при этом влияние отдельных групп на уменьшение величины  $R_f$  примерно одинаково. Исключением является поведение кетопроизводных. Формамид, согласно Диршерлу и Герхардсу, служит преимущественно донором, а кетогруппа — акцептором протонов, тогда как спиртовая группа пропиленгликоля и стероидов является и донором, и акцептором; в связи с этим можно ожидать относительно большего уменьшения влияния кетогруппы на величину  $R_f$  в системе с закрепленным формамидом. Иллюстрацией этому служит сравнение величин  $R_f$  тестостерона и адреностерона:

	Тестостерон ( $\Delta^4$ -андростен-17 $\alpha$ -ол-3-он)	Адреностерон ( $\Delta^4$ -андростен-3,11,17-трион)
Формамид/бензол: бензин 3 : 7	0,38	0,30
Пропиленгликоль/бензол: бензин 3 : 7	0,22	0,38

Весьма важным условием при хроматографировании во всех этих системах является надежный способ пропитывания бумаги (II 9). Для этой цели рекомендуют применение неподвижной фазы, разбавленной легко

летучим органическим растворителем, чаще всего метанолом или этанолом (Бертон и сотрудники [3]), благодаря чему достигается более равномерное распределение растворителя на бумаге после улетучивания разбавителя. Для формамида или пропиленгликоля не рекомендуют разбавление более чем на 30 %, так как иначе может иметь место сильное размывание пятен. Наоборот, для бензилового спирта рекомендуют 25 %-ный раствор в этаноле, а для фенолцеллозольва—10 %-ный раствор в ацетоне. У систем с неподвижной фазой, закрепленной путем пропитывания бумаги, важным фактором является выбор бумаги (Диршерл и Герхардс [2]) (см. стр. 117). Мы не рекомендуем разрезать хроматограммы, поскольку величины  $R_f$  пятен сильно искажаются, растворитель протекает по отдельным полоскам неравномерно, оценка (в том числе и полуколичественная) сильно затрудняется и, кроме того, разрезание требует затраты времени.

Единой точки зрения относительно способа нанесения образцов для хроматографирования в системах с закрепленной неподвижной фазой не существует. Однако на основании собственного опыта мы рекомендуем наносить образцы на некропитанную бумагу (II 9).

Системы, относящиеся к данной группе, требуют по сравнению с другими системами более длительной сушки бумаги перед проявлением. Савард и сотрудники [3] занимались исследованием этого вопроса и нашли, что при сушке хроматограммы кортизона в сушильном шкафу потери вещества незначительны (10 %). Гораздо хуже, однако, действуют ультрафиолетовые лучи; при облучении хроматограммы ультрафиолетовым светом было найдено несколько вновь образовавшихся стероидов. В связи с этим Заффарони рекомендует сушку хроматограммы проводить в токе воздуха и в темноте.

Для систем с закрепленным пропиленгликолем или формамидом было исследовано большое число растворителей в виде подвижной фазы (табл. 54, 55). Для разделения  $C_{19}O_2$ -стероидов в качестве подвижной фазы

Таблица 54

ОБЗОР СИСТЕМ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП СТЕРОИДОВ  
(системы с закрепленным формамидом или пропиленгликолем по Заффарони [2])

Системы	$C_{19}O_2$	$C_{21}O_2$	$C_{21}O_3$	$C_{21}O_4$	$C_{21}O_6$	$C_{21}O_8$	Моноацетаты стероидов			Диацетаты стероидов	
							$C_{21}O_3$	$C_{21}O_4$	$C_{21}O_5$	$C_{21}O_4$	$C_{21}O_5$
Формамид/гексан . . . . .	+	+	+				+			+	
Пропиленгликоль/гексан . . . . .	+	+	+				+			+	
Формамид/гексан—бензол (1:1) . . . . .	+	+	+	+				+	+		+
Пропиленгликоль/гексан—бензол . . . . .	+	+	+					+	+		+
Формамид/бензол . . . . .			+	+	+				+		
Пропиленгликоль/бензол . . . . .			+	+	+				+		+
Пропиленгликоль/толуол . . . . .			+	+	+				+		
Формамид/хлороформ . . . . .				+	+	+					

мы выбираем только углеводород, для полярных  $C_{21}O_6$ -стероидов выбираем систему формамид/хлороформ.

Таблица 55

ПОВЕДЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПРЕГНАНА В СИСТЕМЕ ФОРМАМИД/БЕНЗОЛ  
(по Рейнке)

Данные взяты относительно подвижности  $\Delta^4$ -прегнен-11 $\alpha$ -окси-3,20-диона (=100)

A/B	$\Delta$	Окси	АцО	Кето	Прочие	R <sub>11OH</sub>	A/B	$\Delta$	Окси	АцО	Кето	Прочие	R <sub>11OH</sub>
5 $\beta$ 5 $\alpha$	4	6 $\beta$		3,20		112	5 $\beta$ 5 $\alpha$	4	11 $\alpha$ , 21		3,20		13
	4	11 $\alpha$		3,20		100		4	11 $\beta$ , 21		3,20		39
	4,16	11 $\alpha$		3,20		104		4	14 $\alpha$ , 21		3,20		25
	4	11 $\beta$		3,20		142		4	15 $\alpha$ , 21		3,20		8,6
	4	14 $\alpha$		3,20		132		4	17 $\alpha$ , 21		3,20		35
	4	15 $\alpha$		3,20		82		4	11 $\beta$	21	3,20		136
	4	15 $\beta$		3,20		100		4	15 $\alpha$	21	3,20		79
	4	16 $\alpha$		3,20		74		4	17 $\alpha$	21	3,20		150
	4	17 $\alpha$		3,20		151		4	17 $\alpha$ , 21		3, 11, 20		11
	4	21		3,20		150		4	17 $\alpha$ , 21		3, 11, 20		5,5
		3 $\alpha$ , 11 $\alpha$		20		74		5 $\beta$	17 $\alpha$	21	3, 11, 20		100
		3 $\beta$ , 11 $\alpha$		20		63		4	17 $\alpha$	21	3, 11, 20		65
	4,17 (20)	11 $\beta$ , 21		3		47		4	11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ , 21		3,20		1
								4	11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21		3,20		2,9
5 $\beta$ 5 $\beta$	4	6 $\beta$		3, 11, 20		58	5 $\beta$ 5 $\alpha$	1,4	11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21		3,20		1,8
	4	17 $\alpha$		3, 11, 20		89			3 $\alpha$ , 17 $\alpha$	21	11, 20		31
		6 $\beta$ , 11 $\alpha$		3, 20		6,7			3 $\beta$ , 17 $\alpha$	21	11, 20		23
		3 $\alpha$ , 17 $\alpha$		11, 20		48		4	11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$	21	3		5,5
	4	6 $\beta$ , 11 $\alpha$		3,20		5		4	17 $\alpha$	21	3, 11, 20	4 $\beta$ Br	142
	4	6 $\beta$ , 17 $\alpha$		3,20		21		4	11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21		3,20	2CH <sub>3</sub>	9
	4	11 $\alpha$ , 17 $\alpha$		3,20		13		4	11 $\beta$ , 17 $\alpha$	21	3,20	9 $\alpha$ F	23
	4	11 $\beta$ , 17 $\alpha$		3,20		39		4	11 $\beta$ , 17 $\alpha$	21	3,20	2CH <sub>3</sub>	92
	4	21		3,20		150		4	11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21		3,20	2CH <sub>3</sub>	4
	4	21		3, 11, 20		69						9 $\alpha$ F	
	4		21	3, 11, 20		160							
	4	6 $\beta$ , 21		3, 20		19							

В системе с закрепленным фенилцеллозольвом в качестве подвижной фазы можно использовать различные углеводороды, например гептан, гексан и т. п. (Негер и Ветштейн [2]), точно так же, как и для системы с бензиловым спиртом в качестве неподвижной фазы. Систему бензиловый спирт/керосин или бензиловый спирт/тяжелый бензин рекомендуют для стеролов.

Преимущества и недостатки обеих в настоящее время уже классических групп систем растворителей для хроматографирования стероидов на бумаге, т. е., с одной стороны, группы Буша, а с другой — Заффарони и Бертоне, часто еще являются предметом обсуждения (см., например, Буш [3]).

Оба метода имеют преимущества в отношении разделения веществ, весьма близких друг к другу (изомеры положения и пространственные изомеры, стр. 335). Недостатки систем Буша: необходимость хроматографирования при повышенной температуре, зависимость от колебаний температуры, необходимость тщательной очистки образца перед хроматографированием и малая емкость. Хроматографирование зависит от количества нанесенного образца, поэтому Буш [2] модифицировал способ нанесения. Преимуществом распределительной хроматографии в системах Заффарони являются относительно низкие требования к чистоте образца и значительная емкость, что позволяет осуществлять разделение для препаративных целей; недостаток такого хроматографирования состоит в необходимости пропитывания бумаги и длительной сушки хроматограмм. Диффузия не является препятствием к разделению при правильном пропитывании. Системы Буша считают обычно более подвижными; однако если мы будем учитывать время, необходимое для достижения равновесия, совместно с временем собственно хроматографирования, то для многих веществ различие окажется не столь существенным. В системах Заффарони невозможно разделять стероиды, отличающиеся друг от друга только положением двойной связи, например дезоксикортикостерон от  $\Delta^{9(11)}$ -дегидродезоксикортикостерона, прогестерон от  $\Delta^{9(11)}$ -дегидропрогестерона и андростерона и  $5\beta$ -андростан-3 $\alpha$ -ол-17-он от их  $\Delta^5$ -и  $\Delta^9$ -дегидропроизводных (Заффарони [2]). Наоборот, Буш [3] указывает на то, что при хроматографировании с перетеканием он отделял  $5\alpha$ -андростан-3 $\beta$ -ол-17-он от  $\Delta^5$ -андростен-3 $\beta$ -ол-17-она.

### Менее полярные неподвижные фазы — обращение фаз

Этим методом пользуются в тех случаях, когда хроматографируемые вещества настолько липофильны, что для их разделения нельзя с успехом применять упомянутые выше системы, однако применение последних может, по всей вероятности, быть гораздо шире, т. е. охватывать случаи хроматографирования менее липофильных соединений (Шмидт и сотрудники, см. также стр. 370). Поскольку непропитанная целлюлоза связывает своими гидрофильными группами преимущественно гидрофильные вещества и растворители, ее можно использовать для определения обратного порядка веществ по сравнению с тем, который имеет место в системах, содержащих воду или более полярный органический растворитель, но предварительно ее необходимо ацетилировать или пропитывать.

Аллуф и Машбеф наблюдали обратный порядок на необработанной бумаге для азотсодержащих веществ. Они назвали его «classement eau» — водным порядком (см. стр. 513). Такие системы были использованы также

для стероидов (например, вода, насыщенная бутанолом, для хроматографирования кортикоидов; Гофман и Штаудингер [1, 2]), однако в настоящее время от этого уже отказались.

Ацетилирование бумаги проводить не рекомендуют (Мак-Магон и сотрудники). Для пропитывания бумаги были использованы силиконы (Т. Кричевский и Тизелиус), каучуковый латекс (см. стр. 236), хлористый винил, парафиновое масло (см. стр. 236), вазелин, квилон (Д. Кричевский и Калвин [1]), керосин, тяжелый бензин и т. п.

В последнее время применяют главным образом парафин [твердый (Гаркина, см. стр. 364), жидкий (Михалец, см. стр. 364)] и керосин (Кучера и сотрудники), что объясняется их доступностью. Преимущество этих пропиток объясняется также их дешевизной и хорошей разделяющей способностью для хроматографирования многих малополярных стероидов. Преимуществом керосина по сравнению с парафином является летучесть, способствующая быстрой сушке хроматограмм; однако наличие загрязнений в керосине и невозможность его использования для некоторых случаев проявления (например, с серной кислотой) являются недостатком.

Таблица 56

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  СТЕРОИДОВ В СИСТЕМЕ С ЗАКРЕПЛЕННЫМ КЕРОСИНОМ  
(Кучера и сотрудники)

Неподвижная фаза	Керосин (200–220°) в петролейном эфире (40–60°)		
	10%	30%	40%
Подвижная фаза	$\text{CH}_3\text{OH}$ 80 $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH}$ 5 $\text{H}_2\text{O}$ 15	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 60 $\text{H}_2\text{O}$ 40	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 88 $\text{H}_2\text{O}$ 12
Тестостерон . . . . .	0,93	0,87	0,86
$\Delta^4$ -16-Метил-16 $\beta$ -оксандростен-3-он . . . . .	0,94	0,86	0,86
$\Delta^4$ -17 $\beta$ -Пропионилоксандростен-3-он . . . . .	0,63	0,29	0,46
$\Delta^4$ -17 $\alpha$ -Метил-17 $\beta$ -оксандростен-3-он . . . . .	0,93	0,83	0,85
$\Delta^4$ -17 $\alpha$ -Этинил-17 $\beta$ -оксандростен-3-он . . . . .	0,93	0,85	0,85
$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Ацетоксандростен-16-он . . . . .	0,49	0,24	0,34
$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Оксандростен-16-он . . . . .	0,89	0,80	0,86
Прогестерон . . . . .	0,79	0,55	0,69
$\Delta^4$ -Андростен-3,16-дион . . . . .	0,83	0,75	0,81
$\Delta^4$ -Андростен-3,17-дион . . . . .	0,85	0,77	0,83
ДКА . . . . .	0,84	0,73	0,80
3 $\beta$ -Ацетокси-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -дигромаандростан-17-он . . . . .	0,69	0,36	0,44
$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Окси-21-ацетоксипрегнен-20-он . . . . .	0,77	—	—
3 $\beta$ -Ацетокси-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -дигром-5 $\beta$ -холестан . . . . .	0,00	0,06	0,11
$\Delta^5$ -3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Диоксихолестен . . . . .	0,74	0,40	0,61
$\Delta^4$ -Холестен-3-он . . . . .	0,02	0,07	0,16
Холестерин . . . . .	0,08	0,08	0,09
Холестеринацетат . . . . .	0,01	0,07	0,08
$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Окси-25-норхолестен-25-он . . . . .	0,67	0,43	0,57
$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Ацетокси-25-норхолестен-25-он . . . . .	0,11	0,11	0,15
$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Оксипрегнен-20-он . . . . .	0,86	0,73	0,82
$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Ацетоксипрегнен-20-он . . . . .	0,40	0,20	0,30
Дегидроэпиандростерон . . . . .	0,92	0,85	0,86
Дегидроэпиандростеронацетат . . . . .	0,61	0,29	0,42

Для пропитывания бумаги применяют растворы парафина (II 14) и керосина (10—40%-ный раствор в петролейном эфире); Кучера и сотрудники предложили изменять величину  $R_f$  с помощью керосина различной концентрации в качестве неподвижной фазы.

Подвижная фаза в системе с парафином представляет собой либо этанол различной концентрации (чаще всего 70%), либо уксусную кислоту (см. стр. 360); в системе с закрепленным керосином полярные растворители смешиваются с водой (Кучера и сотрудники, табл. 56).

Путем изменения количества воды в подвижной фазе можно в случае необходимости изменять величину  $R_f$ . Для таких углеводов, как  $\beta$ -холестан и  $\Delta^4$ -холестен, рекомендуют систему с бензиловым спиртом в качестве подвижной фазы. Такая комбинация является, по-видимому, крайним пределом, который можно использовать при хроматографировании на бумаге высоколипофильных стероидов (Кучера и сотрудники). Для стеролов и их ацилпроизводных можно также применять в качестве подвижной фазы 88%-ный *n*-пропанол, однако различие в величинах  $R_f$  весьма невелико. Для нейтральных стероидов (преимущественно с двумя кислородсодержащими функциональными группами) рекомендуют водный раствор этанола различной концентрации. Система с подвижной фазой метанол—бутанол—вода (80:5:15) дает несколько более высокое значение  $R_f$ , чем 80%-ный этанол, причем пятна имеют более круглый вид.

#### АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Адсорбционную хроматографию на бумаге, пропитанной гидратом окиси алюминия, в настоящее время почти не применяют. К обычным недостаткам, таким, как «адсорбционный вид» пятен, ухудшающий разделение, необходимость стандартного приготовления бумаги (II 5; Буш [1], Шулл и сотрудники), образование «хвостов», присоединяется еще возможность деструктивных изменений, поэтому кортикоиды необходимо перед хроматографированием ацетилировать (Буш [1]).

В качестве подвижной фазы можно использовать бензол, бензол с хлороформом (3:1, 4:1, 2:1), 5%-ный раствор ацетона в бензоле (Буш [2]) или гексан и смеси гексана с эфиром (19:1, 15:5; камеру необходимо насыщать перед проявлением при температуре 4—8°, Шулл и сотрудники).

Хроматографирование на бумаге, пропитанной гидратом окиси алюминия, требует нанесения малых объемов, например 5  $\mu$ л (Шулл и сотрудники), и очень чистых образцов.

Адсорбционный принцип при хроматографировании на непропитанной бумаге применялся преимущественно для однофазных систем Сэкалом и Мериллом, которые использовали в качестве подвижной фазы ксилол с метанолом (225:75) для быстрого (2—3-часового) разделения кортикоидов. Разделение не является слишком хорошим из-за большой величины пятен (например,  $0,7 \times 5,5$  см). Подобную цель преследует хроматографирование на непропитанной бумаге с петролейным эфиром в качестве подвижной фазы, где в течение 20—30 мин восходящего проявления можно разделить вещества, значительно отличающиеся друг от друга, что особенно пригодно для исследователей, занимающихся синтезом (Кучера и сотрудники).

Адсорбцию можно также применять для систем, содержащих воду, например для щелочных систем Боскотта, Гейсгейма и др.

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для количественного определения стероидов, разделенных на хроматограмме, можно использовать различные физические способы или химические реакции, о которых говорится в разделе, посвященном обнаружению (см. стр. 338). Анализ проводят либо после элюции, либо непосредственно на бумаге. Обычно применяется метод визуального сравнения величины и интенсивности пятен со стандартными образцами. Методы определения отдельных групп стероидов рассматриваются в последующих разделах.

## Отдельные группы стероидов

### СТЕРОИДНЫЕ АМИНЫ

В этом разделе мы рассмотрим главным образом разделение некоторых липофильных синтетических аминов; о стероидных алкалоидах см. подробнее на стр. 551.

Для проявления описываемых веществ используют главным образом треххлористую сурьму (*Д 78*), причем некоторые вещества реагируют мгновенно, тогда как другие — только после нагревания.

Для разделения стероидных аминов можно использовать системы, предложенные Прохазкой и сотрудниками [2]. К ним относятся нейтральные системы, содержащие воду в неподвижной фазе, например свежеприготовленная эмульсия бутилацетата (т. кип. 125—126°) с водой, а также кислые системы: амиловый спирт — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5), бутанол-2 — соляная кислота — вода (*П 51*) и, наконец, четыреххлористый углерод + 2% уксусной кислоты (необходимо оставлять хроматограммы на ночь).

Особенно хорошо зарекомендовал себя способ разделения в системах с обращенными фазами, где неподвижную фазу образует керосин, а подвижную фазу — либо водный раствор этанола (96%-ный этанол — вода, 75 : 25), либо этанол, подщелоченный аммиаком (этанол — вода — аммиак, 75 : 23 : 2).

### ЖЕЛЧНЫЕ И ДРУГИЕ СТЕРОИДНЫЕ КИСЛОТЫ

*Ч. Михалец*

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Приготовление образцов зависит, разумеется, от того, какой материал мы анализируем; обычно для желчных кислот используют способ, предложенный Хаслвудом и Вутоном [2], с помощью которого непосредственно определяются связанные кислоты, а также кислоты, выделенные после щелочного гидролиза.

## ОБНАРУЖЕНИЕ

Идентификация обеих форм желчных кислот (связанной и свободной) не представляет труда. Наиболее распространенным является проявление с помощью фосфорномолибденовой кислоты (Д 226). Кроме того, пользуются насыщенным раствором треххлористой сурьмы в хлороформе (Д 78а) и, наконец, 10%-ной серной кислотой в уксусном ангидриде (Д 85). Примеры окрашивания, возникающего при этих реакциях, приведены в табл. 57. Характерным реактивом является водный раствор йода (Д 2а), который дает с холевой кислотой синее окрашивание. Кетокислоты дают

Таблица 57

РЕАКЦИИ НЕКОТОРЫХ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ а)

Желчная кислота	SbCl <sub>3</sub> (Д 78)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> в уксусном ангидриде (Д 85)	
	УФ	видимый свет	УФ
Холевая . . . . .	Красно-бурая	ф.	р.
Дезоксихолевая . .	ж.	—	р.
Хенодезоксихолевая	Пурп.	—	—
Литохолевая . . .	р.	—	—
Гликохолевая . . .	Темно-персиковая	р.	Кирпично-кр.
Таурохолевая . . .	» »	ф.	кр.

а) Данные получены при работе с 50 мкг кислот.

с щелочным раствором *m*-динитробензола сине-фиолетовое окрашивание (Д 82), а после перевода в гидразоны с помощью реактива Т Жирара образуют с йодоплатинатом пурпурное окрашивание.

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

## Прямое разделение кислот

При хроматографировании природных связанных (с гликоколом или таурином) и свободных желчных кислот пользуются системами, содержащими неподвижную водную фазу, причем либо щелочными, согласно Д. Кричевскому и Кирку [3] (*n*-пропанол — аммиак — этаноламин — вода, 90 : 1 : 3 : 6), либо кислыми, согласно Байредеру (П 63).

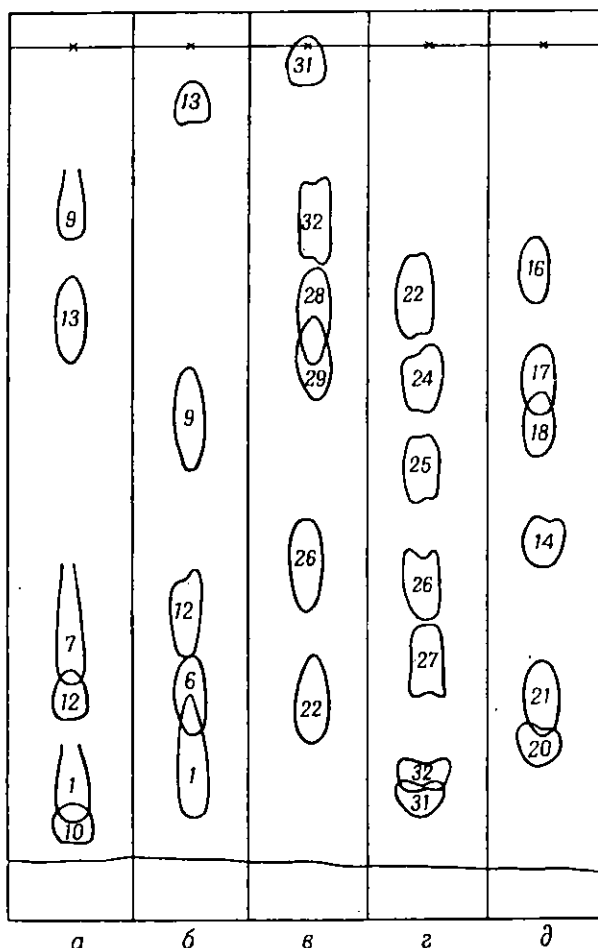
Гораздо большей разделяющей способностью обладает наиболее широко распространенный в настоящее время метод Сьёвалла [1, 2], согласно которому в качестве неподвижной фазы используют уксусную кислоту, а в качестве подвижной фазы — органические растворители (табл. 58). Системы (П 64) обеспечивают почти полное разделение тауро- и гликопроизводных холевой, дезоксихолевой и хенодезоксихолевой кислот. Для разделения метиловых или этиловых эфиров желчных кислот была предложена система бензин — метанол — вода (10 : 8 : 2), которую

Таблица 58

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ

Толуол CH <sub>3</sub> COOH Вода	5 5 1	70% н-я CH <sub>3</sub> COOH/амилацетат Гептан	3 2	70% н-я CH <sub>3</sub> COOH/амила- ацетат Гептан	4 1	н-Бутанол изо-Пропанол Вода	6 2 1
Восходящая		Нисходящая		Нисходящая		Нисходящая	
Байредер и сотрудники		Сьёвалл [2]				Танака и Танака	
R <sub>F</sub>							
0,0	● Таурохолевая	● Таурохолевая Тауродезоксихолевая Таурохенодезоксихолевая					
0,1		● Гликохолевая				● Метил-3,7,12-трикето- холанат	
0,2	● Гликохолевая			● Таурохолевая		● Метил-3-ОН-7,12-дикето- холанат	
0,3		● Гликохенодезоксихолевая ● Гликодезоксихолевая		● Таурохенодезокси- холевая ● Тауродезоксихолевая			
0,4		● Холевая				● Метил-7,12-дикетохоланат	
0,5						● Метил-12-ОН-3,7-дикето- холанат	
0,6	● Холевая	● Хидедезоксихолевая				● Метил-7-кетон-3,12-ди-ОН- холанат	
0,7		● Дезоксихолевая Хенодезоксихолевая				● Метил-3,12-дикетохоланат	
0,8	● Дегидрохолевая					● Метил-12 кетон-3-ОН- холанат	
	● Дезоксихолевая					● Метил-12 кетон-3-ацет- оксихоланат	
						● Метил-12-кетохоланат	
0,9							
1,0							

использовал Хаслвуд [1], а также система Прохазки — гексан, содержащий 3—4% метанола. Работать с этими системами можно быстро, но требуется тщательное насыщение камеры и поддержание строго заданной температуры при хроматографировании, что обеспечивает надежное разделение (рис. 144).



Р и с. 144. Разделение некоторых стероидных кислот (а, б), их сложных эфиров (в, г) и ацетатов (д) (Прохазка [1]).

Системы: а —  $\text{CCl}_4$  с 2% уксусной кислоты; б — изоамиловый спирт, смешанный с равным объемом раствора 1,5 М  $\text{NH}_3$  и 1,5 М  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ; в — гексан с 3,5–4% метанола; г — бумага пропитана керосином (раствор в петролейном эфире, 4 : 6), протекает 57%-ный водный раствор этанола; д — такое же пропитывание, протекает 80%-ная уксусная кислота.

Кислоты: 1 — 3 $\beta$ -оксиколоеновая(5); 6 — 3 $\alpha$ -окси-12-кетоколоеновая(5); 7 — дезоксиколоеновая; 9 — холевая; 10 — 1-карбометоксиметил-2,13-диметил-7-ацетокси-1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13-декагидрофенантрен-2-карбоновая; 12 — метиловый эфир кислоты 10; 13 — 3 $\beta$ -окси- $\Delta^5$ -андростен-16,17-секо-дихлората [3 $\beta$ -оксиэтиобилиеновая(5)]; 14 — 1-этилиден-2-метил-7-метокси-1,2,3,4-тетрагидрофенантрен-2-карбоновая; 16 — 3 $\beta$ -ацетоксинорхоленовая(5); 17 — 5 $\alpha$ -андростан-17 $\beta$ -карбоновая (3 $\beta$ -ацетоксипаллоэтиановая); 18 — 3 $\beta$ -ацетоксиэтиановая(5); 20 — 3 $\alpha$ -ацетокси-12-кетоколоеновая(5).

Метиловые эфиры кислот (можно получить, действуя диазометаном на кислоты, нанесенные в виде капли на бумагу): 21 —  $\alpha$ -[3 $\beta$ -оксиэстрадиен(5,7,9)-17-ил]-пропионовый; 22 — 3 $\beta$ -оксиколоеновый(5); 24 — 3 $\beta$ -оксинорхоленовый(5); 25 — 3 $\beta$ -оксисинорхоленовый(5); 26 — 3 $\beta$ -оксиэтиановый(5); 27 — 3 $\beta$ -окси-16-карбоксиандростадиена(5,16); 28 — 3 $\alpha$ -окси-12-кетоколоеновый(9); 29 — дезоксиколоеновый; 31 — холевый; 32 — 3 $\beta$ -окси- $\Delta^5$ -андростен-16,17-секо-дихлората (диметиловый эфир).

### Разделение производных

Танака и Такеда переводили метиловые эфиры желчных кетокислот с помощью реактива Т Жирара в гидразоны, которые разделяли в системе *n*-бутанол — изопропанол — вода (6 : 2 : 1), используя технику

одномерной хроматографии. Гидразоны образуют лишь карбонильные группы, находящиеся в положении 7 и 12. Значения  $R_f$  уменьшаются с увеличением количества карбонильных и других полярных групп.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Сьёвалл [3] описал спектрофотометрическое определение смеси свободных и связанных желчных кислот после их хроматографического разделения, выделения с помощью этанола и реакции с 65%-ной серной кислотой. Результаты, полученные этим автором, являются количественными, и различия между отдельными опытами незначительны.

### ФЕНОЛЬНЫЕ СТЕРОИДЫ

#### ПОЛУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ИЗ МОЧИ

Поступают обычным способом, т. е. после гидролиза (чаще всего кислотного с применением 10%-ной соляной кислоты и кипячением в течение 7—10 мин) экстрагируют эстрогены бензолом. После промывания экстракта 9%-ным раствором  $\text{NaHCO}_3$  встряхивают его с 2 н. водным раствором едкого натра, а затем подкислением соляной кислотой разлагают образующиеся феноляты, а эстрогены экстрагируют вновь из водной фазы бензолом. После концентрирования образцы наносят на хроматограмму.

Для хроматографирования в системе формамид/бензол — хлороформ и по методу Д 1 этот прием является вполне достаточным (по крайней мере для женской мочи), несмотря на то, что одновременно наблюдаются окрашенные и флуоресцирующие примеси. Образцы из природного материала Аксельрод [1] рекомендует предварительно хроматографировать в системе формамид/метилциклогексан в течение 24 час для удаления мешающих пигментов.

Для препаративных целей (выделение 16-кетостерона из мочи) рекомендуют проводить хроматографирование на толстой бумаге (системы бутанол — вода использовал для этой цели Серки и сотрудники).

### ОБНАРУЖЕНИЕ

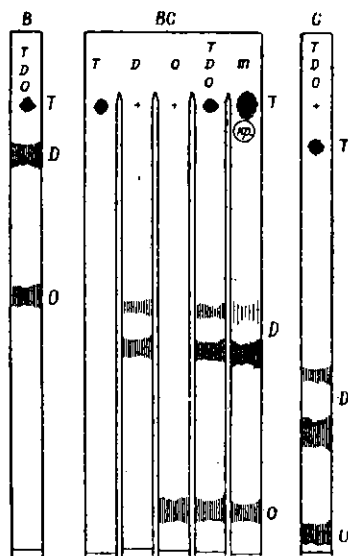
В качестве наиболее чувствительных реактивов можно применять хлориды сурьмы (Д 78а), которые вызывают флуоресценцию уже с 0,2 мкг эстрадиола и 0,5 мкг эстриола (Гейсген), или серную кислоту (Д 1), которая также дает весьма чувствительную реакцию (заметная флуоресценция имеет место уже с 1 мкг эстрадиола и 5 мкг эстрона или эстриола; Збудовска и Хайс). Окраска в видимом свете является более слабой, примерно такой, как при реакции с пятихлористой сурьмой (Аксельрод [1]).

Сочетание с диазотированным *n*-нитробензолазодиметоксанилином (Гефتمان [1, 2]) и последующее хроматографирование образующихся продуктов затруднительно.

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Эстрогены можно разделять в щелочных системах, содержащих воду, например в системе хлороформ — бензол — аммиак (1 : 9 : 1) по Гейсге-му; для этой цели используют также системы Буша.

Лучше всего зарекомендовали себя системы с закрепленным формамидом или пропиленгликолем. В качестве подвижной фазы пригодна система бензол — хлороформ (4 : 1), как это показано на рис. 145 (Збудовска и Хайс). В этих системах достигается хорошее разделение  $\alpha$ - и  $\beta$ -эстрадиола, выгодное значение  $R_f$  (0,38) имеет в них также этинилэстрадиол. Такое же хорошее разделение достигается с помощью *o*-дихлорбензола в качестве подвижной фазы, однако пятна этинилэстрадиола и 17 $\beta$ -эстрадиола сливаются (их невозможно разделить даже при 14-часовом проявлении; при использовании циклогексена разделение происходит только через 30 час). Хлористый метилен так же, как и хлороформ, повышает значение  $R_f$



Р и с. 145. Схематическая хроматограмма эстрогенов (Збудовска и Хайс).

Система: бумага пропитана 50%-ным раствором формамида в этаноле, подвижные растворители — бензол (B), бензол — хлороформ 4 : 1 (BC) или хлороформ (C). Проявление проводилось серной кислотой (DI). T — эстриол; D — эстрадиол; O — эстрон; m — экстракт из мочи человека; кр. — красное пятно с гаснущей флуоресценцией.

и удобен для эстриола (Аксельрод [17]). Для разделения более родственных 6-дегидроэстрона и эстрона, эквилинина и эквилина рекомендуют систему пропиленгликоль (неразбавленный) — метилциклогексан (Аксельрод [2]).

В случае более липофильных сложных и простых эфиров эстрогенов особое внимание уделяют использованию обращенных фаз (для этой цели Марквардт пользовался бумагой, пропитанной силиконом).

Для разделения синтетических эстрогенов можно использовать большинство тех же систем, какие применяют для разделения эстрогенов из биологического материала (например, системы Аксельрода [1, 2] или Боскотта [2]), поэтому мы не будем о них упоминать специально.

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Непосредственно на бумаге эстрогены определяют визуальным методом после проявления (например, серной кислотой, см. стр. 339) или планиметрическим измерением площади пятен на адсорбционной бумажной хроматограмме (бумага, пропитанная гидратом окиси алюминия; подвижная фаза — бензол, насыщенный 10%-ным раствором NaOH; проявление насыщенным бензиновым раствором йода, Косимура и Окасаки).

После элюирования эстрогенов с бумаги можно применять различные колориметрические или флуориметрические методы или полярографию

после нитрования (Гейсгем). Превосходным методом является измерение кривых поглощения с серной кислотой или с дымящей серной кислотой по Аксельроду [2]. Последнюю одновременно используют и для идентификации стероидов. Этот способ можно применять не только для анализа природных эстрогенов, но и для анализа синтетических веществ, например 6-дегидроэстрона, диэтилстильбестрола, этинилэстрадиола.

## ПРОИЗВОДНЫЕ АНДРОСТАНА

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Из биологического материала чаще всего анализируют 17-кетостероиды мочи. Экстракцию проводят точно так же, как и в случае эстрогенов. После встряхивания с 9%-ным  $\text{NaHCO}_3$  и отделения эстрогенов путем экстракции щелочью бензольный экстракт нейтрализуют и наносят на бумагу; для анализа нормальной мочи достаточно брать объем, равный 25—50 мл. Для хроматографирования с закрепленным формамидом образцы, как правило, не нуждаются в специальной очистке. Для получения особо чистого материала лучше всего применять предварительную фракционную экстракцию дигитонином и получать гидразоны Жирара (Савард [2]).

### ОБНАРУЖЕНИЕ

$\Delta^4$ -3-Кетостероиды можно определять по поглощению ультрафиолетовых лучей или специальными реактивами: щелочью (*Д* 80), 2,4-динитрофенилгидразином (*Д* 71) или *n*-фенилендиаминофталатом (*Д* 81). Для определения стероидов с 17-кетогруппой служит обычная реакция Циммермана (*Д* 82).  $\Delta^4$ -3,6-Дикетостероиды дают ярко выраженное оранжево-желтое окрашивание со спиртовым раствором щелочи; после опрыскивания раствором *m*-динитробензола образуется сине-зеленое или коричнево-зеленое окрашивание (Савард [2]). Для  $\Delta^4$ -3-кето- и 17-кетостероидов можно применять комбинированное проявление *m*-динитробензолом и 2,4-динитрофенилгидразином (Кохакян и Стивурти; *Д* 83). Для получения ориентировочных сведений можно использовать также и неспецифические реакции (*Д* 1, *Д* 75, *Д* 78).

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

От разделения кетостероидов в форме гидразонов (Бертон и сотрудники [1], Камбер) в настоящее время отказались, поскольку этот метод является неудобным и не дает количественных результатов.

Лучше всего зарекомендовали себя системы Буша (см. табл. 52) и системы с закрепленным формамидом или пропиленгликолем. Для разделения 17-кетостероидов, содержащихся в моче, целесообразно использовать систему Буша бензол — легкий бензин — метанол — вода (36 : 66 : 80 : 20) при 36°; систему Буша А и др. (см. табл. 52, Офнер). Системы с закрепленным формамидом или пропиленгликолем используются чаще. В случае закрепленного формамида для полярных производных в качестве подвиж-

ной фазы используют бензол (11 $\beta$ -окситестостерон имеет  $R_f$  0,07; Аксельрод и Аррояве [4]), хлористый метилен или циклогексен (Аррояве и Аксельрод). Для 17-кетостероидов мочи рекомендуют формамид с использованием в качестве подвижного растворителя бензина или петролейного эфира. Точно так же для хроматограмм, пропитанных пропиленгликолем, рекомендуют алифатические углеводороды, и в первую очередь бензин (Брэди, Ричардсон); система пропиленгликоль — бензин вообще является наиболее широко применяемой системой для разделения стероидов с 19 углеродными атомами (разделение см. табл. 48). Вместо бензина можно также использовать гептан (Бройер). В системе пропиленгликоль — бензин (лигроин) более гидрофобные стероиды имеют слишком высокое значение  $R_f$ , и лучшей является система с закрепленным более липофильным фенилцеллозольвом и подвижным бензином (лигроином) или гептаном (Савард [2]; Рубин и сотрудники). Как показал Савард [1, 2], система пропиленгликоль — бензин обладает прекрасной способностью разделять весьма близкие производные.

Относительно плохо разделяются вещества, отличающиеся только наличием изолированной двойной связи. Нельзя, например, отделить насыщенные стероиды от  $\Delta^5$ - или  $\Delta^9$ -ненасыщенных производных. Хорошее разделение происходит при использовании хлорированных углеводородов (хлористый метилен; Аррояве и Аксельрод) или циклических углеводородов, например смеси бензол — циклогексан (1 : 1) (Кохалян и Стивдорти), в качестве подвижной фазы для системы с пропиленгликолем (табл. 59).

Таблица 59

РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АНДРОСТАНА В СИСТЕМЕ ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЬ  
(50% В МЕТАНОЛЕ)/БЕНЗОЛ—ЦИКЛОГЕКСАН (1 : 1)  
(По Кохаляну, частное сообщение)

Соединение	$R_{\text{Проба}}$	Соединение	$R_{\text{Проба}}$
5 $\alpha$ -Андростан-3 $\beta$ , 5-диол-17-он	0	5 $\alpha$ -Андростан-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -диол	0,33
$\Delta^5$ -Андростен-3 $\beta$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -триол . . . . .	0	5 $\beta$ -Андростан-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -диол	0,35
5 $\beta$ -Андростан-3 $\beta$ , 11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -триол . . . . .	0,01	$\Delta^{1,4}$ -Андростадиен-17 $\beta$ -ол-3-он	0,42
5 $\alpha$ -Андростан-3 $\beta$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -триол . . . . .	0—0,05	5 $\alpha$ -Андростан-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -диол	0,42
$\Delta^5$ -Андростен-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -диол-16-он . . . . .	0—0,17	5 $\beta$ -Андростан-3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -диол	0,44
$\Delta^4$ -Андростен-3, 17-дион-6 $\alpha$ -ол	0,11	5 $\alpha$ -Андростан-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -диол	0,45
$\Delta^9$ -5 $\beta$ -Андростен-3 $\alpha$ -ол-17-он (загрязнен) . . . . .	0,15	5 $\beta$ -Андростан-17 $\beta$ -ол-3, 11-дион	0,48
$\Delta^5$ -Андростен-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -диол	0,20	5 $\beta$ -Андростан-3 $\alpha$ -ол-11, 17-дион	0,76
$\Delta^5$ -Андростен-3 $\beta$ -ол-7, 17-дион	0,22	Тестостерон . . . . .	1,00
5 $\alpha$ -Андростан-3 $\beta$ -ол-6, 17-дион	0,22	17 $\alpha$ -Тестостерон . . . . .	1,35
11-Кетотестостерон . . . . .	0,29	17-Метилтестостерон . . . . .	1,63
5 $\alpha$ -Андростан-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -диол-16-он . . . . .	0,31	3 $\beta$ -Андростерон . . . . .	1,66
$\Delta^5$ -Андростен-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -диол	0,32	Дегидроэпиандростерон . .	1,73
$\Delta^4$ -Андростен-6 $\beta$ -ол-3, 17-дион	0,33	5 $\beta$ -Андростан-3 $\alpha$ -ол-17-он . .	1,86
		5 $\beta$ -Андростан-17 $\beta$ -ол-3-он . .	2,03
		$\Delta^{1,4}$ -Андростадиен-3, 17-дион	2,07
		Адреностерон . . . . .	2,08
		5 $\alpha$ -Андростан-17 $\beta$ -ол-3-он . .	2,08
		5 $\alpha$ -Андростан-3, 7, 17-трион	2,57
		Андростерон . . . . .	2,72

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для анализа можно использовать метод спектрофотометрии на бумаге (Теннент и сотрудники). 17-Кетостероиды можно количественно определять после реакции Циммермана промасливанием хроматограммы и непосредственной фотометрией пятен (Эртель) или после элюирования непроявленных пятен (по образцу для сравнения) с последующей колориметрией (Рубин и сотрудники). Для хроматографирования, при котором для определения применяют элюирование 17-кетостероидов и колориметрию с *m*-динитробензолом, Рубин и сотрудники рекомендуют предварительно экстрагировать бумагу в приборе Сокслета (48 час, смесь метанол—бензол, 1 : 1).

## ПРОИЗВОДНЫЕ ПРЕГНАНА

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

*Моча.* Мочу после кислотного или ферментативного гидролиза (обсуждение которого не входит в задачу данной книги<sup>1)</sup>) обрабатывают точно так же, как и для анализа 17-кетостероидов, однако с той разницей, что экстрагируют обычно хлороформом. Нестероидные пигменты можно выделить адсорбцией на угле (Ломбардо и сотрудники). Заффарони [2] рекомендует при хроматографировании смеси проводить предварительное фракционирование путем хроматографии на бумаге, особенно для биологического материала. Для количественного анализа или для идентификации веществ, содержащихся в незначительной концентрации, этот способ вполне надежен; для ориентировочного анализа достаточно использовать сырой материал, высушенный сульфатом натрия (чтобы удалить избыток водной фазы, содержащей, в частности, восстановители). При проявлении синим тетразолием (Д 5) можно использовать экстракт из 50—100 мл мочи.

*Кровь.* Заффарони [2], а также Аксельрод и Заффарони [5] рекомендуют обрабатывать кровь методом диализа в водном растворе метанола (II 52). Способность некоторых веществ к диализу весьма низкая (например, у прогестерона лишь 33%), в то время как у других, например у кортикоидов, она довольно высокая (у кортизола 92—94%), что обеспечивает селективность экстракции. Сущностью других методов является экстракция крови (например, смесью спирт — ацетон, 3 : 1), удаление липидов встряхиванием со смесью 70%-ного водного раствора этанола с петролейным эфиром, повторная экстракция хлороформом из водной фазы, промывка экстракта 0,1 н. едким натром и осаждение фосфатидов хлористым магнием (Буш [2]). Осаждение фосфатидов является весьма трудным приемом, требующим большого количества времени и сопровождающимся значительными потерями. Для систем с водным раствором метанола, когда требуется особая чистота образца, экстракты из крови (плазмы) необходимо предварительно хроматографировать на колонке с силикагелем (2 г/см) в виде раствора в смеси бензол — этилацетат (1 : 1). Элюцию проводят смесью этилацетата с метанолом (1 : 1, Буш [2]).

*Надпочечники.* Ткань после измельчения (в гомогенизаторе или на мясорубке) экстрагируют ацетоном. После концентрирования экстракта

<sup>1)</sup> О проблеме гидролиза кортикоидов мочи см., например, у Мейсона или Генри.

липоиды удаляют из водного раствора ацетона экстракцией петролейным эфиром или бензином, а кортикоиды — встряхиванием с хлороформом. Хлороформенный экстракт очищают встряхиванием с 9%-ным раствором  $\text{NaHCO}_3$  и с водой, а затем сушат сульфатом натрия. Необходимо тщательно отделять фазы при встряхивании. В случае системы формамид/бензол — хлороформ (4 : 1) можно использовать для анализа полученный экстракт, причем для этой цели достаточно 5 г говяжьей или свиной надпочечной железы.

### ОБНАРУЖЕНИЕ

Для обнаружения можно использовать различные реактивы, как обычные (см. стр. 339), так и специфически действующие на некоторые функциональные группы. Здесь преимущественно речь идет об открытии кортикоидов с  $\alpha$ -кетольной группировкой при  $\text{C}_{17}$ , с которыми весьма интенсивно реагирует синий тетразолий и несколько слабее — хлористый трифенилтетразолий (Д 5), аммиачный раствор азотнокислого серебра (Д 4) и др. 20-Кетогруппа реагирует с реактивом Циммермана (Д 82),  $\Delta^4$ -3-кетогруппу можно обнаружить описанным выше способом (см. стр. 341). Некоторые вещества этой группы дают синее окрашивание с водным раствором йода (см. стр. 342). Для идентификации можно использовать характерные спектры с серной кислотой по Заффарони [1] или микрохимические реакции.

Очень хороший метод предложил Аксельрод [3], который проводил микрохимическую реакцию непосредственно на бумаге. В табл. 157 (см. стр. 770) приводится схема анализа веществ с заместителями при  $\text{C}_{17}$ . В этой таблице приведены данные о взаимодействии отдельных групп с некоторыми реактивами (II 53 — II 58). Интересная схема анализа, основанная на реакциях, проводимых непосредственно на бумаге, с последующим проявлением пятен реактивом Циммермана или тетразолием приведена в цитируемой работе. Согласно исследованию Мацека (частное сообщение), этот метод заслуживает разработки, так как на практике имеют место затруднения, связанные с протеканием побочных реакций.

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Для веществ с большим числом кислородсодержащих функциональных групп лучше всего применять системы, содержащие воду. Тетрагидрокортисон, тетрагидрокортисол и подобные соединения хорошо разделяются в системе по Пехету (см. табл. 53).

Природные эфиры стероидов, глюкуроныды и сульфаты хорошо разделяются в системах, содержащих воду и *n*-бутилацетат (Любарт и Шнайдер). На рис. 146 приведен пример разделения смеси в системе *n*-бутилацетат — метанол — буферный 50%-ный раствор метанола в воде (0,1 *M* Na-вероналовый буфер с pH 8,2) в соотношении 150 : 50 : 50. Эта система, а также и другие (например, *n*-бутилацетат — *n*-бутанол — 10%-ная уксусная или муравьиная кислота, 8 : 2 : 10) весьма устойчивы к резким колебаниям температуры (реакцию можно проводить в температурном интервале 4 — 33°; продолжительность проявления 4—8 час, хроматограмму необходимо оставлять на ночь). Следует отметить, что методы Любарта и Шнайдера можно будет применить для анализа биологического мате-

риала, не прибегая к предварительному гидролизу; проявление соединений с сопряженными двойными связями осуществляют фосфорномолибденовой кислотой или тетразолием.

В бензоле с 30%-ным водным раствором метанола разделяют кортизон и альдостерон ( $R_f$  0,40 и 0,35, Гарман и сотрудники). Шмидт и Штаудингер разделяют кортикоиды в воде, насыщенной гептиловым спиртом, бумагу пропитывают гептиловым спиртом в качестве неподвижной фазы.

В системах Буша (см. табл. 52) легко разделяются многие более полярные производные (см. стр. 344), к которым относятся как кортикоиды (рис. 147), так и прочзводные прогестерона и прегнандиола (например, система В<sub>4</sub> Буша). Для этой цели также пригодны системы Эберлейна и Бонджиовани.

Еще более всеобъемлющими являются методы Заффарони. Изменением подвижной фазы с использованием формамида или пропиленгликоля в качестве неподвижной фазы можно разделять стероиды от  $C_{21}O_2$  до  $C_{21}O_6$ , как это видно из табл. 54. Система формамид — циклогексан по сравнению с системой формамид — гексан является более быстрой и более избирательной для веществ с низкой полярностью. Для сложных эфиров (ацетатов) рекомендуют также систему формамид/бензол — циклогексан (1 : 1, Маттокс и сотрудники).

Для доказательства идентичности стероидов, содержащих 21 атом углерода, главным образом кортикоидов, наряду со смешанным хроматографированием самих веществ применяют хроматографирование их ацетатов (II 59) по Бушу и Зандбергу [4], 17-кетопроизводных после окисления боковой цепочки при  $C_{17}$  или эпоксидов (II 60), согласно данным различных авторов.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Определение стероидов, содержащих 21 атом углерода, основано чаще всего либо на восстановительных свойствах  $\alpha$ -кетольной или гликольной группы, либо на присутствии  $\Delta^4$ -3-кетонной группы, либо на реакции с фенилгидразином в случае 17,21-диокси-20-кетостероидов. К первому случаю относится образование формазапов, которые определяются колориметрически. Реакцию с солью тетразолия можно проводить непосредственно на бумаге по Д 5 с последующим измерением окрашенных элюатов отдельных пятен (Гофман и Штаудингер [1, 2]). Для целей элюирования применять пиридин не рекомендуют и пользуются или тетрагидрофураном (Гофман и Штаудингер [2]), или, в случае вымывания с влажной бумаги, смесью этилацетата с метанолом (7 : 3). Применяя эти методы, Таучстон и Чжен Тен-су получили 97%-ный выход, считая на исходное количество  $\alpha$ -кетолстероидов. Другой возможностью является реакция с тетразолием, которую проводят в пробирке после элюирования пятен стероидов, сравнивая полученный результат с образцом, поскольку неравномерное опрыскивание часто способствует образованию различных артефактов, даже если берут поправку на слепой опыт с опрыскиваемой бумагой. Важным условием для всех методов количественного анализа является тщательное элюирование пятен с бумаги. Заффарони [4] рекомендует проводить элюирование метанолом, причем предварительно нарезанные полоски (соответствующие площади пятен стероидов) вымачивать в метаноле в течение 2 час, а затем промывать метанолом в токе азота (после двухчасового элюирования выходы составляют 98—101%). Пример коли-

чественного анализа визуальным методом приведен на рис. 148а и б.

Количественный анализ стероидов с  $\Delta^4$ -3-кетогруппой можно проводить непосредственно с помощью фотометрии по Тенненту или измерением поглощения при 240 мμ в метанольном элюате (Заффарони и Бертон [3]). Также можно пользоваться флуорометрией после реакции с едким натром (Айрес и сотрудники). Очень часто используют реакцию Портера — Зильбера с фенилгидразином и серной кислотой после хроматографического фракционирования на бумаге (Коп и Херлок, Уилсон и сотрудники, Фаррел и др., см. II 61).

Определение стероидных эфиров в виде гидроксамовых кислот после реакции с гидроксиламином менее распространено. Однако этим методом можно анализировать любой стероидный спирт, вот почему он является столь ценным при изучении проблемы гидролиза стероидных эфиров (Заффарони [2], II 62). Биологические испытания можно также применять для количественного анализа (Гранди и Симпсон), но расшифровка в этом случае должна быть более осторожной (Лютер и Аксельрод, Веннинг и сотрудники).

## СТЕРОЛЫ И КАЛЬЦИФЕРОЛЫ

*Ч. Михалец*

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Способ приготовления образцов зависит от характера анализируемого материала. Чаще всего проводят омыление образца, и неомыленную часть продукта отделяют либо непосредственно, либо очищают и фракционируют на хроматографической колонке, а также другими методами. Полученные фракции хроматографируют затем на бумаге.

Для количественного анализа витаминов D Кодичек и Эшби [2] очищали неомыляемую часть хроматографированием на окиси магния и дигитониновым осаждением. Гаркина отделяет стероиды вымораживанием, а витамин А — хроматографированием на бентоните.

### ОБНАРУЖЕНИЕ

Для идентификации стероидов на бумаге было предложено большое число цветных реакций, из которых чаще всего рекомендуют реакцию с треххлористой сурьмой в ледяной уксусной кислоте (Д 78а). Окрашивание, возникающее при действии этого реактива, имеет оттенки от оранжево-красного до сине-фиолетового. Пятна такого же цвета получаются при обработке хлороформным раствором треххлористой сурьмы, к которому добавляется хлористый тионил. В ультрафиолетовом свете пределы наблюдений повышаются, так как пятна обнаруживают весьма сильную флуоресценцию. 10%-ный раствор фосфорновольфрамовой кислоты в этаноле дает при нагревании до 110° интенсивное красно-фиолетовое окрашивание с оранжевой флуоресценцией в ультрафиолетовом свете. Холестерин, его эфиры и некоторые родственные вещества можно открывать реакцией Либермана — Бурхарда при комнатной температуре (Д 85). Бромпроизводные ненасыщенных стероидов, которые в результате реакции

с Д 78 дают синее окрашивание, проявляются раствором азотнокислого серебра (Д 4). Сильно липофильные вещества, которые нельзя обнаружить приведенными выше реакциями, определяются окрашиванием с эриохром цианином (Д 87).

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

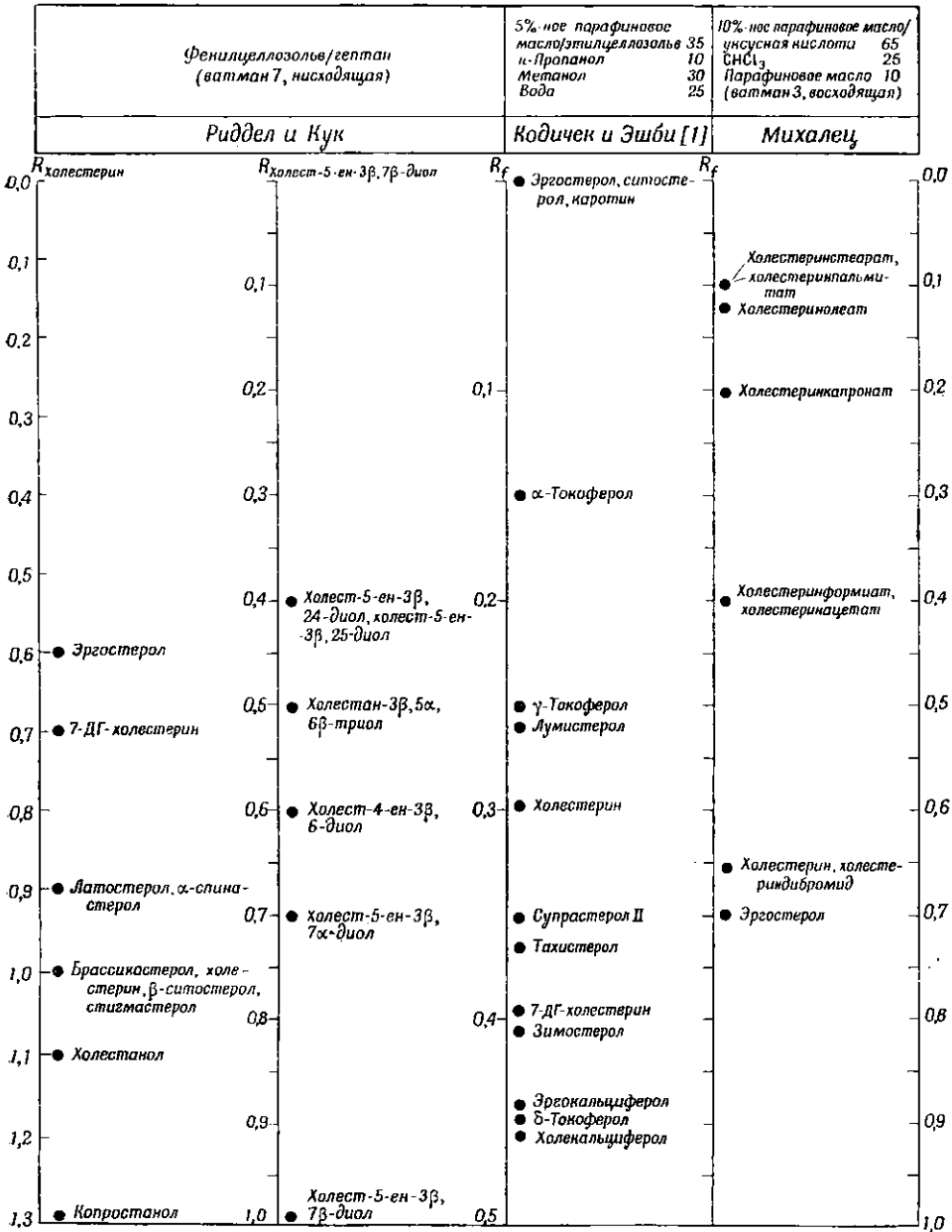
При выборе систем растворителей для таких малополярных веществ, какими являются стероиды, рекомендуют пропитывать бумагу фенилцеллозольвом (2-феноксипропанол), парафиновым маслом и керосином. Для разделения холестерина, его производных и различных стероидов растительного происхождения Смит, а позднее Риддел и Кук использовали для пропитывания фенилцеллозольв и в качестве подвижной фазы — гептан. Данные о подвижности анализируемых веществ приведены в табл. 60. Вопросом разделения холестерина и его эфиров с низшими и высшими жирными кислотами занимался Михалец; на бумаге, пропитанной 10%-ным парафиновым маслом в бензоле или эфире, он хроматографировал по восходящему методу смесью ледяная уксусная кислота — хлороформ — парафиновое масло (65 : 25 : 10). Он достиг хорошего отделения холестерина, холестеринацетата, холестеринкапроата и эфиров с высшими жирными кислотами (рис. 149). Керосин (т. кип. 190—220°) в качестве пропитывающего средства и 60%-ный *n*-пропанол Мартин и Буш применяли для разделения холестерина и его производных, а Кучера и сотрудники использовали бензиловый спирт для частичного разделения холестана и холест-5-ена.

Если пропитать бумагу 5%-ным парафиновым маслом в петролейном эфире или 1—5%-ным раствором парафина в хлороформе, или, наконец, 3%-ным касторовым маслом и хроматографировать смесью *n*-пропанол — метанол — вода в соотношении 15 : 82 : 3 (Гаркина), то можно достигнуть разделения стероидов и витаминов группы D. С этой же целью Давис и сотрудники применяли бумагу, пропитанную квилонем. Можно сказать, что все упомянутые системы до сих пор не отвечают тем требованиям, которые к ним предъявляются, поскольку еще не удается достигнуть полного разделения веществ при совместном их присутствии в анализируемом материале. Лучше, чем одномерная техника хроматографирования, зарекомендовала себя, по крайней мере в некоторых случаях, двумерная техника, которую можно применять прежде всего на бумаге, пропитанной парафиновым маслом. При этом, как указал Михалец (неопубликованные результаты), в первом направлении используют комбинацию смеси ледяная уксусная кислота — хлороформ — парафиновое масло (65 : 25 : 10), а во втором — *n*-пропанол — метанол — вода (15 : 82 : 3). При таком порядке легко разделить холестерин, его сложные эфиры, холест-4-ен-3-он и холестериндибромид (рис. 149).

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Количественный анализ холестерина и его эфиров с жирными кислотами Михалец проводил в хлороформенных элюатах нарезанной на кусочки хроматограммы колориметрическим методом, используя для этой цели реакцию Либермана — Бурхарда. Полученные результаты хорошо совпадают с данными других количественных методов.

Таблица 60  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ СТЕРОЛОВ И ВИТАМИНОВ



Пятна витаминов группы D, которые проявляются в виде темных участков при просматривании хроматограммы в ультрафиолетовом свете (256 мμ), вырезают, вымывают 5 мл метанола и фотометрируют при 265 мμ (Кодичек и Эшби [2]). На анализ необходимо брать по крайней мере 25 мкг витамина D, причем образец не должен содержать заметных количеств

витамина А. Гаркина определяет интенсивность пятен, проявленных треххлористой сурьмой, либо визуально, либо вымывает их при 40° спиртом, отфильтровывает выпавший после охлаждения парафин, остаток экстракта растворяет в хлороформе и анализирует его колориметрическим методом, используя для этой цели реакцию с треххлористой сурьмой.

## СТЕРОИДНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ И ИХ ГЕНИНЫ

### 3. Юнг

#### ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ НА ВЕЛИЧИНУ $R_f$

О подвижности гликозидов можно обычно судить по строению генина, а также по типу и количеству молекул сахара.

Влияние отдельных заместителей в молекуле стероидов в зависимости от степени их полярности, а также влияние числа и положения этих заместителей на коэффициент распределения рассматривалось в общих чертах на стр. 334. Необходимо лишь учесть, что гидроксильная группа, находящаяся в положении  $C_{12}$ , имеет более гидрофильный характер по сравнению с гидроксильной группой при атоме углерода  $C_{16}$ , о чем свидетельствует поведение гитоксигенина и дигоксигенина, а также гликозидов — производных этих генинов: ланатозидов, дезацетилланатозидов, дезацетилдезгликоланатозидов и дезгликоланатозидов (Буш и Тейлор; Кайзер; Чеше и сотрудники и др.).

Другим примером является более гидрофильный характер гидроксильной группы, находящейся в положении 11а, по сравнению с гидроксильной группой, находящейся в положении 5β, как это вытекает из поведения сарментогенина и периплогенина (Буш и Тейлор; Гефتمان и Левант). Ангидропроизводные имеют по сравнению с нормальными производными величину  $R_f$ , сдвинутую в сторону менее полярной фазы (например, Буш и Тейлор; Чеше и Шихофер). При ацилировании генинов гидрофильный характер снижается пропорционально количеству ацилированных гидроксильных групп (Хегедюш и сотрудники); определяющим фактором является также положение ацильной группы и ее величина. Эти факты установлены работами Буша и Тейлора, Хаака и сотрудников [4] и Кайзера. *алло*-Формы (конфигурации лактонного цикла 17а) являются более гидрофильными, нежели нормальные формы (Гефتمان и Левант; Кайзер). У изопроизводных, вероятно, имеет место обратная зависимость (Кайзер).

Весьма характерным является влияние сахарных остатков на хроматографическое поведение гликозидов. Как правило, с увеличением количества молекул сахара снижается величина  $R_f$ ; степень снижения определяется видом сахара. Так, например, одна молекула определенного вида сахара может снизить величину  $R_f$  больше, чем три молекулы другого вида сахара. Влияние одного и того же вида сахара не одинаково и зависит от того, связан или не связан он непосредственно с генином.

Из поведения гитоксина, строспезида, дезацетилланатозида В, гитопина и *digitalinum verum* (Йенсен и Теннё; Кайзер и др.) вытекает, что гидрофильный характер гликозидов растет в зависимости от вида сахара в следующем порядке: 3 молекулы дигитоксозы, дигиталоза, 3 молекулы вигитоксозы и глюкоза, глюкоза, дигиталоза и глюкоза. Из поведения

сомалина, хонгелина, эхубиозида (Штрибель и сотрудники) вытекает следующий порядок: цимароза, теветоза, цимароза с глюкозой; из поведения дигитоксина, нерифолина, ланатозида А и теветина (Кайзер; Менар и Лафарг) вытекает следующий порядок: 3 молекулы дигитоксозы, теветоза, 3 молекулы дигитоксозы с ацетилом и глюкоза, теветоза с 2 молекулами глюкозы; из поведения цимарина и конваллатоксина (Менар и Лафарг) вытекает следующий порядок: цимароза, рамноза, а из поведения миллозида, паулиозида и стробозида (Шиндлер и Райхштейн [2]) вытекает следующий порядок: цимароза, сарментоза, бойвиноза. Таким образом, из этих наблюдений можно составить следующий ряд сахаров в порядке роста полярности: цимароза, дигиноза, дигитоксоза, теветоза, дигиталоза, рамноза, глюкоза. Эта последовательность находится в соответствии с гидрофильным характером свободных сахаров, как это было установлено (например, Кайзером) методом хроматографии на бумаге в различных системах.

Нельзя, однако, утверждать, что в системах с закрепленной полярной фазой генин всегда имеет более высокое значение  $R_f$ , чем гликозидное производное этого генина. Так, например, дигитоксигенин, гитоксигенин и дигоксигенин имеют в системе с закрепленным формамидом при проявлении хлороформом более низкое значение  $R_f$ , чем дигитоксин, гитоксин и дигоксин; если для проявления применять смесь бензол — хлороформ (6 : 4), то генины передвигаются уже перед соответствующими дигитоксинами (Мерфи, Йенсен [2]). Такую же картину можно наблюдать, если подвижной фазой является смесь метилэтилкетона с ксилолом (1 : 1) (Кайзер) или если закрепленной фазой является вода или водно-спиртовый раствор, а подвижной фазой — бензол или хлороформ (Сасакава и др.). Олеандрин, цимарол, цимарин, аллоцимарин и сарментоцимарин в системе с формамидом также имеют менее гидрофильный характер по сравнению с соответствующими генинами (Кайзер; Шиндлер и Райхштейн [1]). Таким образом, можно сделать вывод, что в описанных случаях значение  $R_f$  определяется как степенью полярности сахаров и гидроксильных групп при  $C_3$ , так и применяемой системой.

Ацетильная группа в молекуле сахара, согласно утверждению ряда авторов, снижает гидрофильность, причем в большей степени у  $\beta$ -формы и в меньшей — у  $\alpha$ -формы. Рохатжи, однако, указывает, что в системе с закрепленным пропиленгликолем наивысшее значение  $R_f$  имеет  $\alpha$ -ацетилдигитоксин, более низкое — дигитоксин и наинизшее —  $\beta$ -ацетилдигитоксин.

## ОБНАРУЖЕНИЕ

Для обнаружения стероидных гликозидов используют:

а) цветные реакции, основанные на реакции метиленовой группы бутенолидного кольца дигиталовидных гликозидов;

б) реакции и реактивы, которые превращают гликозиды в ангидропроизводные и другие производные, флуоресцирующие в ультрафиолетовом свете;

в) контактное фотографирование при длине волны 300 м $\mu$  для сциллоидных гликозидов;

г) цветные реакции, характерные для углеводных компонентов.

Из первой группы можно рекомендовать реакцию Раймонда, которую использовали Шиндлер и Райхштейн [1], Йенсен [2] и др. Чувствитель-

ность этих реакций составляет приблизительно 5  $\mu\text{г}$ ; образующееся окрашивание необходимо, однако, тотчас же зарисовать, поскольку через несколько минут оно ослабевает (Д 826). Для проявления рекомендуют также щелочной раствор 3,5-динитробензойной кислоты (Д 88), с которой гликозиды наперстянки дают пурпурное окрашивание. Это окрашивание более устойчиво, чем окрашивание, возникающее при действии *m*-динитробензола.

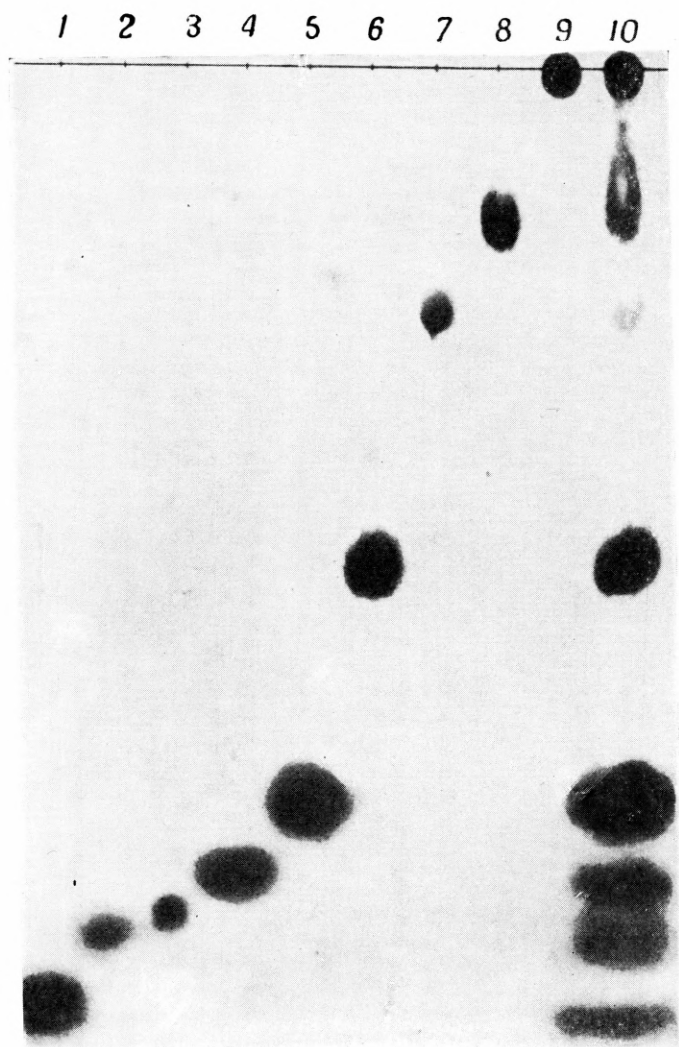
Некоторые авторы рекомендуют для проявления применять аммиачный раствор азотнокислого серебра, который восстанавливается ненасыщенным лактоновым циклом (Д 4). Проявление с помощью нитропруссидна натрия или реактива Бальгета не имеет преимуществ перед упомянутыми способами.

Из способов проявления второй группы наиболее приемлема реакция с треххлористой сурьмой (Д 78), при которой наблюдается весьма интенсивная и разнообразная по окраске флуоресценция агликонов и гликозидов; так, например, в случае гликозидов наперстянки по тону окраски можно судить об их принадлежности к ряду А, В или С. У гликозидов углеводный компонент способствует одновременно и флуоресценции, и окрашиванию, тогда как генины вызывают только флуоресценцию. Согласно данным Дайбинга и сотрудников, указанным способом можно обнаружить и сциллоидные гликозиды. Чувствительность обнаружения составляет примерно 3—5  $\mu\text{г}$ , а для соединений, дающих синюю флуоресценцию, чувствительность еще выше. Аналогичные результаты в случае дигиталоидных и сциллоидных гликозидов дает также проявление раствором трихлоруксусной кислоты (Д 89) или же проявление той же кислотой с добавкой хлорамина (Д 90). К той же группе относится проявление фосфорной кислотой (Д 75) и смесью анисового альдегида с серной и уксусной кислотами. Сциллоидные гликозиды можно проявлять с помощью видоизмененной реакции Либермана, используя раствор 4%-ной (объемн.) серной кислоты в уксусном ангидриде; способ такой же, как и в случае Д 85. При проявлении фуруролом (Д 91) образуются четко выраженные пятна, однако этот способ имеет тот недостаток, что фурурол необходимо применять в свежеперегнанном виде; при слабом перегреве бумага окрашивается в фиолетовый цвет. Поэтому лучше применять *n*-диметиламинобензальдегид с серной кислотой (Д 102).

Для обнаружения пятен сциллоидных гликозидов Бернаскони и сотрудники применяли контактное фотографирование при освещении светом с длиной волны 300  $\mu\text{м}$ , при которой эти вещества имеют максимум поглощения. Таким образом, можно открывать вещества в количестве нескольких микрограммов.

К четвертой группе относятся реакции, с помощью которых проявляют углеводные компоненты гликозидов. Блисс и Рамстед осуществили ферментативное расщепление гликозидов, разделенных на бумаге, после чего определяли сахара специфическими реакциями проявления. Для непрямого проявления можно далее использовать прием, разработанный Цифонелли и Смитом и примененный Греггом и Гисволдом для некоторых сердечных гликозидов. Этот способ основан на том, что при опрыскивании разбавленным раствором перйодата окисляется *цис*-1,2-гликольная группа с одновременным восстановлением перйодата в йодат. Если прискивать хроматограмму раствором бензидина, то гликозиды проявляются в виде бесцветных пятен на синем фоне (Д 286).

Оценку отдельных проявляющих реактивов приводят Габерман и сотрудники, Йенсен [2] и Кац.



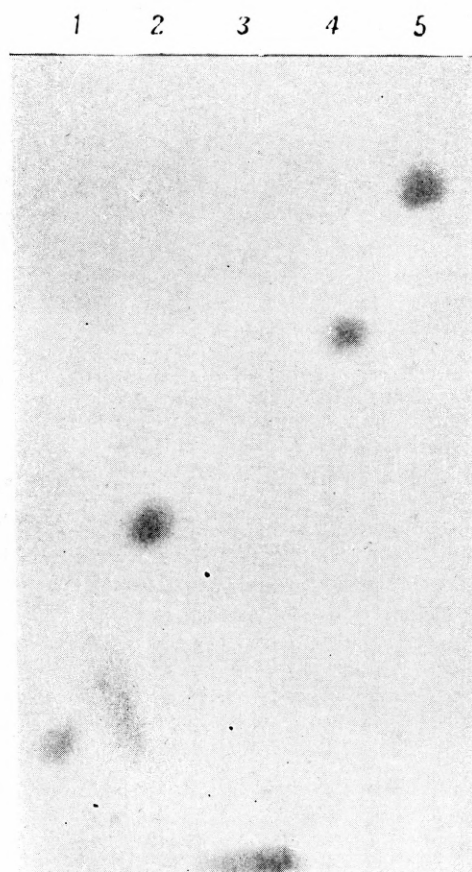
Р и с. 140. Хроматография фенола на бумаге (Прохазка).

Система: изопропиловый эфир, насыщенный водой. Проявитель:  $\text{AgNO}_3$  (Д4).  
 1 —  $\alpha$ -нафтол; 2 — пирокатехин; 3 — орцин; 4 — резорцин; 5 — гидрохинон; 6 — пирогаллол  
 7 — флороглюцин; 8 — галловая кислота; 9 — оксигидрохинон; 10 — смесь фенолов.



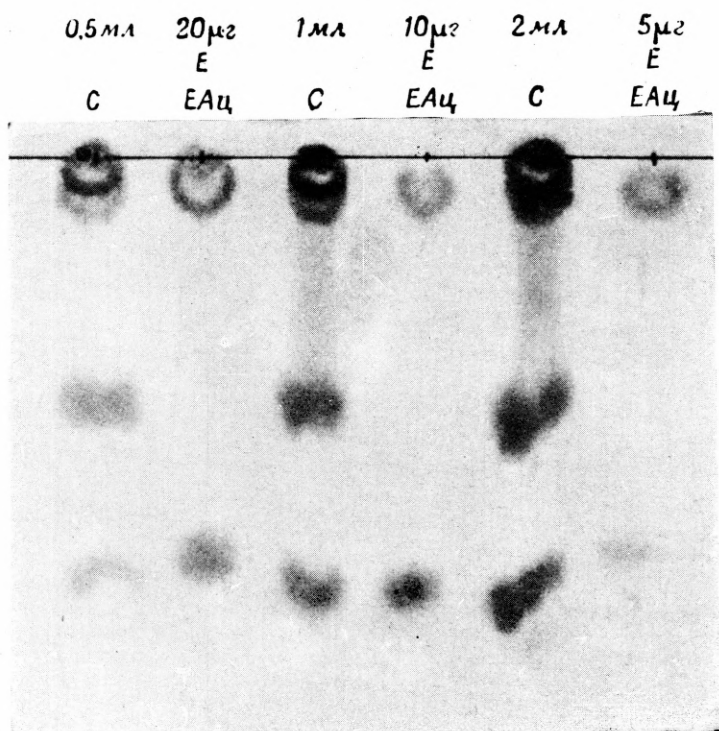
Р и с. 146. Хроматография стероидных глюкуро-  
нидов и сульфатов (Любарт и Шнайдер).

Система: *n*-бутилацетат—метанол—буферный раствор,  
рН 8,2 (см. текст). 1 — глюкуронид  $\beta$ -кортилона;  
2 — глюкуронид  $H_4E$ ; 3 — глюкуронид дегидроэпиан-  
дростерона; 4 — глюкуронид прегнадиола; 5 — суль-  
фат дегидроэпиандростерона; 7 — сульфат прегнено-  
лона, М — смесь.

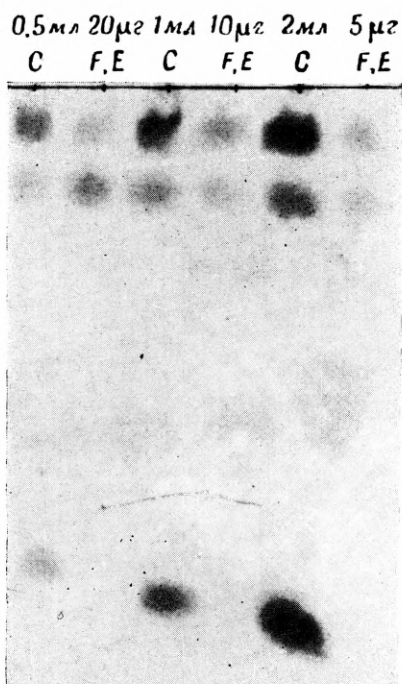


Р и с. 147. Разделение некоторых кор-  
тикоидов в системе по Буну (Мацек и  
Вансчек).

Система: бензол — метанол — вода (2 : 1 : 1).  
Проявление: *n*-фенилендиамин с фталевой  
кислотой (ДСИ). 1 — 11-дезоксип-17 $\alpha$ -окси-  
кортикостерон; 2 — кортизон; 3 — корти-  
зонацетат; 4 — кортизол; 5 — 11 $\alpha$ -эпимер  
кортизола.



а

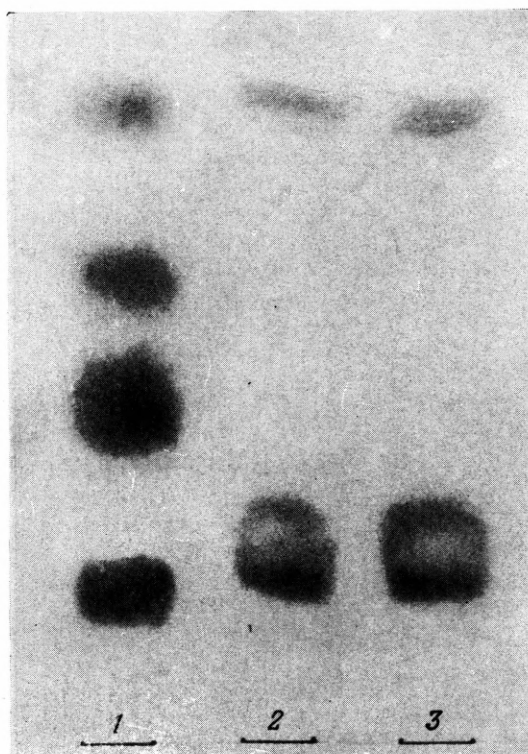


б

Р и с. 148. Анализ экстракта надпочечной железы (Сибликова).

а — система: формамид/бензол — хлороформ (4 : 1). Проявление синим тетразолием (Д 5). С — инъекционный раствор кортина (мл); Е — кортизон; ЕАц — кортизонацетат. 11-Дегидрокортикостерон анализированных растворов перемещается так же, как и ЕАц, а кортикостерон — медленнее.

б — система: формамид/бензол — хлороформ (4 : 1) с перетеканием. В качестве метчиков применялись соединения F (кортизол) и E (кортизон). В анализированных образцах еще содержится кортикостерон, тогда как 11-дегидрокортикостерон уже вытек с бумаги. Количественный анализ проводился путем сравнения величины и интенсивности пятен со стандартными образцами. Было найдено, что в 1 мл раствора кортина присутствует 16  $\mu$ г дегидрокортикостерона, 30  $\mu$ г кортикостерона, 20  $\mu$ г кортизона и 35  $\mu$ г кортизола.



Р и с. 149. Хроматография холестерина и его эфиров (Михалец). Система: бумага, пропитанная 10%-ным раствором парафинового масла в эфире. Протекающей системой (восходящей) является ледяная уксусная кислота — хлороформ — парафиновое масло (65 : 25 : 10). Проявление осуществлялось фосфорновольфрамовой кислотой. 1 (от линии старта к фронту) — холестерилстеарат+холестерилпальминат, холестерилкапронат, холестерилацетат+холестерилформиат, холестерин; 2 и 3 — эфиры холестерина с высшими жирными кислотами и холестерин, выделенные из сыворотки крови человека.

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

## Системы с закрепленной водной фазой

*Без пропитывания.* Для хроматографирования гликозидов и генинов безводные органические растворители использовались только в единичных случаях. Большая часть описанных систем содержала в качестве неподвижной фазы воду или водно-спиртовой раствор. Подвижная фаза состоит из органических растворителей с различной степенью гидрофильности, от низших спиртов и кетонов через уксусноэтиловый эфир, хлороформ, бензол к толуолу и их смесям (Сасакава и др.). Недостатки систем этого типа заключаются в том, что при продвижении веществ имеют место адсорбционные явления, способствующие удлинению пятен (при нанесении количеств в несколько десятков микрограммов) и увеличению зависимости величины  $R_f$  от количества вещества. Эти явления наблюдаются прежде всего при хроматографировании более гидрофильных веществ.

*Пропитывание водой.* Для гидрофильных гликозидов рекомендуют способ Шенкера и сотрудников, которые применяли системы *n*-бутанол с водой, *n*-бутанол с толуолом (1 : 1) и *n*-бутанол с хлороформом и водой. Бумагу пропитывают водной фазой и проявляют спиртовой фазой. Эти системы применяют, например, там, где нужно было бы проявлять системами типа Заффарони с перетеканием, или если хотят исследовать поведение вещества во многих системах и т. п. Так же как и в других способах, при которых необходимо пропитывать бумагу, имеет место некоторое уменьшение величины  $R_f$  в зависимости от степени пропитывания и температуры; влияние температуры в данном случае более заметно, чем в других системах, и, кроме того, при температуре выше 17° повышается склонность к удлинению пятен. Поскольку фронт продвигающейся фазы иногда бывает незаметным, его проявляют путем нанесения красителя 1-амино-2-метилантрахинона, который продвигается вместе с подвижной фазой; фронт подвижной фазы можно также исследовать в ультрафиолетовом свете по флуоресценции примесей, вымываемых из бумаги. В этих системах можно, например, разделять строфантовые гликозиды, оубаин, конваллатоксин и др. (Шенкер и сотрудники).

## Закрепленный полярный органический растворитель

Эти системы, называемые системами типа Заффарони, были вначале применены для разделения стероидных гликозидов Шиндлером и Райхштейном [1], которые с их помощью исследовали гликозиды рода *Strophanthus*. Йенсен [2], Йенсен и Тенные и другие исследователи применяли точно такие же или аналогичные системы для разделения гликозидов наперстянки, а Кайзер расширил выбор соответствующих растворителей. Этим системам благодаря их преимуществам отдают предпочтение при разделении стероидов (см. стр. 346). При хроматографировании с перетеканием необходимые значения  $R_f$  достигаются гораздо раньше на бумаге, обеспечивающей быстрое протекание растворителя. Например, на бумаге ватман 4 при сохранении хорошего разделения скорость тока гораздо выше, чем на бумаге ватман 1. Кроме формамида, который применяется чаще всего в качестве закрепленной фазы, можно применять некоторые гликоли, и прежде всего пропиленгликоль. И в этих системах получают очень хорошее разделение, однако применение такого метода несколько ограничено, поскольку хлороформ и некоторые растворители средней гидрофильности смешиваются с пропиленгликолем.

С формамидом в качестве закрепленной фазы и бензолом в качестве подвижного растворителя можно разделять, например, строфантовые генины и их ацетаты. Разделение смесью бензола с хлороформом или чистым хлороформом выгодно применять для строфантовых и дигиталонидных генинов, для строфантовых моногликозидов, деацетилдезгликоланатозидов и частично для ланатозидов и т. п. Смеси метилэтилкетона с ксилолом (1 : 3 или 1 : 2) можно применять для разделения генинов, их ацетатов и  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм дезгликоланатозидов; для гликозидов с более гидрофильным характером выгодно брать соотношение 1 : 1. Значения  $R_f$ , достигаемые при использовании хлороформа, можно повышать, сокращая тем самым время протекания растворителя. Для этого следует добавить 20 %-ный ацетон или уксусноэтиловый эфир. Смесь хлороформа с тетрагидрофураном (50 : 50), частично насыщенная формамидом (6,5%), хорошо зарекомендовала себя при разделении ланатозидов, деацетилланатозидов и гликозидов с приблизительно одинаковой полярностью.

### Обращение фаз

Чеше и сотрудники применяли для разделения стероидных гликозидов системы с обращенными фазами. Бумагу пропитывали высшими спиртами ( $C_4$ — $C_8$ ) или эфирами дикарбоновых кислот (малоновой, щавелевой). Для хроматографирования применяли водную фазу по возможности с добавкой формамида для повышения растворимости гликозидов. Преимуществом этих систем является возможность в широком интервале изменять их разделяющую способность в зависимости от характера хроматографируемых соединений, подбирая соответствующую закрепленную фазу либо повышая или снижая добавки формамида к подвижной фазе. Результатом этого является, с одной стороны, хорошее разделение полярных гликозидов, например оубаина, с изобутанолом в качестве закрепленной фазы и с водой в качестве подвижной фазы, с другой стороны, разделение ланатозидов и деацетилланатозидов при пропитывании спиртовой и хроматографировании водной фазами смеси *n*-октанола с амиловым спиртом, водой и формамидом (6 : 2 : 8 : 2) (табл. 61). С помощью этих же растворителей при более высоком содержании формамида (6 : 2 : 1 : 4) можно также хорошо разделять мало гидрофильные генины. Применяемые растворители обладают низкой упругостью пара, однако при нагревании их удается удалить из бумаги. Емкость систем довольно значительна, «хвосты» не образуются, однако в большинстве случаев в отличие от систем с закрепленным формамидом или пропиленгликолем необходимо наносить соединения на пропитанную бумагу. При нанесении на сухую бумагу и при дополнительном пропитывании можно прийти к тому, что гликозиды в закрепленной фазе не будут растворяться; при постепенном вымывании будет происходить образование «хвостов».

Гюнзел и Вейсс применяли при хроматографировании гликозидов наперстянки бумагу, пропитанную силиконом.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Определение гликозидов наперстянки после разделения на бумаге Габерман и сотрудники осуществили путем фотометрии с реактивом Бальета. Результаты, однако, были неточными, что обуславливалось потерями гликозидов за счет поглощения их бумагой в процессе продвижения или

Таблица 61

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ГЛИКОЗИДОВ НАПЕРСТЯНКИ И ЛАНДЫША

$R_f$	Формамид/метил- этилкетан 1 Ксилол 1 Восходящая	Формамид/ CHCl <sub>3</sub> 50 Тетрагидрофуран 50 Формамид 6,5 Восходящая	н-Октанол 3 Амилловый спирт 1 Вода 4 Формамид 1 Неподвижная фаза - спиртовая Подвижная фаза - водная	Амилловый спирт 1 Вода 1 Неподвижная фаза - спиртовая Подвижная фаза - водная
	Кайзер		Чеше и сотрудники [1]	Чеше и Шихофер [3]
0,0	● Строспезид		● Ацетилдигитоксин-α и β ● Дигитоксин	
0,1	● Дигитоксин	● Деацетилланатозид С	● Ацетилдигитоксин-α и β	
0,2		● Digitalinum veget	● Гитоксигенин ● Гитоксин	
0,3	● Гитоксин ● Дигитоксигенин	● Ланатозид С	● Ланатозид А ● Дигитоксин	● Валларотоксин
0,4	● Ацетилдигитоксин-α ● Гитоксигенин ● Ацетилдигитоксин-β	● Ланатозид В ● Деацетилланатозид А	● Деацетилланатозид А	
0,5		● Строспезид		
0,6	● Ацетилгитоксин-α ● Ацетилгитоксин-β		● Ланатозид В	
0,7	● Дигитоксин		● Деацетилланатозид В ● Гиторин	● Маялозид ● Конваллатоксин ● Конваллатоксол
0,8	● Дигитоксигенин	● Ланатозид А	● Ланатозид С	● Конваллозид ● Конваллатоксол
0,9	● Ацетилдигитоксин-α ● Ацетилдигитоксин-β		● Digitalinum veget	● Гликоконваллозид
1,0				

при вымывании. Зильберман и Торп проявляли хроматограммы трихлоруксусной кислотой, а затем соответствующим устройством фиксировали флуоресценцию пятен на фотографической бумаге и определяли интенсивность почернения. Применение систем типа Заффарони и систем с обращенными фазами по Чеше с сотрудниками снижает потери гликозидов

в процессе хроматографирования до минимума. Таким образом, определение является более точным и чувствительным, если использовать либо флуорометрию по Йенсену [1, 3], либо фотометрию. В первом случае вырезанные участки хроматограмм с отдельными гликозидами вносят в обезвоживающий реактив и образующиеся ангидропроизводные определяют флуорометрически. Из фотометрических определений наиболее чувствительным является метод, при котором реакцией с ксантгидролом определяют дезоксисахарный компонент. Соответствующий прием хроматографирования описали Чеше и сотрудники (II 65). Этим способом было определено содержание отдельных ланатозидов и дезацетилланатозидов в продажных препаратах ланатозида ABC (Хрдый и сотрудники; Тужон и Ваштаг) и содержание дигитоксина, гитоксина и гиталоксина в веродигене (Хаак и сотрудники [1]). При определении гликозидов, которые не содержат дезоксисахарной группы, лучше всего применять упомянутую уже фотометрию с реактивом Бальета.

### СТЕРОИДНЫЕ САПОНИНЫ

Влияние гидроксильных групп стероидных компонентов на скорость продвижения является однозначным, и на эти группы, как и на остальные функциональные группы, распространяются закономерности, приведенные в общей части главы, посвященной стероидам. Из поведения рокогенина, гитогенина и хлорогенина следует, что гидроксильная группа, находящаяся в 2 $\alpha$ -положении, повышает гидрофильный характер в большей степени, чем гидроксильная группа, находящаяся в 12 $\beta$ -положении, но меньше, чем 6 $\alpha$ -гидроксильная группа. Влияние, обусловленное ацетилированием или наличием двойной связи, также можно объяснить закономерностями, приведенными в общей части.

Сапонины и сапогенины можно определять с помощью трихлоруксусной кислоты (D 89) или треххлористой сурьмы, растворенной в хлороформе, насыщенном водой. Образующиеся при этом пятна флуоресцируют в ультрафиолетовом свете. При проявлении альдегидами возникают пятна, различаемые в видимом свете; Саннье и Лапин применяли главным образом коричневый альдегид (D 92). Определение с помощью фосфорномолибденовой кислоты или гемолитического действия является менее чувствительным, нежели предыдущий способ проявления. При определении раствором перйодата и перманганата реагирует сахарный компонент сапонины.

Для разделения сапонинов и сапогенинов применяют системы с водой в качестве неподвижной фазы. Сапонины разделяются в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) или в системах, содержащих спирты C<sub>4</sub> — C<sub>6</sub> с добавкой хлороформа или бензола и насыщенных водой. Сапогенины, которые обычно менее гидрофильны, хроматографируют в системах с бензином, хлороформом и уксусной кислотой (100 : 40 : 4). Если величина *R<sub>f</sub>* слишком велика, то берут соотношение 100 : 4 : 1 (Саннье и Лапин). Гефتمان и Хайден применяли системы, содержащие в различном соотношении петролейный эфир, толуол, этанол и воду. Величины *R<sub>f</sub>* зависят от нанесенного количества; пятна имеют вытянутый вид.

### ПРИМЕНЕНИЕ

Хроматографию на бумаге применяют для идентификации гликозидов и сапонинов и для анализа при получении их в чистом виде. Этот

метод неоднократно указывал на существование новых соединений, из которых некоторые были впоследствии выделены, например дигинатин (Мерфи), гиталоксин, веродиген (Хаак и сотрудники [1—4]), дигифолеин, дигипурпурин и др. (Чеше и Гриммер).

Методом хроматографии на бумаге можно также исследовать стабильность гликозидов, что очень важно при анализе различных фармацевтических препаратов. Особенно легко отщепляется ацетильная группа, связанная с сахарным компонентом.

Хроматографическим методом был исследован метаболизм гликозидов и установлено, что ланатозид С отчасти получается в форме кардиоактивного «метаболита В», а дигитоксин в виде «метаболита С» (Браун и Райт и др.).

С помощью хроматографии можно определять активность дигипурпуразы в листьях наперстянки (Йенсен [4]), что имеет значение при выборе подходящего способа обработки лекарственного сырья для промышленного выделения гликозидов. Опыты по хроматографическому определению дигиталонидных медикаментов или настоек, проведенные рядом авторов, привели к замене биологического метода определения химическим.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Allouf R., Macheboeuf M., Bull. Soc. Chim. biol., 34, 215 (1952).  
 Arroyave G., Axelrod L. R., J. biol. Chem., 208, 579 (1954).  
 Axelrod L. R., J. biol. Chem., 201, 59 (1953). [1]  
 Axelrod L. R., Rec. Progr. Hormone Res., 9, 69 (1954). [2]  
 Axelrod L. R., Anal. Chem., 27, 1308 (1955). [3]  
 Axelrod L. R., Arroyave G., J. Am. Chem. Soc., 75, 5729 (1953). [4]  
 Axelrod L. R., Zaffaroni A., Arch. Biochem. Biophys., 50, 347 (1954). [5]  
 Ayres P. J., Simpson S. A., Tait J. F., Biochem. J., 62, 8P (1956).  
 Barton D. H. R., J. Chem. Soc., 1953, 1027.  
 Bassil G. T., Boscott R. J., Biochem. J., 48, xlvii (1951).  
 Bernasconi R., Sigg H. P., Reichstein T., Helv. chim. Acta, 38, 1767 (1955).  
 Beyreder J., Rettenbacher-Däubner H., Monatsh. Chem., 84, 99 (1953).  
 Bliss C. A., Ramstad E., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., 42, 348 (1953).  
 Bloom B. M., Agnello E. J., Laubach G. D., Experientia, 12, 27 (1956). [1]  
 Bloom B. M., Shull G. M., J. Am. Chem. Soc., 77, 5767 (1955). [2]  
 Bodánszky A., Kollonitsch J., Nature, 175, 729 (1955).  
 Boscott R. J., Biochem. J., 48, xlvii (1951). [1]  
 Boscott R. J., Chem. Ind., 21, 472 (1952). [2]  
 Brady R. O., J. biol. Chem., 193, 145 (1951).  
 Breuer H., Biochem. Z., 327, 6 (1955).  
 Brown B. T., Wright S. E., J. biol. Chem., 220, 431 (1956).  
 Burton R. B., Zaffaroni A., Keutmann E. H., J. clin. Endocrinol., 8, 618 (1948). [1]  
 Burton R. B., Zaffaroni A., Keutmann E. H., Science, 110, 442 (1949). [2]  
 Burton R., Zaffaroni A., Keutmann E., J. biol. Chem., 188, 763 (1951). [3]  
 Bush I. E., Nature, 166, 445 (1950). [1]  
 Bush I. E., Biochem. J., 50, 370 (1951). [2]  
 Bush I. E., Rec. Progr. Hormone Res., 9, 321 (1954). [3]  
 Bush I. E., Sandberg A. A., J. biol. Chem., 205, 783 (1953). [4]  
 Bush I. E., Taylor D. A. H., Biochem. J., 52, 643 (1952). [5]  
 Camber B., Federation Proc., 9, 158 (1950).  
 Cifonelli J. A., Smith F., Anal. Chem., 26, 1132 (1954).  
 Cope C. L., Hurlock B., Brit. med. J., 2, 1020 (1952).  
 Dirscherl W., Dardenne U., Biochem. Z., 325, 195 (1953). [1]  
 Dirscherl W., Gerhards E., Acta endocrinol., 19, 233 (1955). [2]  
 Dybing F., Dybing O., Jensen K. B., Acta pharmacol. toxicol., 10, 93 (1954).

- Eberlein W. R., Bongiovanni A. M., Arch. Biochem. Biophys., 59, 9 (1955).
- Euw J. W., Hess H., Speiser P., Reichstein T., Helv. chim. Acta, 34, 1821 (1951).
- Farrel G. L., Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 86, 338 (1954).
- Fukushima D. K., Dobriner S., Heffler M. S., Kritchevsky T. H., Herling R., Roberts G., J. Am. Chem. Soc., 77, 6585 (1955).
- Гаркина И. Н., в книге «Витаминные ресурсы и их использование. III. Методы определения витаминов». Изд. АН СССР, Москва, 1955, стр. 53.
- Gregg D. H., Gisvold O., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., 43, 106 (1954).
- Grundy H. M., Simpson S. A., Nature, 169, 795 (1952).
- Günzel Ch., Weiss F., Pharmazie, 10, 725 (1955).
- Haack E., Kaiser F., Gube M., Spingler H., Arzneim. Forsch., 6, 176 (1956). [1]
- Haack E., Kaiser F., Spingler H., Naturwissenschaften, 42, 441 (1955). [2]
- Haack E., Kaiser F., Spingler H., Naturwissenschaften, 42, 442 (1955). [3]
- Haack E., Kaiser F., Spingler H., Chem. Ber., 89, 1353 (1956). [4]
- Habermann E., Müller W., Schreglmann A., Arzneim. Forsch., 3, 30 (1953).
- Haines W. J., Drake N. A., Federation Proc., 6, 180 (1950).
- Harman R. E., Ham E. A., De Young J. J., Brink N. G., Sarrett L. H., J. Am. Chem. Soc., 76, 5035 (1954).
- Haskins A. J., Sherman A. J., Allen W. M., J. biol. Chem., 182, 429 (1950).
- Haslewood G. A. D., Biochem. J., 56, 581 (1954). [1]
- Haslewood G. A. D., Wootton V., Biochem. J., 47, 584 (1950). [2]
- Heftmann E., Science, 111, 571 (1950). [1]
- Heftmann E., J. Am. Chem. Soc., 73, 851 (1951). [2]
- Heftmann E., Hayden A. L., J. biol. Chem., 197, 47 (1952). [3]
- Heftmann E., Levant A. J., J. biol. Chem., 194, 703 (1952). [4]
- Hegedüs H., Tamm Ch., Reichstein T., Helv. chim. Acta, 38, 98 (1955).
- Henry R., Recueil, 74, 442 (1955).
- Herling T., Gallagher T. F., J. biol. Chem., 210, 123 (1954).
- Heusghem C., J. Pharm. Belg., 7, 499 (1952).
- Hofmann H. A., Staudinger H., Naturwissenschaften, 38, 2130 (1951). [1]
- Hofmann H. A., Staudinger H., Biochem. Z., 322, 230 (1951). [2]
- Hrdý O., Jung Z., Šlouf A., Českoslov. Farm., 4, 395 (1955).
- Jensen K. B., Acta pharmacol. toxicol., 8, 110 (1952). [1]
- Jensen K. B., Acta pharmacol. toxicol., 9, 99 (1953). [2]
- Jensen K. B., Acta pharmacol. toxicol., 10, 69 (1954). [3]
- Jensen K. B., Acta pharmacol. toxicol., 10, 347 (1954). [4]
- Jensen K. B., Tennöe K., J. Pharm. Pharmacol., 7, 334 (1955). [5]
- Kaiser F., Chem. Ber., 88, 556 (1955).
- Katz A., Pharm. Acta Helv., 29, 369 (1954).
- Kodiček E., Ashby D. R., Biochem. J., 57, xii (1954). [1]
- Kodiček E., Ashby D. R., Biochem. J., 57, xiii (1954). [2]
- Kochakian Ch. D., Stidworthy G., J. biol. Chem., 199, 607 (1952).
- Koshimura E., Okasaki S., Pharmac. Bull. (Japan), 2, 65 (1954).
- Kritchevsky D., Calvin M., J. Am. Chem. Soc., 72, 433 (1950). [1]
- Kritchevsky D., Kirk M. R., Arch. Biochem. Biophys., 35, 346 (1952). [2]
- Kritchevsky D., Kirk M. R., J. Am. Chem. Soc., 74, 4713 (1952). [3]
- Kritchevsky T. H., Tiselius A., Science, 114, 298 (1951).
- Kučera J., Procházka Ž., Vereš K., Chem. Listy, 51, 97 (1957).
- Lewbart M. L., Schneider J. J., Nature, 176, 1175 (1955).
- Lutcher J. A., Jr., Axelrod R. J., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 87, 650 (1954).
- McMahon J., Davis R., Kalnitsky G., J. Am. Chem. Soc., 74, 4483 (1952).
- Mader W. J., Buck R. R., Anal. Chem., 24, 666 (1952).
- Markwardt F., Naturwissenschaften, 41, 139 (1954). [1]
- Markwardt F., Arch. Pharm., 288, 82 (1955). [2]
- Martin R. P., Bush I. E., Federation Proc., 14, 252 (1955).
- Mason H. L., Rec. Progr. Hormone Res., 9, 267 (1954).
- Mattox V. R., Mason H. L., Alber A., Proc. Mayo Clin., 28, 569 (1953).
- Mesnard P., Lafargue A., Ann. pharm. franç., 12, 285 (1954).
- Meyer A. S., Lindberg M. C., Anal. Chem., 27, 813 (1955).
- Michalec C., Biochem. biophys. Acta, 19, 189 (1956).
- Murphy J. E., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., 44, 719 (1955).
- Neher R., Wettstein A., Helv. chim. Acta, 34, 2278 (1951). [1]
- Neher R., Wettstein A., Helv. chim. Acta, 35, 276 (1952). [2]

- Nowaczynski W., Goldner M., Genest J., J. Lab. clin. Med., **45**, 848 (1955). [1]
- Nowaczynski W., Steyermark P. R., Arch. Biochem. Biophys., **58**, 453 (1955). [2]
- Nyc J. F., Garst J. B., Friedgood H. B., Maron D. M., Arch. Biochem. Biophys., **29**, 249 (1950).
- Oertel G., Acta endocrinol., **16**, 263 (1954).
- Ofner P., Biochem. J., **61**, 287 (1955).
- Pechet M. M., Science, **121**, 39 (1955).
- Pesetz M., Bull. Soc. chim. France, **1954**, 1070. [1]
- Pesetz M., Poirier R., Méthodes et réactions de l'analyse organique III. Réactions colorées et fluorescences. Masson et Cie, Paris, 1954, str. 213. [2]
- Procházka Z., Chem. Listy, **47**, 748 (1953). [1]
- Procházka Z., Läßler L., Kotásek Z., Chem. Listy, **48**, 1066 (1954). [2]
- Rahandaha T., Ratsimamanga A. R., Bull. Soc. Chim. biol., **35**, 301 (1953).
- Riddell Ch., Cook R. P., Biochem. J., **61**, 657 (1955).
- Richardson E., cit. Savard K., Rec. Progr. Hormone Res., **9**, 185 (1954).
- Rohatgi S., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., **44**, 428 (1955).
- Rosenkrantz H., Arch. Biochem. Biophys., **44**, 1 (1953).
- Rubin B. L., Dorfman R., Pincus G., J. biol. Chem., **203**, 629 (1953).
- Sannié C., Heitz S., Lapin H., Compt. rend., **233**, 1670 (1951). [1]
- Sannié C., Lapin H., Bull. Soc. chim. France, **1952**, 1080. [2]
- Sasakawa Y., J. pharm. Soc. Japan, **75**, 946 (1955).
- Savard K., J. biol. Chem., **202**, 457 (1953). [1]
- Savard K., Rec. Progr. Hormone Res., **9**, 185 (1955). [2]
- Savard K., Wotiz H. W., Marcus Ph., Lemon H. M., J. Am. Chem. Soc., **75**, 6327 (1953). [3]
- Serchi G., Chimica (Milano), **8**, 10 (1953).
- Shull G. M., Sardinias J. L., Nubel R. T., Arch. Biochem. Biophys., **37**, 186 (1952).
- Schenker E., Hunger A., Reichstein T., Helv. chim. Acta, **37**, 680 (1954).
- Schindler O., Reichstein T., Helv. chim. Acta, **34**, 108 (1951). [1]
- Schindler O., Reichstein T., Helv. chim. Acta, **35**, 673 (1952). [2]
- Schmidt H., Staudinger H., Bauer V., Biochem. Z., **324**, 128 (1953).
- Schwarz W., Nature, **169**, 506 (1952).
- Silberman H., Thorp R. H., J. Pharm. Pharmacol., **5**, 438 (1953).
- Sjövall J., Acta chem. Scand., **8**, 339 (1954). [1]
- Sjövall J., Arkiv. Kemi, **8**, 299 (1955). [2]
- Sjövall J., Arkiv Kemi, **8**, 317 (1955). [3]
- Smith L. L., J. Am. Chem. Soc., **76**, 3232 (1954).
- Striebel P. R., Tamm Ch., Reichstein T., Helv. chim. Acta, **38**, 1001 (1955).
- Svendsen A. B., Jensen K. B., Pharm. Acta Helv., **25**, 241 (1950).
- Tanaka K., Takeda K., J. Biochem. (Japan), **39**, 323 (1952).
- Tennent D. M., Whitla J. B., Florey K., Anal. Chem., **23**, 1748 (1951).
- Touchstone J. C., Chien Tien Hsu, Anal. Chem., **27**, 1517 (1955).
- Tschesche R., Grimmer G., Chem. Ber., **88**, 1569 (1955). [1]
- Tschesche R., Grimmer G., Seehofer F., Chem. Ber., **86**, 1235 (1953). [2]
- Tschesche R., Seehofer F., Chem. Ber., **87**, 1108 (1954). [3]
- Túmová E., Sibliková-Zbudovská O., Hanč O., Českoslov. Farmacie, **4**, 65 (1955).
- Tuzson J., Vastagh G., Pharm. Acta Helv., **30**, 444 (1955). [1]
- Tuzson J., Vastagh G., Acta pharm. Hung., **25**, 252 (1955). [2]
- Venning E., Dyrenfurth J., Giroud C., Federat. Proc., **14**, 297 (1955).
- Wilson H., Fairbanks R., Bunim J. J., J. clin. Endocrinol. Metab., **12**, 969 (1952).
- Zaffaroni A., J. Am. Chem. Soc., **72**, 3828 (1950). [1]
- Zaffaroni A., Rec. Progr. Hormone Res., **8**, 51 (1953). [2]
- Zaffaroni A., Burton R. B., J. biol. Chem., **193**, 749 (1951). [3]
- Zaffaroni A., Burton R. B., Keutmann E. H., J. biol. Chem., **177**, 109 (1949). [4]
- Zaffaroni A., Burton R. B., Keutmann E. H., Science, **111**, 6 (1950). [5]
- Zander J., Simmer H., Klin. Wochschr., **32**, 529 (1954).
- Zbudovská O., Hais I. M., Chem. Listy, **46**, 307 (1952).

# УГЛЕВОДОРОДЫ И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ЛИПОФИЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

О. Сибликова

В этой главе мы рассмотрим углеводороды и те кислородсодержащие вещества, которые нельзя отнести к другим главам этой книги (стероиды, стр. 334; витамины, стр. 602).

## АРОМАТИЧЕСКИЕ УГЛЕВОДОРОДЫ

Момосэ и сотрудники хроматографировали ароматические углеводороды после конденсации с ангидридом янтарной кислоты (по методу Фриделя — Крафтса), приводящей к образованию  $\beta$ -ароилпропионовых кислот.

Таблица 62  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ И ЭФИРОВ  
ПОСЛЕ ИХ ПЕРЕВОДА В АРОИЛПРОПИОНОВЫЕ КИСЛОТЫ  
(Момосэ и сотрудники)

Соединение	$R_f$
Бензол . . . . .	0,19
Толуол . . . . .	0,37
<i>m</i> -Ксилол . . . . .	0,50
Нафталин . . . . .	$\alpha$ 0,26
	$\beta$ 0,47
Тетралин . . . . .	0,65
Анизол . . . . .	0,29
Вератрол . . . . .	0,17
Резорцин, диметиловый эфир . . . . .	0,30
Гидрохинон, диметиловый эфир . . . . .	0,35
2-Метил-1,4-гидрохинон, диметиловый эфир . . . . .	0,47
Хлорбензол . . . . .	0,25
<i>n</i> -Дихлорбензол . . . . .	0,25

Продукты конденсации разделяли методом хроматографии на бумаге в системе *n*-бутанол — 10%-ный аммиак и проявляли нитропруссидом натрия в щелочной среде. В большинстве своем вещества разделяются очень хорошо, как это показано в табл. 62. Другой способ состоит в нитровании углеводов (Франц, частное сообщение, см. стр. 398).

Соединения типа 3,4-бензпирена и аналогичные полициклические ароматические углеводороды можно разделять на бумаге, пропитанной *N,N*-диметилформамидом, с гексаном в качестве подвижной фазы. Нанесение образца проводят в токе азота. Для проявления бензпирена и аналогичных соединений можно использовать гашение флуоресценции флуоресцеина (Тарбелл и сотрудники).

## АЗУЛЕНЫ И ПРОАЗУЛЕНЫ

Для анализа всегда необходимо брать свежеприготовленные азулены, получающиеся путем разложения тринитробензоатов (более старые образцы содержат хамазулен и лактаразулен). Азулены наносят на бумагу в виде раствора в капле масляной смеси, применяемой для пропитки, и сушат на воздухе.

### Обнаружение

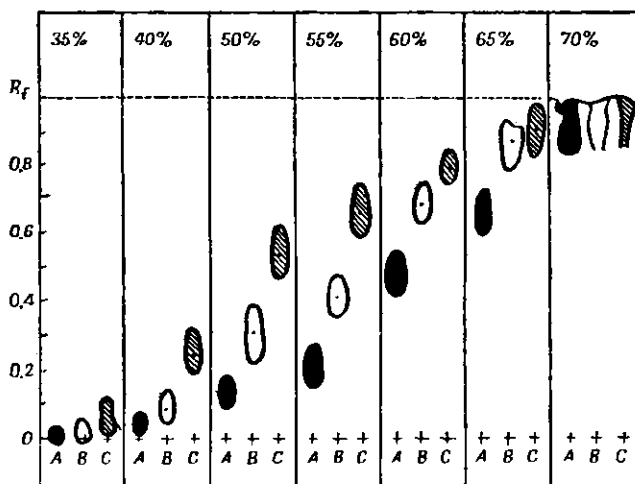
Для обнаружения используют способность азуленов к образованию синего окрашивания. При хроматографировании азуленовых солей Кнесл и Властиборова проводили их разложение, причем промывали хроматограммы водой для качественной хроматографии и нейтрализовали аммиаком для хроматографии количественной. Проазулены ромашки (матрицин) Кайзер и Хасенмайер, так же как и Чекан с сотрудниками, проявляли *n*-диметиламинобензальдегидом в кислой среде (Д 102). После нагревания возникали пятна синего цвета. Продукты гидрогенизации матрицина Чекан и сотрудники проявляли с помощью насыщенного раствора треххлористой сурьмы в хлороформе с 20% хлористого тионила; окраска возникает благодаря наличию третичной спиртовой группы или двойной связи в молекуле.

### Системы растворителей

Лучше всего зарекомендовало себя хроматографирование с обращенными фазами с закрепленным парафином (Шенк и Фрёмминг, Кнесл и Властиборова) или силиконовым маслом (сополимер метил- и фенилсиланов) (Кнесл и Властиборова). Применять керосин в качестве неподвижной фазы не рекомендуется. Для пропитывания парафином применяют разбавленное медицинское масло (20—30% в петролейном эфире); более высокое содержание масла снижает разницу в величинах  $R_f$  и продвигающаяся по капиллярам подвижная фаза выделяет масло в виде капель, которые стекают и искажают правильный вид пятен.

В качестве подвижной фазы можно применять фосфорную кислоту различной концентрации (азулены ионизируются с образованием азуленовых солей). Более удобным является восходящее хроматографирование, так как при нисходящем токе подвижная фаза стекает по пропитанной бумаге гораздо быстрее и разделение ухудшается. Кнесл и Властиборова использовали бумагу ватман 1; бумагу ватман 4 эти авторы не реко-

мендуют ввиду плохого разделения и растянутого вида пятен. С ростом концентрации кислоты в подвижной фазе повышается значение  $R_f$  азуленов; получаемая при этом зависимость для каждого азулена имеет свои особенности, как показано на рис. 150. Это обстоятельство можно использовать для индентификации азуленов. В системе парафин — фосфорная



Р и с. 150. Влияние концентрации кислоты на величину  $R_f$  азуленов (Кнесл и Властиборова).

Бумага ватман 1 пропитана 20%-ным раствором парафинового масла. Концентрация кислоты изменилась от 35 до 70%.

A — ветивазулен; B — S-гуайазулен; C — хамазулен.

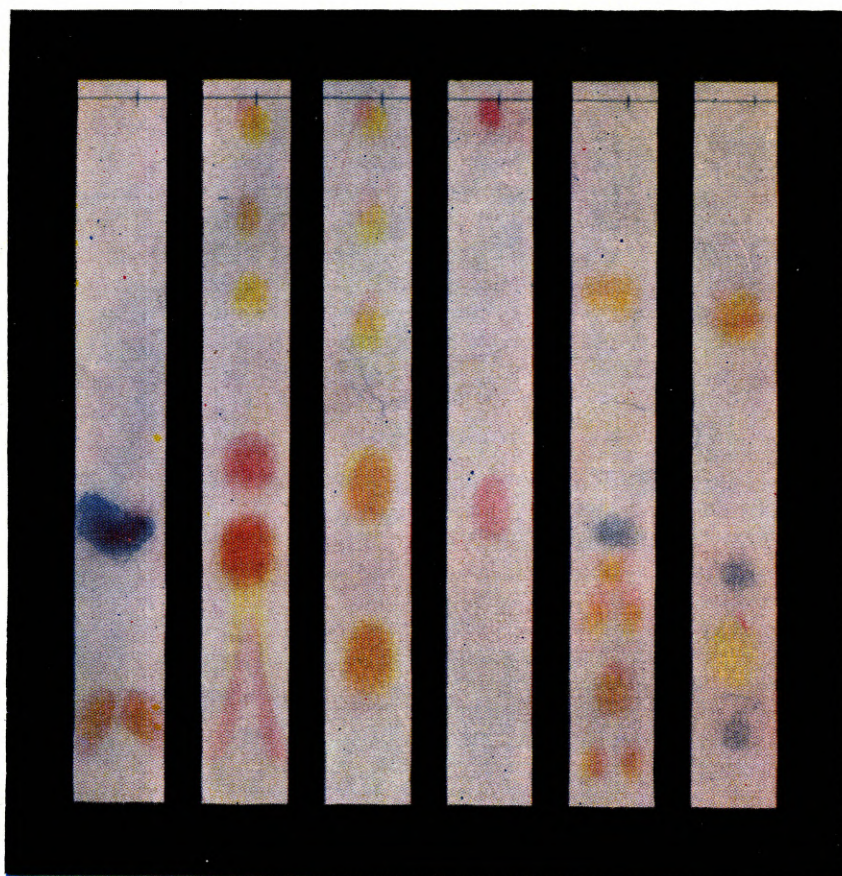
кислота можно разделять гомологи азуленов (например, хамазулен и S-гуайазулен) и изомеры положения (например, S-гуайазулен и ветивазулен), как это видно из табл. 63. Заменять воду в подвижной органи-

Таблица 63

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АЗУЛЕНОВ  
(бумага пропитана 20%-ным парафиновым маслом,  
подвижный растворитель 55%-ная фосфорная кислота)  
(Кнесл и Властиборова)

Азулен	$R_f$
S-Гуайазулен . . . . .	0,43
Se-Гуайазулен . . . . .	0,80
Изогуайазулен . . . . .	0,72
Ветивазулен . . . . .	0,23
Хамазулен . . . . .	0,65
Лактаразулен . . . . .	(0,08)

ческим растворителем, например этанолом, не рекомендуется. Зависимости здесь более сложные, так как речь идет об одновременном разделении ионизированных и неионизированных форм азуленов.



Р и с. 151. Хроматограммы некоторых природных камедей (Ролинс и Вернер).

Система: керосин/изопропанол — вода в соотношении 65 : 35. Проявитель: фенол с бромом.  
 1 — канифоль; 2 — мастика; 3 — даямар; 4 — конго копал; 5 — копава; 6 — манила эдеми.

Прохамазулены и продукты их гидрогенизации, содержащие большое число полярных групп, можно хорошо разделять в системах, содержащих воду, например в диизопропиловом эфире, насыщенном водой, или в смеси диизопропиловый эфир — петролейный эфир — вода (1 : 1 : 2) (Чекан и сотрудники).

## ТЕРПЕНЫ

Из соединений терпенового типа о проазуленах упоминается в предыдущем разделе, а о смолах — в последующем.

Сквален можно хроматографировать на бумаге, пропитанной квилонном (Добен и сотрудники [2]), с метанолом в качестве подвижной фазы. Сквален дает пятно с  $R_f = 0,71$ ; регенерированный сквален дает два пятна с  $R_f = 0,71$  и  $R_f = 0,86$ . Проявление можно проводить йодом. Меченый сквален также дает два пятна (Добен и Брэдлоу [1]).

Для тритерпеновых спиртов (из плодов *Madura pomifera*; Вагнер и Харрис) можно применять проявление при помощи реакции Либермана — Бурхарда. В случае ацетатов сразу же после реакции возникает зеленая флуоресценция, а свободные спирты образуют только розоватое окрашивание. Этот способ проявления, однако, мало чувствителен. Луренол и лупенол разделяют в системе этанол — метанол — вода (100 : 40 : 35).

Для проявления тритерпеновых гликозидов лакрицы рекомендуют применять различные красители (Готтес и Наута), например родамин В, метилвиолет и лучше всего родамин 3GO. Для этой цели можно также применять реакцию Либермана — Бурхарда. Для разделения упомянутые авторы рекомендуют систему *n*-бутанол — этанол — 1*n*. аммиак (60 : 13 : 27).

Терпеновые альдегиды (цитраль, цитронеллаль и оксцитронеллаль) реагируют с бензидином, образуя коричневое окрашивание (Д 73) уже при концентрации 5  $\mu$ г. Гораздо хуже реагируют они с реактивом Шиффа (чувствительность 10  $\mu$ г). Для разделения, несмотря на очень близкие значения  $R_f$ , рекомендуют систему метанол — уксусная кислота (9,25 : 0,75 с 4—5% воды в бумаге); при этом отделяется цитраль, цитронеллаль в лимоненовой и терпиноловой форме и оксцитронеллаль (Шульте и Сторц). Для отделения оксцитронеллала от цитронеллалей выгодно применять в качестве подвижной фазы петролейный эфир в присутствии 15% воды в атмосфере камеры.

Для проявления терпеновых кетонов, так же как и для других веществ, содержащих кетонную группу, используют реакцию с 2,4-динитрофенилгидразином. В случае ментона и камфоры эта реакция отличается низкой чувствительностью (100 и 500  $\mu$ г соответственно; Шульте и Сторц). Некоторые кетоны можно разделять в системе метанол — вода или метанол — ацетон.

Баниган попытался хроматографировать каучук на бумаге, пропитанной силиконом, используя в качестве подвижного растворителя циклогексанон или другие растворители. Хроматограмму проявляют 0,25%-ным раствором масляной сини (oil blue NA) в 50%-ном этаноле.

## СМОЛЫ

Методику разделения природных смол разработали Миллз и Вернер [1].

### Обнаружение

Проявление смол проводят 50%-ным раствором фенола в четыреххлористом углероде с последующей обработкой парами брома (проба Хальфена — Хикса). При этом пятна окрашиваются в розовый или фиолетовый цвет, а для некоторых смол — в синий или желтый; на воздухе пятна неустойчивы, но хроматограмму, помещенную в закрытый сосуд, можно сохранять в течение нескольких дней. Наряду с этой реакцией можно применять реакцию Ноллера (Миллз и Вернер [3], Д 93).

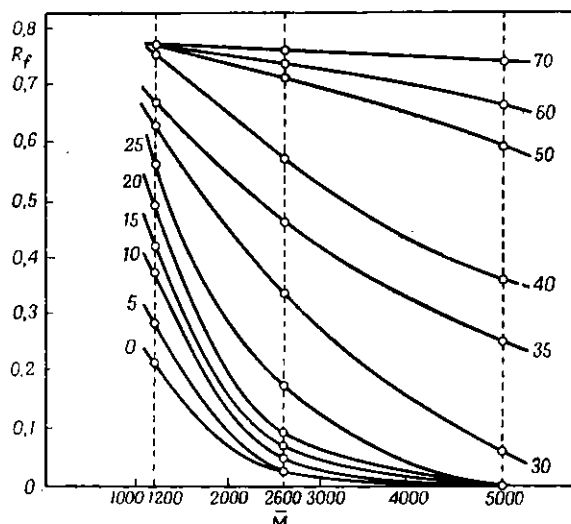
### Системы растворителей

Смолы хорошо разделяются в системе с закрепленным керосином (дезодорированный керосин, т. кип. 190—265°) и водным раствором изопропанола (изопропанол — вода — керосин, 7 : 3 : 1) в качестве подвижного растворителя (Миллз и Вернер [1, 3]). Бумагу пропитывают раствором керосина в эфире (25%-ный раствор; пропитывание см. II 12). При температуре около 21° проводят нисходящее хроматографирование (рис. 151). Для более подвижных соединений удобнее применять несколько иную смесь растворителей (изопропанол — вода — керосин в соотношении 6,5 : 2,5 : 1). Хроматографирование в системе керосин — водный раствор изопропанола проходит довольно медленно и пятна имеют диффузный характер.

Методом Миллза и Вернера можно идентифицировать смолы, смоляные кислоты или их смеси с маслом (Миллз и Вернер [2]), поскольку эти вещества легко окисляются.

## ОКСИЭТИЛЕН

Кумэ и сотрудники разработали метод хроматографирования полиоксиэтилена (карбовакса). Полиоксиэтилен перед хроматографированием



Р и с. 152. Связь между величиной  $R_f$  и средним молекулярным весом полиоксиэтилена (Кумэ и сотрудники).

Система: — *n*-бутанол — этанол — вода (100 :  $x$  : 100); значения  $x$  для отдельных кривых приведены на графике (0—70). Проявление проводилось раствором флуоресцеина в этаноле.  $\bar{M}$  — средний молекулярный вес (найден на основе измерения вязкости).

сушат над хлористым кальцием до постоянного веса (вещество гигроскопично) и хроматографируют в системе *n*-бутанол—этанол—вода (100 : *x* : 100) при 25°. Величина  $R_f$  зависит от количества этанола в подвижной фазе (лучше всего 35 частей) и от молекулярного веса полиоксиэтилена (рис. 152). Исходя из этой зависимости, можно рассчитать относительный молекулярный вес полиоксиэтилена.

## ЛИТЕРАТУРА

- Banigan T. F., Jr., *Science*, **117**, 249 (1953).  
Belić I., *Nature*, **178**, 558 (1956).  
Čekan Z., Herout V., Šorm F., в печати.  
Dauben W. G., Bradlow H. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5204 (1952). [1]  
Dauben W. G., Bradlow H. L., Freeman N. K., Kritchevsky D.,  
Kirk M., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4321 (1952). [2]  
Gootjes J., Nauta W. Th., *Recueil*, **3**, 886 (1954).  
Kaiser H., Hasenmaier G., *Arch. Pharm.*, **287**, 503 (1954).  
Knessl O., Vlastiborová A., *Chem. Listy*, **48**, 212 (1954).  
Kume S., Yamamoto T., Otosai K., Fukushima S., *Bull. chem. Soc. Japan*, **26**, 93 (1953).  
Mills Jr. S., Werner A. E., *Nature*, **169**, 1064 (1952). [1]  
Mills Jr. S., Werner A. E., *J. Oil Colour Chemists' Assoc.*, **37**, 131 (1954). [2]  
Mills Jr. S., Werner A. E., *J. chem. Soc.*, **1955**, 3132. [3]  
Momose T., Ohkura Y., Tanaka H., *Pharm. Bull. (Japan)*, **2**, 154 (1954).  
Rawlins F. J. G., Werner A. E. A., *Endeavour*, **13**, 140 (1954).  
Schenk G., Frömming K. H., *Naturwissenschaften*, **40**, 276 (1953).  
Schulte K., Storp C. B., *Fette u. Seifen*, **57**, 36 (1955).  
Silverman L., Bradshaw W., *Anal. Chem.*, **27**, 96 (1955).  
Tarbell D. S., Brooker E. G., Vanterpool A., Conway W.,  
Claus C. J., Hall T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 767 (1955).  
Wagner J. G., Harris L. E., *J. Am. pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **41**, 500 (1952).

# АЛИФАТИЧЕСКИЕ И АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНЫ

---

*И. Гаспарич*

К этой главе мы отнесли алифатические и ароматические амины, а также арилалкиламины. В разделе, посвященном алифатическим аминам, будут рассмотрены алкиламины, диамины, аминоспирты и их сложные эфиры, четвертичные аммониевые соли, важные с точки зрения практики гидразины и гидроксилламины, мочевина и ее производные и производные гуанидина; аминокислоты и пептиды выделены в отдельные главы. Из ряда ароматических аминов в этой главе не будут рассмотрены аминосульфокислоты, поскольку они отнесены к соединениям серы. В разделе об арилалкиламинах рассмотрены только симпатомиметические амины.

Характерной чертой аминосоединений является их способность к большому числу цветных реакций, которые применяются не только для их обнаружения, но и для идентификации отдельных типов аминов, например первичных, вторичных и третичных или ароматических и алифатических и т. п. Для этой цели можно использовать также наличие в молекуле других функциональных групп, например фенольной гидроксильной группы, сложноэфирной группы и т. д.

Амины можно хроматографировать на бумаге тремя различными способами: в виде свободных оснований, в виде солей или в виде других производных. Однако хроматографирование свободных оснований или солей осложняется возможной диссоциацией, что приводит к образованию вытянутых пятен, похожих на адсорбционные (см. стр. 150). В случае хроматографирования солей их анионы могут влиять на величину  $R_f$  катиона или вследствие гидролиза могут возникать два пятна: одно пятно соли и одно — свободного основания. Таким образом, возникает проблема, аналогичная той, с которой мы сталкиваемся при хроматографировании неорганических солей (см. стр. 684). На данные случаи распространяется правило Мюнне [2], согласно которому для не очень сильного основания (константа диссоциации  $10^{-3}$  —  $10^{-12}$ ) необходимо эмпирически регулировать кислотность применяемой системы растворителей (см. стр. 530). На практике это означает, что основание как таковое стремятся хроматографировать в неводных системах растворителей (например, формамид/бензол); если мы используем водные системы, то вещество лучше всего

хроматографировать в щелочной среде, если этому не будет препятствовать его летучесть или высокое значение  $R_f$ .

Если амины необходимо хроматографировать в виде солей, условия должны быть выбраны таким образом, чтобы катион основания и анион кислоты перемещались по хроматограмме отдельно. Аналогичная проблема имеет место в случае хроматографирования алкилизотиурониевых солей (стр. 598). Раздельное перемещение аниона и катиона достигается подбором подходящей концентрации воды и кислоты в подвижном растворителе. На рис. 153 изображена хроматограмма фосфата, пикрата, сульфата, йодида и бромиды этиламина в системе *n*-бутанол + 5% воды. В этих условиях резко сказывается влияние анионов на величину  $R_f$  этиламмониевого катиона и на вид его пятна. Регулируя содержание воды и кислоты в системе, можно исключить это влияние (хотя и в ущерб разделению гомологов), как это видно из рис. 154, на котором изображена хроматограмма этих солей в системе уксусная кислота + 5% воды. На рис. 155 приведен пример хроматографирования в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Необходимо учесть, что анионы, например  $\text{Cl}^-$ , в кислых растворителях образуют, начиная от линии старта, полосы, длина которых зависит от количества хроматографированных хлоридов. При этом может получиться так, что при большей концентрации, например, солянокислого бутиламина пятно аниона может помешать обнаружению небольшого количества метиламина. Это может иметь место не только при кислотно-основном проявлении, но и при проявлении нингидрином (рис. 156 и 157).

Мы можем исключить влияние различных анионов, переводя амины в соли соответствующей кислоты. При извлечении аминов из биологического материала (обычно применяют отгонку с водяным паром) эти способы не вызывают затруднений. На практике при анализе различных продуктов необходимо принимать во внимание возможное присутствие неорганических солей, анионы которых, опять-таки в зависимости от условий, могут вызывать аномалию (Вальдрон-Эдвард). Вопрос, связанный с поведением солей аминов на хроматограмме, имеет, следовательно, сложный характер, и существует много влияний, которые проявляются в той или иной степени в зависимости от условий, например диссоциация соли, гидролиз основания, адсорбция анионов посредством водородных мостиков на целлюлозе и т. п. (Вечера и Гаспарич, неопубликованная работа).

Другой возможностью хроматографического разделения жидких оснований является хроматографирование после предварительного их перевода в соответствующие производные, не обладающие ионным характером (например, 2,4-динитрофенилпроизводные, 3,5-динитробензамиды) и содержащие в молекуле функциональные группы, которые позволяют легко осуществлять их проявление.

## Алифатические аминосоединения

### АЛКИЛАМИНЫ

#### Обнаружение

При использовании систем, содержащих уксусную кислоту, амины перемещаются на хроматограмме в виде ацетатов, и после сушки хроматограммы их можно проявить как соли слабой кислоты и сильных оснований кислотнo-основными индикаторами. Однако для первичных аминов

более выгодным способом проявления является реакция с нингидрином (Д 112) (пятна можно фиксировать на бумаге в виде медных комплексов, подобно тому как это имеет место в случае аминокислот) или с  $\beta$ -нафтохинонсульфонатом натрия (Д 115), *о*-ацетоацетилфенолом (Д 94; Бэйкер и сотрудники) и, в частности, с более доступным *о*-ацетоацетил-4-метилфенолом (Харборн и Вивинг). Вторичные амины реагируют с нингидрином очень слабо, для их проявления лучше всего применять реакцию с нитропруссидом и ацетальдегидом (Д 95а; Мацек и сотрудники). Для третичных аминов самой подходящей является реакция с реактивом Драгендорфа (Д 144), с фосфорномолибденовой кислотой (Д 22) или йодом (Д 2).

### Системы растворителей

Жидкие алифатические амины благодаря их летучести можно хроматографировать либо в виде солей, либо переводить их в соответствующие производные. О хроматографировании солей мы говорили выше, когда рассматривали возможность разделения низших гомологов этого ряда в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). В табл. 64

Таблица 64

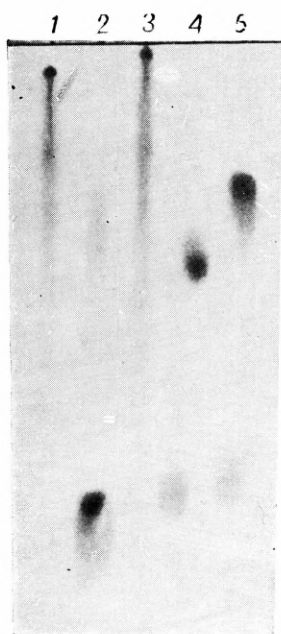
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  РАЗЛИЧНЫХ ПРОСТЫХ АМИНОВ В СИСТЕМЕ  
*n*-БУТАНОЛ — УКСУСНАЯ КИСЛОТА — ВОДА (4 : 1 : 5)  
(Бремнер и Кентен)

Амин	$R_f$	Амин	$R_f$
Метиламин . . . . .	0,37	$\beta$ -Фенилэтиламин . . . . .	0,72
Этиламин . . . . .	0,45	$\beta$ , $\beta$ -Дифенилэтиламин . . . . .	0,72
<i>n</i> -Пропиламин . . . . .	0,58	$\beta$ -Фенил- $\beta$ -оксиэтиламин . . . . .	0,65
<i>n</i> -Бутиламин . . . . .	0,70	Адреналин . . . . .	0,45
<i>n</i> -Пентиламин . . . . .	0,77	Аллиламин . . . . .	0,50
<i>n</i> -Гептиламин . . . . .	0,85	Этаноламин . . . . .	0,33
Изопропиламин . . . . .	0,57	Диметиламин . . . . .	0,43
Изопентиламин . . . . .	0,77	Эфедрин . . . . .	0,75
1,2-Диаминозтан (этиленди- амин) . . . . .	0,14	Глюкозамин . . . . .	0,24
1,3-Диаминопропан . . . . .	0,15	Гистамин . . . . .	0,19
1,4-Диаминобутан (путресцин)	0,16	Спермин . . . . .	0,07
1,5-Диаминопентан (кадаве- рин) . . . . .	0,17	Триптамин . . . . .	0,67
1,6-Диаминогексан . . . . .	0,20	Тирамин . . . . .	0,62
Бензиламин . . . . .	0,68	Агматин . . . . .	0,05

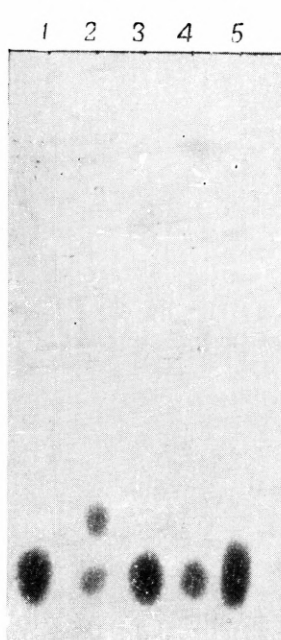
приведены значения  $R_f$  ряда алифатических аминов по Бремнеру и Кентену. Для лучшего разделения первичных, вторичных и третичных аминов рекомендуют применять бумагу, пропитанную ацетатом натрия (Штейнер и Штейн фон Камиенски).

### Хроматографирование производных

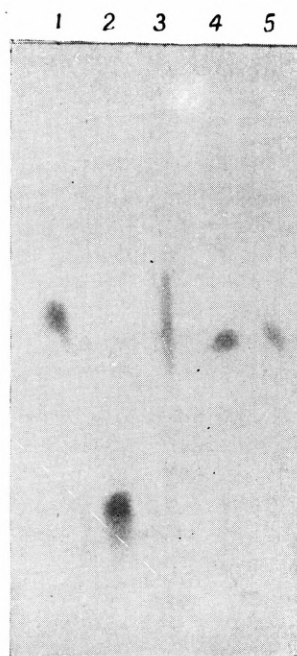
Подходящими производными неионного характера для первичных и вторичных аминов (третичные амины не реагируют) являются 2,4-динитрофенилпроизводные, полученные реакцией (II 94) с 2,4-динитрофторбензолом (Локкарт), или 3,5-динитробензамидами, полученные (II 66) реакцией



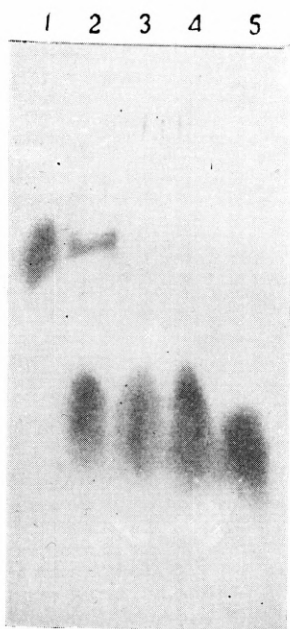
Р и с. 153. Хроматограмма солей этиламина. Система: *n*-бутанол с 5% воды. Проявление нингидрином (Д 112). 1 — фосфат; 2 — пикрат; 3 — сульфат; 4 — йодистоводородная соль; 5 — солянокислая соль.



Р и с. 154. Хроматограмма солей этиламина. Система: уксусная кислота с 5% воды. Проявление нингидрином (Д 112). 1 — фосфат; 2 — пикрат; 3 — сульфат; 4 — йодистоводородная соль; 5 — солянокислая соль.

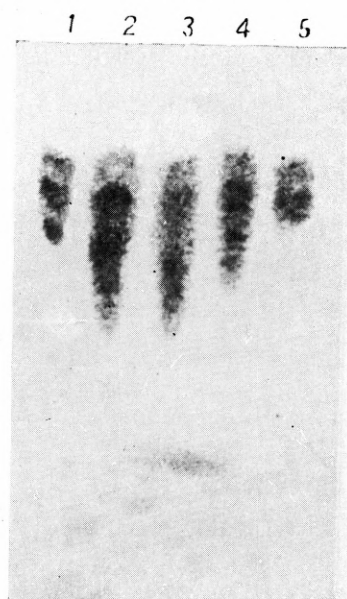


Р и с. 155. Хроматограмма солей этиламина. Система: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Проявление нингидрином (Д 112). 1 — фосфат; 2 — пикрат; 3 — сульфат; 4 — йодистоводородная соль; 5 — солянокислая соль.



Р и с. 156. Хроматограмма алифатических аминов.

Система: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Проявление нингидрином. 1 — 20 µг метиламин·HCl; 2 — 20 µг метиламин·HCl и 60 µг бутиламин·HCl; 3 — 60 µг бутиламин·HCl; 4 — 40 µг бутиламин·HCl; 5 — 20 µг бутиламин·HCl.



Р и с. 157. Хроматограмма алифатических аминов.

Повторение хроматограммы рис. 156, но хлориды проявлены азотнокислым серебром и сульфидом натрия (Д 4).

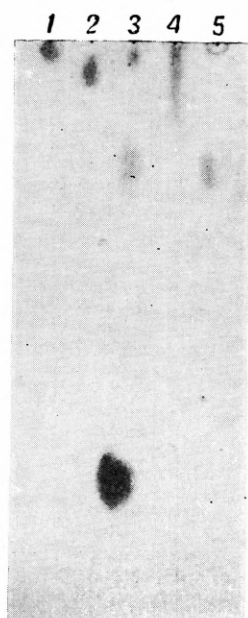


Рис. 158. Разделение 3,5-динитробензамидов алифатических аминов.

Система: формамид/циклогексан. Обнаружение: облучение нефiltroванным светом ртутной лампы. 1 — бутиламин; 2 — ампиламин; 3 — диметиламин, диэтиламин, дипропиламин; 4 — гексиламин; 5 — этиламин, диэтиламин.



Рис. 159. Разделение 3,5-динитробензамидов алифатических аминов.

Система: формамид/циклогексан — бензол (1 : 1). Обнаружение: облучение нефiltroванным светом ртутной лампы. 1 — метиламин, диметиламин; 2 — пропиламин, дипропиламин; 3 — смесь аммиака (еще заметное пятно у линии старта) и различных аминов (от метилдо гексиламина); 4 — еще заметное пятно аммиака у линии старта; 5 — этиламин и диэтиламин.

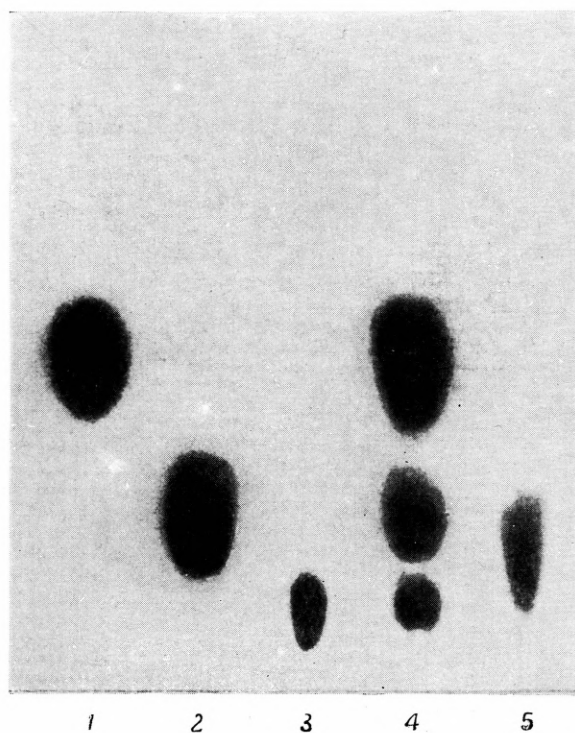


Рис. 160. Хроматограмма бромпроизводных ароматических аминов с обращенными фазами (Латинак).

1 — *o*-толуидин; 2 — *p*-толуидин; 3 — *m*-толуидин; 4 — смесь 1 — 3; 5 — анилин.

с 3,5-динитробензоилхлоридом (Вечера и Гаспарич, неопубликованная работа). 2,4-Динитрофенилпроизводные разделяют на бумаге, пропитанной силиконовым маслом (например, Dow Corning Silikone № 1107), с использованием смеси метанол — хлороформ — вода (10 : 10 : 6) в качестве подвижной фазы. Преимуществом хроматографического разделения 3,5-динитробензамидов является то обстоятельство, что этим путем удобно отделять первичные амины от вторичных. Проявление проводят смачиванием хроматограммы 1%-ным спиртовым раствором 1-нафтиламина, как это имеет место в случае спиртов (Д 8), или облучением хроматограммы нефилльтрованным светом ртутной лампы в течение приблизительно 15 мин, в результате чего 3,5-динитробензамиды дают фиолетовые пятна. Для разделения производных вторичных аминов ( $C_2 - C_8$ ) выгодно применять системы формамид/циклогексан, а для разделения 3,5-динитробензамидов первичных аминов — систему формамид/бензол с циклогексаном (1 : 1), как это видно из рис. 158 и 159. Мы предполагаем, что производные первичных аминов могут связываться водородными мостиками с формамидом, благодаря чему повышается их растворимость в неподвижной фазе и заметно уменьшается величина  $R_f$ .

## ДИАМИНЫ

О диаминах можно сказать приблизительно то же самое, что и об алкиламинах. Подходящей системой в данном случае опять-таки является смесь *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5; см. табл. 64). Так как диамины нелетучи, их можно хроматографировать в виде свободных оснований в растворителях, содержащих аммиак, однако в этих условиях не удастся получить высокое значение  $R_f$ .

## АМИНОСПИРТЫ, ИХ СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ И ЧЕТВЕРТИЧНЫЕ АММОНИЕВЫЕ СОЛИ

Для проявления этаноламина можно применять наряду с приведенными выше реактивами еще и реакцию с *n*-бензохиноном (Д 96). Для холина и четвертичных оснований применяют проявление фосфорномолибденовой кислотой и хлористым оловом (Д 22а), дипикриламином (Д 97), ферроцианидом калия и хлористым кобальтом (Д 98); сложные эфиры холина путем реакции с гидроксиламином можно переводить в гидроксамовые кислоты, которые дают интенсивно окрашенные красные комплексы с солями трехвалентного железа (Д 41).

В промышленной практике мы встречаемся с необходимостью идентифицировать моно-, ди- и триэтаноламины при совместном их присутствии. Согласно нашим данным, в этом случае наиболее выгодна система, состоящая из *n*-амилового спирта, насыщенного 25%-ным аммиаком (Борецкий и сотрудники, неопубликованные данные). Для отделения этаноламина от холина было предложено много систем; Мюнье [1] считает наиболее приемлемой систему *n*-бутанол — этиленхлоргидрин — аммиак — вода (50 : 15 : 5 : 22,5); холин имеет  $R_f$  0,30, этаноламин — 0,64. Для сложных эфиров холина также было разработано несколько методов. В табл. 65 приведены значения  $R_f$  при использовании системы *n*-бутанол — этанол — уксусная кислота — вода (8 : 2 : 1 : 3), которую предложили Аугустинсон и Гран.

Таблица 65  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ХОЛИНА В СИСТЕМЕ  
н-БУТАНОЛ — ЭТАНОЛ — УКСУСНАЯ КИСЛОТА — ВОДА (8 : 2 : 1 : 3)  
(Аугустинсон и Гран)

Соединение	$R_f$	Соединение	$R_f$
Холин . . . . .	0,37	Бензоилхолин . . . . .	0,70
Ацетилхолин . . . . .	0,47	Карбаминоилхолин . . . . .	0,30
Йодид ацетилхолинния . . . . .	0,58	Йодид сукцинилдихолинния . . . . .	0,18
Ацетил- $\beta$ -метилхолин . . . . .	0,55	Салицилоилхолин . . . . .	0,64
Пропионилхолин . . . . .	0,57	Ацетилсалицилоилхолин . . . . .	0,65
Бутирилхолин . . . . .	0,67	Фосфорилхолин . . . . .	0,49

### ГИДРОКСИЛАМИН И ГИДРАЗИН

Гидроксиламин, гидразин и их производные можно легко проявить реакцией с пикрилхлоридом (Д 99). При этом возникает характерное окрашивание (табл. 66). Гидроксиламин можно проявить реакцией с ди-

Таблица 66  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ГИДРАЗИНОВ И ГИДРОКСИЛАМИНОВ  
В СИСТЕМЕ ЭФИР — МЕТАНОЛ — ВОДА — СОЛЯНАЯ КИСЛОТА (50 : 30 : 15 : 4)

Соединение	$R_f$	Окрашивание (Д 99)
Семикарбазид . . . . .	0,22	кр. (пурп.-к.)
Гидразин . . . . .	0,23	тм. син. (пурп.-к.)
Хлористый аммоний . . . . .	0,36	с.
Гидроксиламин . . . . .	0,42	о.к.
Фенилгидразин . . . . .	0,65	с. к. (кр. к.).
Фенилгидроксиламин . . . . .	0,81+0,95	тм. к.

ацетилмонооксимом и солью никеля (II) в аммиачной среде (Д 100) или реактивом Кзэки (Д 101). При этом образуется красное пятно. Гидразин в обоих случаях не реагирует, однако его можно проявить нингидрином в виде желтого пятна или лучше всего *n*-диметиламинобензальдегидом (Д 102).

Удобной системой является смесь эфир — метанол — вода — соляная кислота (50 : 30 : 15 : 4; см. табл. 66) или смесь спиртов с соляной кислотой, например *трет*-бутанол — 6 н. HCl (7 : 3) или *n*-бутанол — 6 н. HCl (7 : 3) и т. п. (Бремнер [1]).

### МОЧЕВИНА И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

Хроматографирование мочевины не вызывает затруднений. Мочевина имеет константу диссоциации порядка  $10^{-14}$ , и, следовательно, ее можно хроматографировать в кислой, нейтральной и аммиачной среде. Мочевина

легко проявляется *n*-диметиламинобензальдегидом в виде интенсивного желтого пятна (*Д 102*) или фенолом (соответственно  $\alpha$ -нафтолом) и гипохлоритом (*Д 103*) в виде зеленого пятна (Кирби-Берри). Для колориметрического определения после элюирования можно применять обе упомянутые реакции или цветную реакцию с изонитрозспропиофеноном (Рао и Гирри). Для серийных анализов мочевины в биологическом материале можно рекомендовать проявление по *Д 102* с визуальным определением интенсивности пятен по сравнению со стандартом (0,2—2  $\mu$ г на образец).

Адати разделял *N*-алкилированные и *N*-арилированные производные мочевины в системе бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 2) и хроматограммы проявлял *n*-диметиламинобензальдегидом (*Д 102*) при 100°. Величина  $R_f$  составляет для мочевины 0,55, для *N,N'*-диметилмочевины — 0,67, для *N,N'*-диметилмочевины — 0,65 и для фенилмочевины — 0,90.

Оксипроизводные мочевины Кофод хроматографировал в системе этанол — 10 н. аммиак (2 : 8). Для проявления он применял 1%-ный раствор хлорного железа или 1%-ный раствор пикрилхлорида в этаноле (иногда с обработкой хроматограмм парами аммиака).

Хамада разделил 26 метилированных производных мочевины и меламина смесью этанол — метанол — вода (3 : 1 : 1). Для метилированной мочевины подходящей системой является также *n*-бутанол, насыщенный водой. Проявление проводят аммиачным раствором нитрата серебра при нагревании (*Д 4*).

## ГУАНИДИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

### Обнаружение

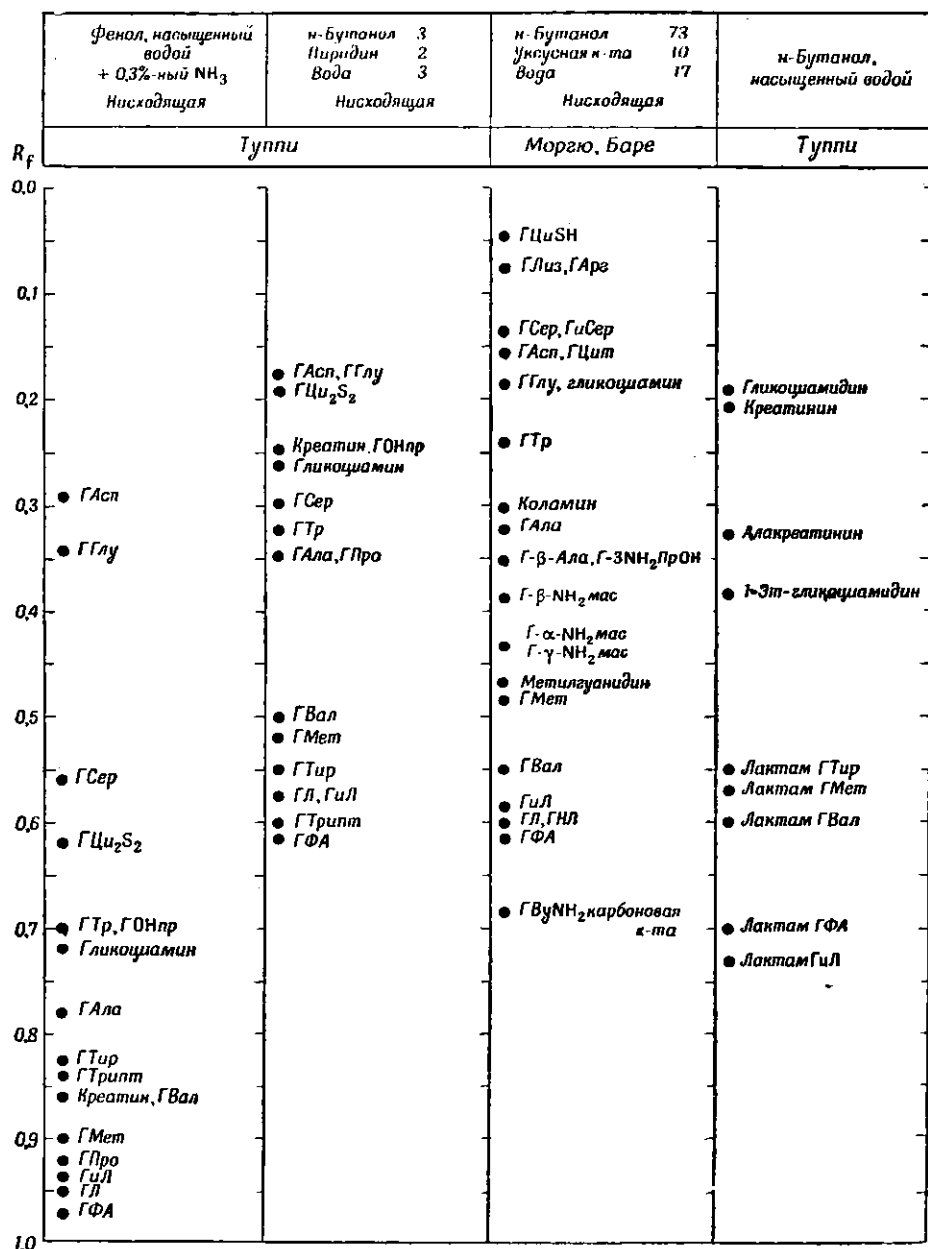
Для обнаружения монозамещенных гуанидиновых производных можно пользоваться реакцией Сакагути (Рош и сотрудники, Туппи; *Д 104*). Производные с гуанилированными вторичными аминогруппами в эту реакцию не вступают. Недостатком этой реакции является то, что хроматограммы обрабатываются водными растворами, что может привести к размыванию пятен. Кроме того, для некоторых производных эта реакция менее чувствительна (гуанилсерин).

Согласно Туппи, для гуанидиновых производных наиболее чувствительной является модифицированная реакция Вогес-Проскауэра (*Д 105*). Чувствительность обнаружения для креатина составляет 0,2  $\mu$ г, для остальных гуанилированных производных аминокислот чувствительность составляет 1  $\mu$ г. Преимущество этой реакции состоит в том, что на хроматограмме сначала можно проводить проявление свободных аминокислот нингидрином, а потом проявлять гуанилированные производные указанным реактивом.

Реакции с нитропруссидом натрия и феррицианидом калия в щелочной среде (Рош и сотрудники, *Д 106*) дают гуанидин (красные пятна), монозамещенные и несимметричные дизамещенные производные (креатин, диметилгуанидин). Подходящее для обнаружения количество составляет 2  $\mu$ г.

Для обнаружения лактамов гуанидиновых кислот, которые не реагируют с описанными выше реактивами, можно применять реакцию Яффе (*Д 107*). Поскольку креатин и остальные гуанилированные производные можно перевести в соответствующие лактамы путем нагревания хроматограммы после опрыскивания уксусной и трихлоруксусной кислотой до 110° в течение нескольких часов (Аккер и сотрудники), эту реакцию можно

Таблица 67

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$   $\alpha$ -ГУАНИДИНОКИСЛОТ ( $\Gamma$ =ГУАНИДО-)

также использовать для проявления исходных кислот. Чувствительность реакции Яффе для креатинина составляет 1  $\mu\text{г}$ , но для остальных производных эта чувствительность падает (для лактамов гуанилвалина и гуанил-изолейцина она составляет 10—20  $\mu\text{г}$ ). Однако лактамы можно вновь легко переводить в  $\alpha$ -гуанидинокислоты, нагревая их с 0,3%-ным аммиаком в запаянной ампуле в течение нескольких часов, а затем хроматографиру-

вать последние. Из соединений другого типа реакцию Яффе дают пириноградная и ацетоуксусная кислоты (Моу; Коштирж и Рабек).

### Системы растворителей

Из большого числа предложенных систем чаще всего применяют смеси *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в различных соотношениях и смесь амиловый спирт — пиридин и, соответственно, уксусная кислота. В табл. 67 приведены значения  $R_f$  в этих системах.

### Количественный анализ

Количественный анализ можно проводить спектрофотометрически после элюирования пятен, полученных после проявления хроматограммы 3,5-динитробензойной кислотой (Эпштейн и Фомина), или по Берри и Кейну (II 68). Аккер и сотрудники разработали метод для определения общего креатина в пищевых продуктах. Хроматографирование проводят в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5);  $R_f$  креатинина 0,55, креатина 0,42. После элюирования из бумаги креатин переводят в креатинин упариванием с соляной кислотой. Для колориметрического определения используют реакцию Яффе.

## Ароматические амины

### Обнаружение

Для ароматических аминов в нашем распоряжении также имеется несколько цветных реакций, позволяющих проводить чувствительное проявление и хорошо разделять отдельные типы аминов. Чаще всего используют реакцию с *n*-диметиламинобезальдегидом (Д 102), которая дает с различными типами ароматических первичных аминов характерное желтое или красное окрашивание. Кроме того, пятна в большинстве случаев дают характерную флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. Для реакции можно также использовать и другие альдегиды, например ванилин или фурфурол. Другим удобным способом проявления ароматической аминогруппы является диазотирование, проводимое лучше всего газообразными оксидами азота (Д 108а), и сочетание, например с *N*- $\alpha$ -нафтилэтилендиамин. Возникающая окраска имеет обычно характерные оттенки для разных аминов. В случае основания типа *o*-семидина (2-аминодифениламина) этот способ проявления приводит к образованию красного окрашивания уже при действии нитрозных газов; это окрашивание после обработки компонентом сочетания не изменяется. Другой возможностью проявления ароматических аминов является сочетание с солями диазония, например с диазотированным бензидином (Д 52). Михеель и Швеппе пользовались для проявления первичных аминов реакцией с глюкозой и фосфорной кислотой, реакцией Бертетти с бихроматом калия (и серной кислотой) или реакцией с 10%-ным раствором хлорного железа. Третичные амины проявляют обычно реактивом Драгендорфа (Д 144). Некоторые амины флуоресцируют в ультрафиолетовом свете, например оба нафтиламина, основания типа *o*-бензидина и т. п. Другие способы проявления возможны

при наличии иных функциональных групп в молекуле (реактив Гиббса на фенольную гидроксильную группу и т. п.).

### Системы растворителей

При хроматографическом разделении ароматических аминов большинство авторов использует кислые системы с бутанолом. Однако эти системы не всегда пригодны и для каждого случая требуется индивидуальный подход. Тогда как некоторые типы ароматических аминов можно хорошо разделять именно в кислых системах, другие амины образуют в этих условиях удлиненные пятна или даже полосы, причем значения  $R_f$  зависят от концентрации. Обычно эти условия распространяются на поведение солей, как мы уже говорили об этом в вводной главе. Применение основной среды для некоторых аминов нецелесообразно, так как они в этих условиях хорошо окисляются. По всей вероятности, для большинства ароматических аминов наиболее выгодной средой является неводная среда, например система формамид — циклогексан, или хроматографирование с использованием обращенных фаз.

Ниже мы рассмотрим примеры хроматографирования некоторых типов ароматических аминов.

### АНИЛИН И ЕГО ГОМОЛОГИ

Хроматографирование свободных оснований связано с опасностью их стекания с бумаги. Кислые системы с бутанолом неудобны ввиду высоких значений  $R_f$  и плохого разделения. Наиболее удобным является способ, предложенный Латинаком (неопубликованная работа), который путем бромирования (II 67) переводил анилин и его гомологи в соответствующие три- и дибромпроизводные, а последние разделял на бумаге, пропитанной вазелиновым маслом, используя для этой цели в качестве подвижной фазы смесь этанол — вода — уксусная кислота в соотношении 20 : 14 : 1. Проявление он проводил после диазотирования окислами азота, сочетая образующиеся продукты с R-солью (Д 1086; рис. 160).

### НАФТИЛАМИНЫ

$\alpha$ -Нафтиламины флуоресцируют в ультрафиолетовых лучах синим цветом,  $\beta$ -нафтиламин — фиолетовым. После обработки *n*-диметиламинобензальдегидом образуются желтые пятна; пятно  $\beta$ -изомера флуоресцирует в ультрафиолетовом свете интенсивным желтым цветом. Для разделения  $\alpha$ - и  $\beta$ -изомеров пригодна система формамид/циклогексан.

### ФЕНИЛЕНДИАМИНЫ

Для разделения всех трех изомеров подходящей системой является смесь формамид/бензол, а также смесь бензол — хлороформ. В кислых растворителях (*n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5) образуются почти круглые пятна, однако одновременно от пятен к линии старта и фронту протягиваются длинные полосы. Такое разделение является менее точным.

## БЕНЗИДИН И ЕГО ИЗОМЕРЫ

Эти соединения лучше всего можно хроматографировать на бумаге, пропитанной формамидом, применяя в качестве подвижной фазы циклогексан (Гаспарич и сотрудники). В табл. 68 приведены значения  $R_f$ ,

Таблица 68

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  И РЕАКЦИИ БЕНЗИДИНА И ЕГО ИЗОМЕРОВ  
(Гаспарич и сотрудники)

Соединение	Формамид/ циклогексан $R_f$	УФ	n-Диметиламинобензальдегид (Д 102)		Диазотиро- вание и сочетание (Д 108a)
			видимый свет	УФ	видимый свет
Бензидин . . . . .	0,02	—	о.	о.	син.
Дифенилин . . . . .	0,18	—	ж.	ж. з.	син. ф.
o-Бензидин . . . . .	0,57	св. син.	ж.	т. з.	кр. ф.
2-Аминодифениламин	0,74	—	к. ж.	св. син.	р. ф. <sup>a)</sup>
4-Аминодифениламин	0,33	—	кр.	кр.	ф.

<sup>a)</sup> Окрашивание возникает уже после диазотирования.

а также специфические окрашивания при проявлении. Кислые системы с *n*-бутанолом и т. п. для этих соединений не рекомендуются, так как от пятен по направлению к линии старта образуются полосы.

## АМИНОАНТРАХИНОНЫ

В системе формамид/циклогексан (или бензол) можно очень четко разделить 1- и 2-аминоантрахиноны.

## НИТРОАНИЛИНЫ

Хорошее разделение всех трех изомеров нитроанилина можно получить в системе формамид/циклогексан — бензол (3 : 1) (рис. 161).

АМИНОФЕНОЛЫ И *n*-АМИНОСАЛИЦИЛОВАЯ КИСЛОТА (ПАСК)

Проявление этих производных проводят *n*-диметиламинобензальдегидом. 5-Аминосалициловая кислота восстанавливается при нагревании аммиачный раствор карбоната серебра (Д 4).

Для разделения аминифенолов мы рекомендуем систему формамид/хлороформ. На практике очень важным является хроматографическое исследование чистоты ПАСКа и определение *m*-аминофенола или 5-аминосалициловой кислоты. Нейтральные системы (*n*-бутанол, насыщенный водой), предложенные некоторыми авторами, мы не считаем удобными, так как

ПАСК в этих условиях образует полосы. Для идентификации *м*-аминофенола мы рекомендуем систему *н*-бутанол — аммиак. Вагнер [1] отдает предпочтение бумаге, пропитанной буферным раствором, и водному раствору *н*-бутанола в качестве подвижной фазы; хроматографирует он также в кислой среде (табл. 69).

Таблица 69  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АМИНОСАЛИЦИЛОВЫХ КИСЛОТ И *м*-АМИНОФЕНОЛА

Соединение	<i>н</i> -Бутанол	2	<i>н</i> -Бутанол	4
	Вода	1	Уксусная кислота	1
	Пропитка 4%-ным раствором $\text{Na}_2\text{CO}_3$		Вода	5
<i>п</i> -Аминосалициловая кислота . . . . .	0,05		0,82	
5-Аминосалициловая кислота . . . . .	0,07		0,36	
<i>м</i> -Аминофенол . . . . .	0,69		0,65	

#### АМИНОБЕНЗОЙНЫЕ КИСЛОТЫ

Изомерные аминокислоты, согласно Ледереру, можно разделить с помощью *н*-бутанола, насыщенного 5 н. аммиаком. Величина  $R_f$  для *орто*-, *мета*- и *пара*-изомеров составляет соответственно 0,38; 0,19; 0,12. В нейтральных системах, предложенных некоторыми авторами, образуются заметно растянутые пятна. Образование двух пятен в системе с HCl приведено на рис. 75.

#### ВЕЩЕСТВА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МЕСТНОЙ АНЕСТЕЗИИ

Обнаружение можно проводить по флуоресценции в ультрафиолетовом свете, реакцией с *п*-диметиламинобензальдегидом (Д 102) и реактивом Драгендорфа (Д 144). Хроматографирование можно осуществлять в кислой среде, например в системе *н*-бутанол — соляная кислота (25 %-ная) — вода (15 : 7,5 : 13,5; Вагнер [2]), на бумаге, пропитанной буферным раствором (Вагнер и Циммер [4]), или в безводной системе формамид/бензол (или хлороформ, Райхельт) (табл. 71).

#### АМИНОПРОИЗВОДНЫЕ ГИППУРОВОЙ КИСЛОТЫ

Эти соединения Хаберланд и сотрудники разделяли в системе *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) или *н*-амиловый спирт — пиридин — вода (35 : 35 : 30). Аминооксибензойные кислоты и их ацетильные производные хроматографировал Брей и сотрудники (растворитель: хлороформ — уксусная кислота — вода, 2 : 2 : 1). Метод разделения антрациловой кислоты, кинуренина и других флуоресцирующих метаболитов триптофана разработали Мейсон и Берг (растворитель: *н*-бутанол —

Таблица 70  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ АМИНОФЕ-  
НОЛОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

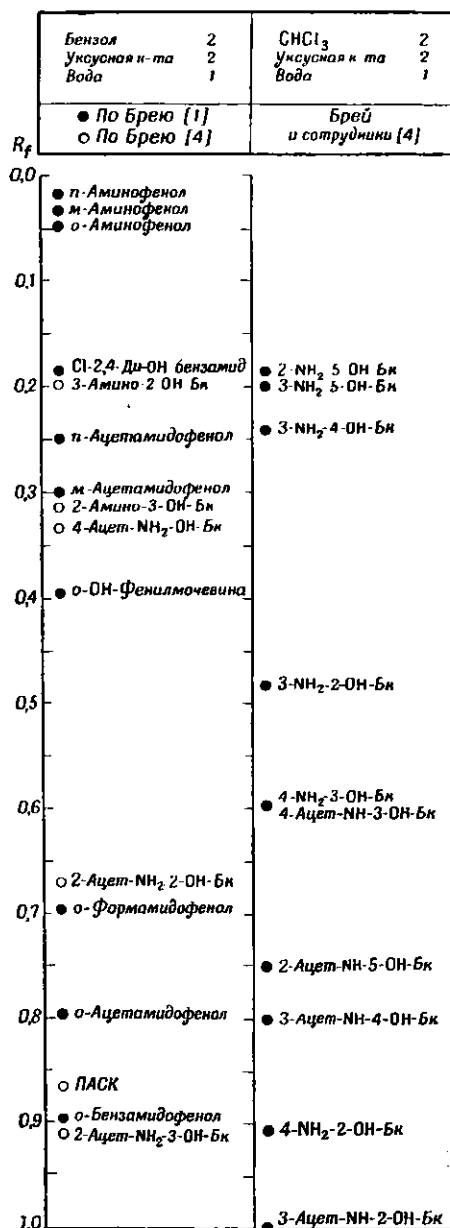
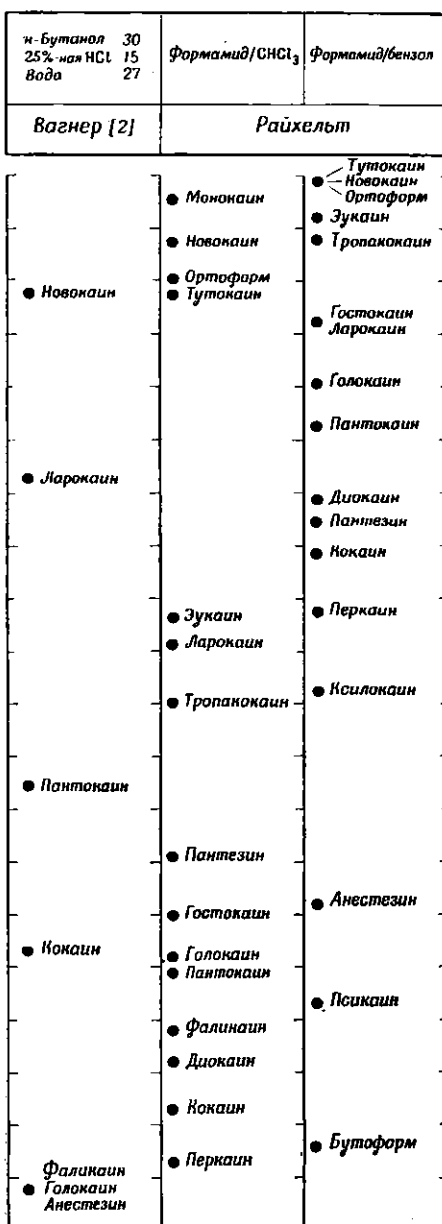


Таблица 71  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ВЕЩЕСТВ, ИСПОЛЬЗУЕ-  
МЫХ ДЛЯ МЕСТНОЙ АНЕСТЕЗИИ



бензол — вода, 2 : 2 : 2). *d,l*-Кинуренин и некоторые родственные соединения можно расщепить на *d*- и *l*-формы посредством хроматографирования водным раствором бутанола или метанола (Вейхерт), а также (по Далглишу) системами бутанол — уксусная кислота — вода (см. также стр. 426).

## Аралкиламины

В этом разделе будут рассмотрены симпатомиметические амины, причем наибольшее внимание будет уделено адреналину.

### Обнаружение

Для обнаружения и идентификации наряду с кислотно-основными индикаторами (бромкрезоловый зеленый, Д 6) для соединений с первичными аминогруппами (тирамин, норадреналин) можно использовать реакцию с пингидрином (Д 112). Отдельные симпатомиметические амины дают, кроме того, характерное окрашивание при реакции с йодатом калия (Д 109), например норадреналин дает фиолетовое окрашивание, диоксифенилаланин — серовато-фиолетовое, адреналин — розовое, окситирамин — оранжевато-коричневое. С феррицианидом калия (фосфатный буферный раствор, pH 7,8; Д 110) адреналин дает светло-красное, а норадреналин — коричневатое-красное пятно. Метиладреналин, а также тирамин не окрашиваются. Из других видов проявления мы приводим реакцию с  $\beta$ -нафтохинонсульфонатом натрия (Д 115), применение диазотированного *n*-нитроанилина (Д 50) и флуоресценцию в ультрафиолетовом свете (адреналин, обработанный парами аммиака, дает зеленую флуоресценцию).

### Системы растворителей

Для разделения адреналина, норадреналина и других симпатомиметических аминов можно применять следующие системы: фенол — вода, *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5; значения  $R_f$  см. в табл. 64), этилацетат — уксусная кислота — вода (7 : 1 : 3), хлороформ — уксусная кислота — вода (10 : 4 : 5), *n*-бутанол, насыщенный 0,5 н. HCl и т. п. (Джеймс; Викстрём и Сальвезен). Вагнер [3] разделял симпатомиметические амины на бумаге, пропитанной буферным раствором.

## Полиамиды и их компоненты

К. Мацек

Самым простым применением метода хроматографии на бумаге при анализе полиамидов и полиуретанов является идентификация отдельных компонентов после кислотного гидролиза полимеров (6 н. HCl). Методака была разработана Цаном и Вольфом [1], которые идентифицировали амины после гидролиза ( $\epsilon$ -аминокапроновую кислоту с  $R_f$  0,60 и гексаметилендиамин с  $R_f$  0,16) в системе бутанол-2 — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10), проявляя их пингидрином (Д 112), а также кислоты (адипиновую с  $R_f$  0,49 и себадиновую с  $R_f$  0,72), проявляя бромтимоловым синим (Д 6) после хроматографирования натриевых солей в системе *n*-пропанол — аммиак — вода (6 : 3 : 1; Цан и Воллеман [2]). Этим способом был идентифицирован перлон L (содержит  $\epsilon$ -аминокапроновую кислоту), перлон U (гексаметилендиамин + бутандиол-1,4), найлон 66 (гексаметилендиамин + адипиновая кислота) и найлон 610 (гексаметилендиамин + себадиновая кислота).

Для исследования равновесных состояний, в частности для изучения кинетики при реакциях трансамидирования между капролактамом и ацетанилидом, Павличкова применила количественный анализ методом хроматографии на бумаге (частное сообщение). При круговом хроматографировании в системе бутилацетат — 85%-ная муравьиная кислота (20 : 1) ацетанилид имел  $R_f$  0,87, а капролактam — 0,54; можно было также изучать образование олигомеров: мономер имел  $R_f$  0,80, димер — 0,65, тример — 0,42 и т. п. Для проявления капролактама был использован реактив Драгендорфа (Д 144), для идентификации ацетанилида и олигомеров — диазотирование нитрозными газами и сочетание с R-кислотой (Д 108). При количественном анализе в элюатах из непроявленных полосок хроматограммы осуществляют перевод ацетанилида и капролактама в гидроксамовые кислоты, комплексы которых с  $Fe^{3+}$  колориметрируют. Точность метода при нанесении от 160 до 1300  $\mu g$  составляет  $\pm 5\%$ .

Полиамиды можно определять, не прибегая к гидролизу (Айерс). 1%-ный раствор полиамида в 90%-ной муравьиной кислоте наносят на бумагу ватман 54 и хроматографируют 88%-ной муравьиной кислотой в атмосфере, насыщенную водяным паром. Для проявления можно использовать 0,1%-ный раствор Solacet Fast Blue 2BS в 0,1%-ной уксусной кислоте; после проявления бумагу нагревают в течение 5 мин до 80°. В приведенной системе нейлон 6 (поликапроамид) имеет  $R_f$  0,8, нейлон 66 —  $R_f$  0,4, нейлон 610 —  $R_f$  0,3 и перлон U остается на линии старта.

## ЛИТЕРАТУРА

- Acker L., Diemair W., Pfeil D., Schiffner G., Z. anal. Chem., 148, 10 (1955).  
 Adachi S., Kagaku, 23, 582 (1953); C. A., 48, 12214 (1954).  
 Augustinsson K.-B., Grahm M., Acta chem. Scand., 7, 906 (1953).  
 Ayers C. W., Analyst, 78, 382 (1953).  
 Baker W., Harborne J. B., Ollis W. D., J. Chem. Soc., 1952, 3215.  
 Bertetti J., Ann. chimica, 44, 495 (1954).  
 Bray H. G., Thorpe W. V., White K., Biochem. J., 46, 271 (1950).  
 Bregoff H. M., Roberts E., Delwiche C. C., J. biol. Chem., 205, 565 (1953).  
 Bremner J. M., Analyst, 79, 937 (1954). [1]  
 Bremner J. M., Kenten R. H., Biochem. J., 49, 651 (1951). [2]  
 Cain L., Univ. Texas Pubs., 5109, 82 (1951).  
 Dalgliesh C. E., J. Chem. Soc., 1952, 3940.  
 Эпштейн Я. А., Фомина М. П., Биохимия 15, 321 (1951).  
 Gasparič J., Petránek J., Večeřa M., Mikrochim. Acta, 1955, 1026.  
 Glazko A. J., Dill W. A., Nature, 168, 32 (1951).  
 Haberland G. L., Bruns F., Altman K. I., Biochem. biophys. Acta, 15, 578 (1954).  
 Hamada M., J. Chem. Soc. Japan, 58, 286 (1955).  
 Harborne J. B., Weaving A. S., J. Chem. Soc., 1954, 1157.  
 Holness H., Stone W. R., Nature, 176, 604 (1955).  
 James W. O., Nature, 161, 851 (1948).  
 Kirby-Berry H., Cain L., Univ. Texas Pubs., 5109, 80 (1951).  
 Kofod H., Acta chem. Scand., 9, 1575 (1955).  
 Košťiř J. V., Rábek V., Biochem. et biophys. Acta, 5, 210 (1950).  
 Lederer M., Australian J. Sci., 11, 208 (1949); C. A., 44, 976 (1950).  
 Lockhart I. M., Nature, 177, 393 (1956).  
 Macek K., Hascperková J., Kakač B., Pharmazie, 11, 533 (1956).  
 Mason M., Berg C. P., J. biol. Chem., 188, 783 (1951).  
 Maw G. A., Biochem. J., 43, 139 (1948).  
 Micheel F., Schweppe H., Mikrochim. Acta, 1954, 53.  
 Mourgue M., Baret R., Bull. Soc. Chim. France, 1955, 1224.

- Munier R., Bull. Soc. chim. biol., 33, 862 (1951). [1]  
Munier R., Bull. Soc. chim. France, 1952, 852. [2]  
Pollard F. H., Banister A. J., Anal. chim. Acta, 14, 70 (1956).  
Rao T., Giri K. V., J. Indian Inst. Sci. 35, 137 (1953).  
Reichelt J., Českoslov. Farm., 4, 297 (1955).  
Roche J., Thoai N. Van, Hatt J. L., Biochim. biophys. Acta, 14, 71 (1954).  
Steiner M., Stein v. Kamienski E., Naturwissenschaften, 40, 483 (1953).  
Tuppy H., Monatsh., 84, 342 (1953).  
Vitek V., Českoslov. Farm., 1, 252 (1952).  
Wagner G., Pharmazie, 8, 1021 (1953). [1]  
Wagner G., Arch. Pharm., 286, 232 (1953). [2]  
Wagner G., Scientia pharm., 23, 148 (1955). [3]  
Wagner G., Zimmer U., Pharm. Acta Helv., 30, 385 (1955). [4]  
Waldron-Edward D. M., Chemistry & Industry, 1954, 104.  
Weichert R., Acta chem. Scand., 8, 1542 (1954).  
Wickström A., Salvesen B., J. Pharm. Pharmacol., 4, 631 (1952).  
Zahn H., Wolf H., Melliand Textilber., 32, 317 (1951). [1]  
Zahn H., Wollemann B., Melliand Textilber., 32, 927 (1951). [2]

# НИТРОСОЕДИНЕНИЯ

Я. Франц

## Связь между структурой и хроматографическим поведением

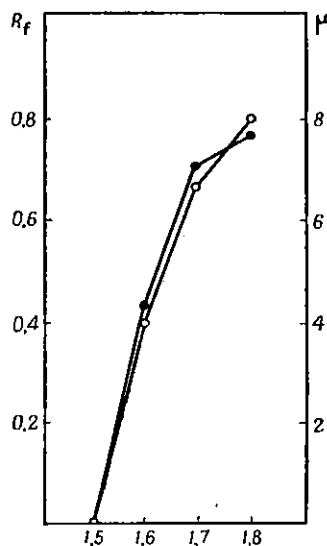
При идентификации нитросоединений, применяемых преимущественно в качестве промежуточных продуктов при производстве красителей, первоначально была использована зависимость между дипольным моментом молекулы и величиной  $R_f$ , выведенная Францем и Латинаком [3] и обсуждавшаяся выше (см. стр. 82).

Пользуясь этой зависимостью, можно определить значения  $R_f$  тех изомерных соединений, стандартные образцы которых синтезируются лишь с большим трудом.

С помощью уравнений, приведенных на стр. 82 (27а, б), можно было при хроматографировании технических нитропродуктов показать, что, например, технический динитрофталин содержит 1,5- и 1,8-изомеры, а динитроантрахинон — изомеры 1,5-, 1,8-, 1,6- и 1,7- (рис. 162).

Рис. 162. Сравнение величины  $R_f$  и дипольных моментов отдельных изомерных динитроантрахинонов (Франц).

○ значение  $R_f$ ; ● дипольный момент.



### ОБНАРУЖЕНИЕ

Прямое проявление нитрогруппы можно в некоторых случаях проводить, например, с помощью реакции Яновского (едкий натр с ацетоном). Часто бывает достаточно наблюдений в ультрафиолетовом свете; при этом нитросоединения проявляются обычно в виде темных пятен. Улучшение

обнаружения в ультрафиолетовом свете у динитропроизводных бензола, нафталина и антрахинона достигается обработкой 0,005 %-ным спиртовым раствором флуоресцеина. Упомянутые способы проявления не являются, однако, достаточно чувствительными. В тех случаях, когда требуется проводить проявление ничтожных количеств примесей, мы выбираем более удовлетворительный способ, при котором нитрогруппа путем восстановления хлористым оловом переводится в аминогруппу (Д 111). Для аминогруппы в нашем распоряжении имеется ряд чувствительных способов проявления. Чаще всего для ароматических соединений используют *n*-диметиламинобензальдегид (Д 102), с которым полинитросоединения дают обычно пятна более темной окраски (оранжевые или красные). Далее, после проведения диазотирования (лучше всего нитрозными газами) продукты реакции можно сочетать с 1-нафтолом, этил-1-нафтиламином, *N*-(1-нафтил)-этилендиамином (Д 108) или *R*-солью (2-нафтол-3,6-нафталиндисульфокислота). При идентификации соединений можно применять комбинированное проявление, так как иногда пространственные затруднения, не позволяющие проводить сочетание, бывают с этой точки зрения хорошим руководством.

Для хлорамфеникола, кроме обычного химического проявления, применяют проявление биологическое.

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

### Нитрованные промежуточные продукты в производстве красителей

Использование хроматографии на бумаге для анализа промежуточных продуктов стало незаменимым методом при производстве синтетических красителей. Чаще всего требуется отделять изомерные примеси, идентификация которых обычными аналитическими методами требует значительного времени и иногда не дает исчерпывающего ответа о качестве испытуемого сырья.

Большинство нитросоединений разделяется на бумаге, пропитанной гидрофобными растворителями. Франц [1] разделял изомерные динитробензолы, динитронафталины и динитроантрахиноны на бумаге, пропитанной керосином, с применением в качестве подвижной фазы системы этанол — вода — уксусная кислота (20 : 14 : 1). Аналогичным образом [2] он разделял нитроизомеры ксилолов, толуола и этилбензола, а также некоторые нитрокрезолы. Для нитрокрезолов с успехом было применено пропитывание бумаги бромнафталином.

Без пропитывания бумаги Франц [2] разделял нитрованные моно- и дикарбоновые кислоты в системе *n*-бутанол — пиридин — вода (5 : 3 : 3) и изоамиловый спирт — этанол — пиридин — вода (1 : 1 : 1 : 1). При этом ему удалось отделить друг от друга терефталевую и изофталевую кислоты в форме их нитропроизводных. 3- и 4-Нитрофталевые кислоты можно, кроме того, разделять, используя *n*-бутанол, насыщенный 10 %-ной уксусной кислотой.

Хроматографирование нитрофенолов изучали Лонг и сотрудники, которые использовали смесь этанол — аммиак — вода (5 : 2 : 4), а также Ледерер, который добился снижения  $R_f$ , применяя в качестве растворителя бутанол, насыщенный 5 н. аммиаком.

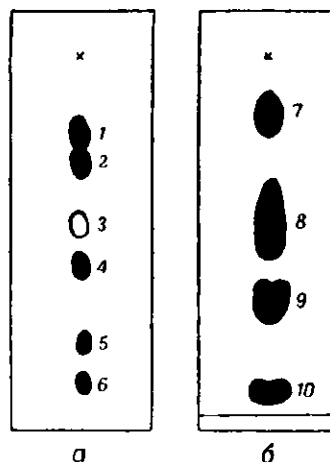
## Хлорамфеникол

Смит и Уоррел для разделения хлорамфеникола, его производных и промежуточных продуктов использовали *n*-бутанол, насыщенный водой, с добавкой 2,5% уксусной кислоты; Глазко, кроме того, применял *n*-бутанол, насыщенный водой, с 2,5% фенола и 2% пиридина, или *n*-бутанол

Рис. 164. Хроматографирование хлорамфеникола и родственных соединений (Хайс и сотрудники).

а — система: *n*-бутанол, насыщенный водой, — фенол — пиридин (191 : 5 : 4). Проявление *n*-диметиламинобензальдегидом (Д102). Анализ мочи собак после добавления в пищу хлорамфеникола. 1 — неидентифицированное соединение (очевидно, глюкуроид хлорамфеникола); 2 — мочевины; 3 — мочевины; 4 — *di-tris*-1-(4'-нитрофенил)-2-аминопропан-1,3-диол; 5 — неидентифицированное соединение; 6 — хлорамфеникол.

б — разделение продуктов, которые могут образоваться при реакции *n*-нитро- $\alpha$ -дихлорацетида с фенолом с формальдегидом. Бумага пропитана  $Al(OH)_3$ , растворитель — сухой бензол; 7 — *n*-нитро- $\alpha$ -дихлорацетида- $\alpha$ -оксиметил- $\beta$ -оксипропиофенон; 8 — *n*-нитро- $\alpha$ -дихлорацетида- $\beta$ -оксипропиофенон; 9 — 1,5-ди-*n*-нитрофенил-2,4-дихлорацетида-1,5-пентадион; 10 — *n*-нитрофенил- $\alpha$ -дихлорацетида-амидовинилкетон.



с 1,5%-ным аммиаком. Для других производных хлорамфеникола, обладающих менее полярным характером, Мачек использовал бумагу, пропитанную  $Al(OH)_3$  (II 5), и в качестве подвижной фазы — бензол или (для непропитанной бумаги) смесь бензол — метанол — вода (II 10, рис. 163, 164). В случае когда анализируют смесь большого числа соединений аналогичной структуры, как, например, в биологическом материале, выгоднее комбинировать хроматографирование на бумаге с ионофорезом по двумерной методике (Хайс и сотрудники).

## ЛИТЕРАТУРА

- Franc J., Chem. Listy, 49, 872 (1955). [1]  
 Franc J., Chem. Listy, 51, 2041 (1957). [2]  
 Franc J., Latinák J., Chem. Listy, 49, 317, 325, 328 (1955). [3]  
 Glazko A. J., Dill W. A., Rebstock M. C., J. biol. Chem., 183, 679 (1950).  
 Hais I. M., Macek K., Francová V., Čs. farmacie, 4, 127 (1955).  
 Lederer M., Australian J. Sci., 11, 208 (1949).  
 Long A. G., Quayle J. R., Stedman R. J., J. Chem. Soc., 1951, 2197.  
 Macek K., Chem. Listy, 47, 467 (1953).  
 Smith G. N., Worrel C. S., Arch. Biochem., 28, 1 (1950).

# АМИНОКИСЛОТЫ

---

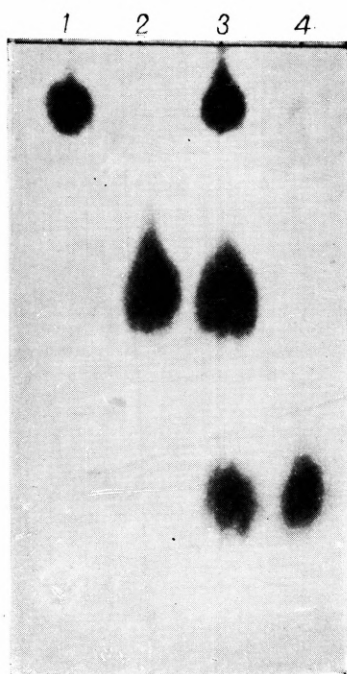
И. М. Хайс

## Связь между структурой и хроматографическим поведением аминокислот

Большинство хроматографических систем для разделения аминокислот основано на их распределении между водной неподвижной фазой и подвижной фазой органического растворителя. Само собой разумеется, что величина  $R_f$  увеличивается с удлинением углеродной цепочки, а полярные группы уменьшают эту величину. Из аминокислот основного характера наименьшую величину  $R_f$  имеет лизин. Остальные правила нельзя сформулировать в общих чертах, без учета системы растворителей. В фенольных системах имеет место следующий порядок величин  $R_f$ : серин < гликокол  $\leq$  аспарагин, в то время как в остальных системах: аспарагин < гликокол  $\leq$  серин. У циклических аминокислот в фенольных системах порядок величин  $R_f$  следующий: тирозин < триптофан < < фенилаланин < пролин, тогда как в спиртовых системах: пролин > или < тирозин < триптофан < фенилаланин (Ундервуд и Рокланд).

На рис. 165 приведены некоторые зависимости. В нейтральных системах растворителей, содержащих алифатические спирты (3, 4, 5), и в системе, включающей основной органический растворитель, преимущественно акцептор протона (10), аргинин перемещается более медленно, нежели глутаминовая кислота. При подкислении, например уксусной кислотой, этот порядок сохраняется. В системах, содержащих фенол, т. е. в системах, включающих главным образом донор протона, порядок меняется на обратный — аминокислота основного характера перемещается быстрее (6, 7, 8, 9); в известной мере это относится и к системам растворителей, содержащим ароматические спирты (1). Подщелачивание (аммиаком) усиливает различие, так как подавляется диссоциация аминогрупп, преобладающих в аргинине, и повышается диссоциация карбоксильной группы (ср. 6 и 7).

Представляет интерес порядок перемещения лейцина и фенилаланина: в большинстве систем растворителей, которые содержат алифатические спирты, лейцин перемещается быстрее, а в системах с циклическими органическими растворителями (бензиловый и фуриловый спирты, фенолы, пиридиновые основания) наблюдается обратная картина; это правило, однако, не является общим. Большое влияние на перемещение оказывает также сорт бумаги. По нашим данным на разных номерах бумаги и даже на бумаге одного и того же номера, но из различных партий, соотношение



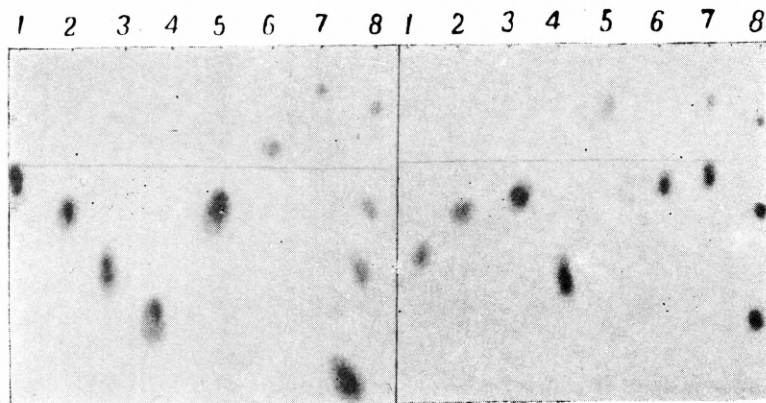
Р и с. 161. Хроматограмма изомерных нитроанилинов в системе формамид/циклогексан — бензол (3 : 1).

1 — *n*-нитроанилин; 2 — *m*-нитроанилин; 3 — смесь; 4 — *o*-нитроанилин.



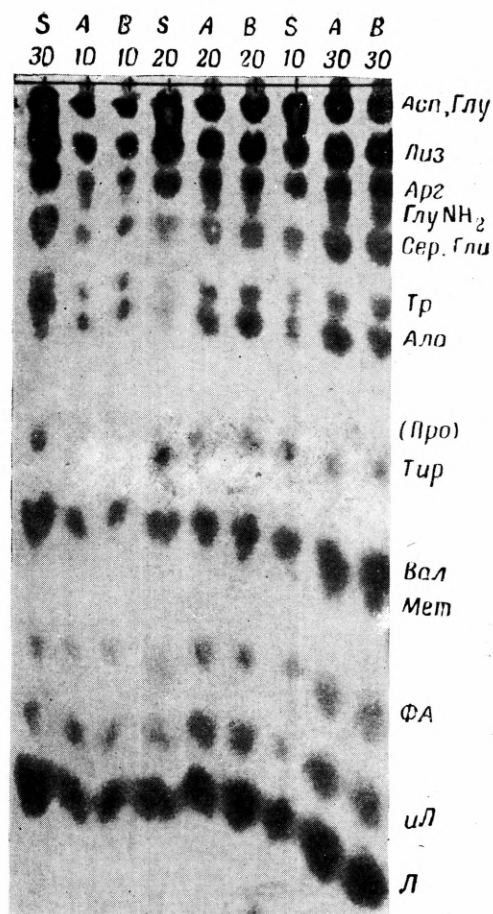
Р и с. 163. Влияние галоидирования алифатического остатка дегидрохлорамфеникола на величину  $R_f$  (Мацек).

Система: бензол — метанол — вода (II 10). 1 — трихлорацетильный аналог дегидрохлорамфеникола; 2 — дегидрохлорамфеникол; 3 — смесь трех соединений; 4 — монохлорацетильный аналог. Во всех случаях вместе с фронтом перемещается *n*-нитрофенил-1-дихлорацетамидовиллкетон.



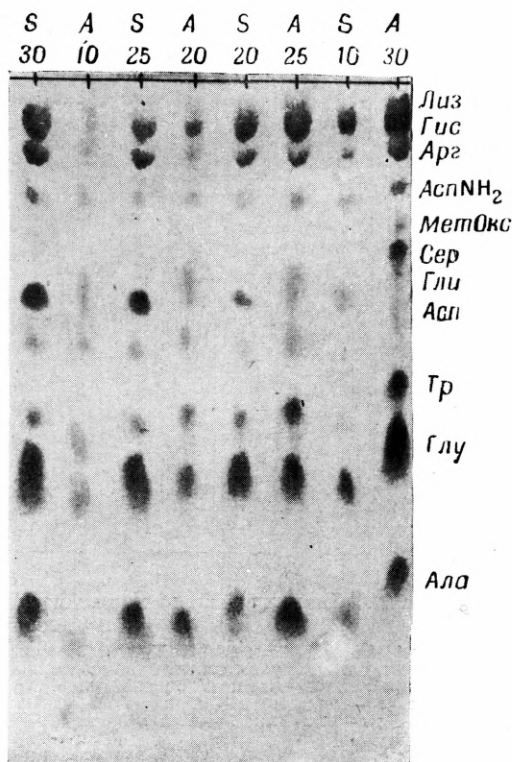
Р и с. 170. Высаливающая хроматография аминокислот и пептидов (Хагдаль и Тизеллус).

Система: 1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 2 М  $\text{NaNH}_2\text{PO}_4$ . Образцы были нанесены на линию старта лишь тогда, когда фронт подвижной фазы достиг приблизительно трети хроматограммы. Нанесено по 12,5 мкг рацемических аминокислот и по 25 мкг пептидов. Слева: 1 — Л; 2 — Вал; 3 — Ала; 4 — Гли; 5 — Мет; 6 — ФА; 7 — Трипт; 8 — Трипт+Фа+Л+Гли. Справа: 1 — *dl*-Л·Гли·Гли; 2 — *d*-Л·Гли; 3 — Гли·*l*-Л; 4 — Гли·Гли; 5 — Гли·*l*-Трипт; 6 — Гли·*l*-Тир; 7 — Гли·*l*-Трипт; 8 — Гли·*l*-Трипт+Гли·*l*-Тир+Гли·Гли.



Р и с. 180. Определение аминокислот визуальным методом с применением убывающих количеств стандарта и возрастающих количеств образца.

Система: *трет*-бутанол — буферный раствор, рН 8,5 (II 77) с перетеканием до тех пор, пока пятна метилоранжа (в нижней части рисунка) не достигнут конца бумаги (примерно 7 дней). Проявление нингидрином с уксусной кислотой (Д 1126). *S* — искусственная смесь известного состава, по концентрации аминокислот соответствующая образцу. *A*, *B* — анализируемые растворы ферментативного гидролизата казеина в 30%-ном изопропиловом спирте, содержащие смесь свободных аминокислот в количестве 6 г/л.

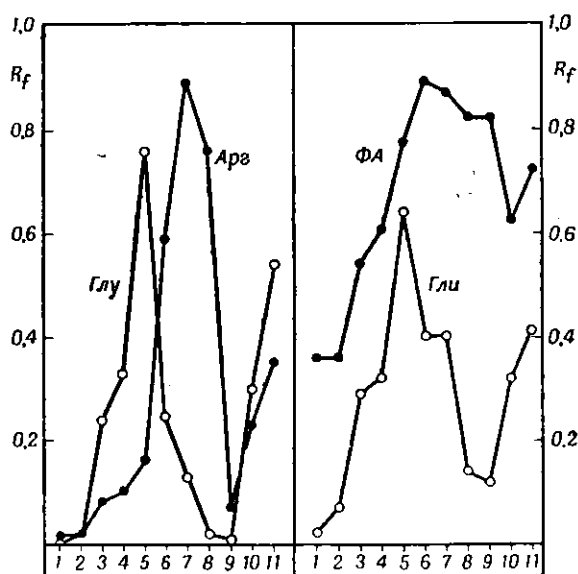


Р и с. 181. Пример определения аминокислот (см. рис. 180) (Хайс и Франц [2]).

Система: *н*-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10) с перетеканием (приблизительно 72 часа). *S* — искусственная смесь; *A* — анализируемый раствор. Пример определения для Тр: 25  $\mu$ л *S* гораздо интенсивнее, чем 10  $\mu$ л *A*, и почти так же интенсивно, как 20  $\mu$ л *A*. Принимаем, что 25  $\mu$ л *S* (1  $\mu$ л = 0,25  $\mu$ г Тр) соответствует 18  $\mu$ л *A*. Следовательно, концентрация Тр в *A* (25  $\times$  0,25) : 18 = 0,35  $\mu$ г/ $\mu$ л = 0,35 г/л.

между пятнами циклических и алифатических аминокислот меняется, что в некоторых случаях способствует разделению, а иногда — мешает (рис. 39).

Между изомерами лейцина имеются особенно резкие различия, если использовать третичные спирты; порядок величин  $R_f$  здесь в большинстве случаев следующий: псевдолейцин < изолейцин < лейцин < норлейцин.



Р и с. 165. Значения  $R_f$  аминокислот в различных системах (Рокланд и сотрудники [1]).

Системы растворителей и методика: 1 — бензиловый спирт, насыщенный водой, цилиндр; 2 — *трет*-амиловый спирт, насыщенный водой, пробирка, восходящая хроматография; 3 — 70%-ный *трет*-бутанол, цилиндр, восходящая хроматография; 4 — 70%-ный *n*-пропанол, цилиндр, восходящая хроматография; 5 — 76%-ный метанол, цилиндр, восходящая хроматография; 6 — фенол, насыщенный водой,  $\text{HCN}$  в атмосфере, пробирка, восходящая хроматография; 7 — фенол, насыщенный водой, 3%  $\text{NH}_3$  в атмосфере, пробирка, восходящая хроматография; 8 — *m*-крезол, насыщенный водой + купрон, 0,1%  $\text{NH}_3$  в атмосфере, пробирка, восходящая хроматография; 9 — *m*-крезол, насыщенный водой + купрон, пробирка, восходящая хроматография; 10 — смесь коллидина и лутидина, насыщенная водой, цилиндр, восходящая хроматография; 11 — 75%-ный тетрагидрофуриловый спирт, пробирка, восходящая хроматография. Глутаминовая кислота (Глу) — пример кислых аминокислот, аргинин (Арг) — пример основных аминокислот, гликокол (Гли) — пример нейтральных алифатических аминокислот, фенилаланин (Фа) — пример нейтральных циклических аминокислот.

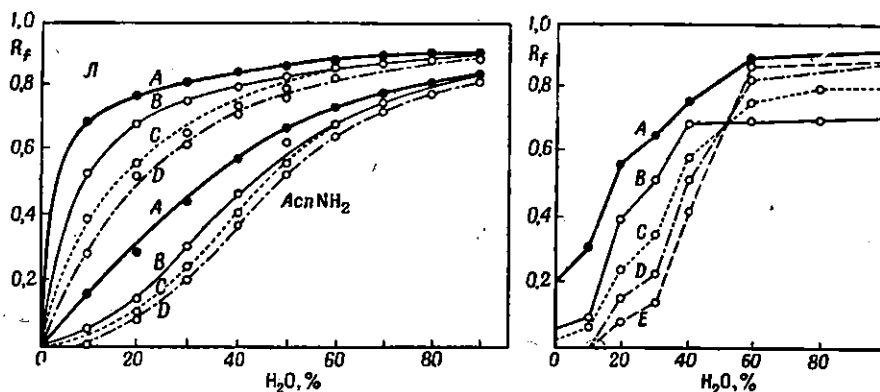
Точно так же более высокое значение  $R_f$  в большинстве систем имеет  $\alpha$ -амино-*n*-масляная кислота по сравнению с  $\alpha$ -аминоизомасляной (Осима и сотр.). *трео*- и *эритро*-изомеры удается хорошо разделить во многих системах растворителей; описано отделение *треонина* (более высокое значение  $R_f$ ) от *аллотреонина*, *фенилсерина* (более высокое значение  $R_f$ ) от *аллофенилсерина* (Шоу и Фокс), разделение производных *фенилсерина* (Дрелл), медных комплексов оксипролина (более низкое значение  $R_f$ ) от медных комплексов аллооксипролина (Фридберг). Разделение оптических изомеров является скорее исключением, нежели правилом (см. стр. 426).

Положение аминогруппы по отношению к карбоксильной группе оказывает заметное влияние на величину  $R_f$ , которая уменьшается тем

сильнее, чем дальше расположена аминогруппа. Синг [1] связывает это с высоким дипольным моментом  $\omega$ -аминокислот, что приводит к ухудшению их растворимости в спиртах по сравнению с водой; сближение значений  $R_f$   $\alpha$ - и  $\omega$ -аминокислот при добавлении уксусной кислоты объясняется взаимодействием молекул уксусной кислоты с аминокислотами в органической фазе.

На двумерных хроматограммах, приведенных на рис. 172 (по Стьюарду и Томпсону [1] и по Полсону [2]; см. стр. 408), стрелками обозначено влияние заместителей и структурных особенностей на величину  $R_f$ .

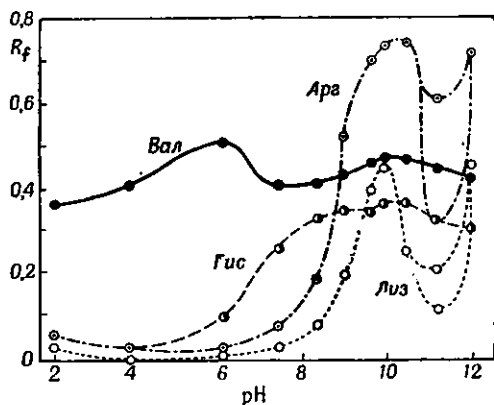
Большое теоретическое и практическое значение имеет вопрос, возможно ли при хроматографии аминокислот взаимодействие диполей различных аминокислот в том смысле, что остаток одной аминокислоты как



Р и с. 166. Влияние количества воды в растворителе и числа атомов углерода в спирте на величину  $R_f$ .

Слева — по данным Рокланда и сотрудников: А — этанол; В — этанол; С — *n*-пропанол; D — *трет*-бутанол.  
Справа — по данным Деккера и Риффарта, значения  $R_f$ : А — Л; В — Три; С — Тир; D — Лиз; Е —  $CysS_2$  в системе изобутанол — вода.

бы втягивает в пятно этой кислоты другую аминокислоту, образуя третье пятно — комплекс обеих кислот, как это предполагают Бек и Эбри [2] на основании опытов, проведенных с глутаминовой кислотой и гликоколом.



Р и с. 167. Влияние pH системы на величину  $R_f$  аминокислот (Мак-Фаррен).

Бумага пропитана буферным раствором, подвижный растворитель — *m*-крезол, насыщенный тем же буферным раствором. Аминокислоты основного характера — лизин и аргинин дают при pH 11,2 размытые грязные полосы.

Этот вопрос до сих пор не решен; возражения Гакмана и Ладаруса не касаются существа вопроса. Данные, которыми мы сейчас располагаем,

а также полученные исследователями, работающими в области химии белков, указывают на то, что при хроматографическом разделении пептидов иногда обнаруживаются примеси соединений, не образующих смежные пятна. К счастью, ни эти наблюдения, ни явления, наличие которых предполагали Бек и Эбри, не являются столь существенными, чтобы влиять на результаты качественного анализа методом хроматографии на бумаге. Для количественного анализа аминокислот иногда рекомендуют блокировать функциональные группы путем динитрофенилирования или образования комплексов с медью.

## Методика

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Свободные аминокислоты во многих биологических материалах содержатся в весьма низкой концентрации по сравнению с другими компонентами. Поэтому возникает необходимость проводить частичную очистку образца. В основном здесь имеются в виду следующие группы соединений, препятствующих хроматографическому анализу: белки, липиды, неорганические соли и, возможно, сахара и мочевины.

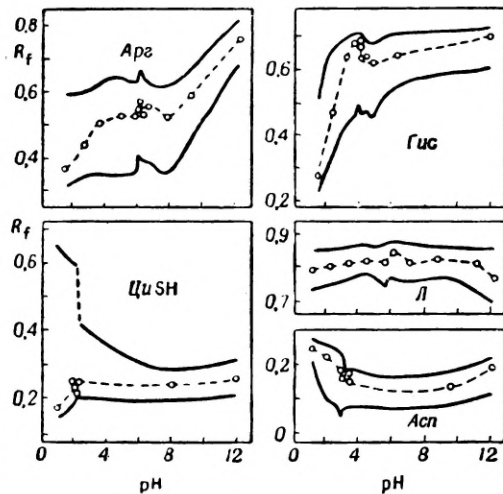
### УДАЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Небольшие количества белков, как, например, в моче при не очень сильной протеинурии, удалять не нужно. Чаще всего белки удаляют добавлением этанола (4—9 частей 96%-ного этанола на 1 часть ткани); вытяжку отстаивают в течение нескольких часов, центрифугируют или фильтруют и осадок промывают 80—90%-ным этанолом. Был также предложен способ осаждения путем кипячения, осаждение ацетоном, 4%-ной хлорной кислотой (Мюллер и сотрудники) и фосфорномолибденовой кислотой (Горбах и сотрудники). Осаждение спиртом можно заменить экстракцией этанолом непосредственно на бумаге, однако получающиеся при этом результаты не надежны.

Многие авторы использовали также диализ или ультрафильтрацию (Дент и Шиллинг [4]; Гордон). Если для высаливания применять ионообменные смолы, которые не сорбируют белок, то также произойдет депротеинизация.

Р и с. 168. Влияние pH образца на величину  $R_f$  некоторых аминокислот (Ландуа и сотрудники [2]).

Система: фенол, насыщенный водой. Образец, бумага и система буферным раствором не обрабатывались. Центры наиболее интенсивных участков пятен соединены пунктирной линией.



### ОБЕЗЖИРИВАНИЕ

Липондные соединения, содержащиеся в образце, способствуют размазыванию пятен аминокислот. Освобожденную от белков жидкость можно упарить досуха и к остатку прилить диэтиловый (де Вердые и Агреп) или петролейный эфир. Было доказано, что при этом имеют место потери, которые, в частности, обусловлены тем, что фосфатиды способствуют растворимости аминокислот в липондной фазе (Уинн и Уильямс). Довольно распространенным методом анализа животной ткани и плазмы крови является смешение водного и хлороформенного слоев по Авапара [1] (П 69), но и здесь могут иметь место потери. При деминерализации с помощью ионообменных смол происходит также и обезжиривание. Обезжиривание высушенного материала безводным эфиром проводят в качестве первой операции при подготовке к анализу растительных веществ.

### ОБЕССОЛИВАНИЕ

Обессоливание чаще всего проводят электродиализом в приборе Консдена и сотрудников [4]. Выше (см. стр. 93) описана модификация этого прибора и упомянуты некоторые нежелательные химические реакции, которые могут иметь место при обессоливании. Для анализа аминокислот наиболее важной нежелательной реакцией является расщепление аргинина; количество орнитина и мочевины, возникающее при обессоливании, значительно меньше, чем это соответствует убыли аргинина (Смит [2]). При охлаждении потери снижаются, однако это зависит от количества и химического характера удаляемых ионов (Стейн и Мур [2]).

### Быстрый ионофорез на бумаге

Согласно Буланже [3], ионофорез на бумаге можно использовать для обессоливания небольших образцов (см. рис. 32). Быстро движущиеся неорганические анионы и катионы удаляются, а нейтральные зоны вместе со слабыми кислотами и основаниями элюируются для хроматографического анализа.

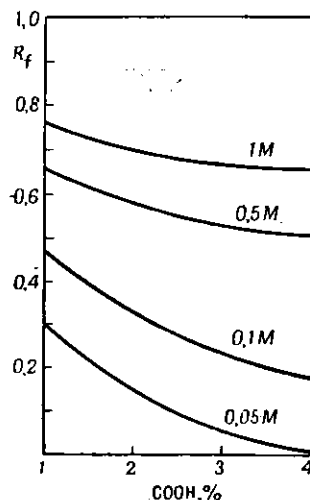
### Ионообменные смолы

Чаще всего поступают следующим образом: образец пропускают через слой катионита в  $H^+$ -форме, а затем слой ионообменной смолы промывают водой. Через слой свободно проходят незаряженные соединения и кислоты, а неорганические катионы и аминокислоты остаются в колонке и извлекаются аммиаком (или иногда  $HCl$ ; Мюллер и сотрудники). Аммиачную вытяжку упаривают досуха. Остаток содержит аминокислоты, их амиды, амины, низшие пептиды, мочевины и креатинин. Слой катионита регенерируют затем щелочью, кислотой и водой. В той части продукта, которая не сорбируется на катионите и вымывается водой, содержится таурин и ряд пептидов, которые при необходимости можно фракционировать на анионите (Буланже и Бизерт [2]; см. также стр. 468). Белки не поглощаются катионитом, поэтому обессоливанием на сульфированном полистироле можно в то же время депротеинизировать материал, содержащий небольшое количество белков.

По данным Авапара и Сато [3], для обессоливания можно также применять аниониты (дауэкс 2) в  $\text{OH}^-$ -форме. После промывания дистиллированной водой продукты выделяют с помощью элюции 4 н. уксусной кислотой.

### Подкисленный ацетон

Согласно Буланже и Бизерту [1, 2], продукт после упаривания можно экстрагировать безводным ацетоном, содержащим 1% концентрированной соляной кислоты. Экстракцию необходимо повторять (II 70). Однако при концентрировании экстракта, полученного с подкисленным



Р и с. 169. Хроматография аргинина на карбоксилцеллюлозе.

Влияние емкости катионообменников и концентрации солей на величину  $R_f$  (Виланд и Берг [3]). Карбоксилцеллюлоза содержит 1—4%  $\text{COOH}$ . Подвижный растворитель: муравьинокислый аммоний, pH 9, концентрация 0,05—1,0 М.

ацетоном, может гидролизаться глутамин и некоторые пептиды. Ацетон заменяли также 95%-ным этанолом. Этот метод нам не удалось точно воспроизвести.

## ВЫДЕЛЕНИЕ САХАРОВ

Большой избыток сахаров во многих материалах растительного происхождения мешает определению аминокислот главным образом благодаря тому, что значительно повышается вязкость анализируемого раствора в месте его нанесения на бумагу. Удалять сахара можно с помощью катионообменных смол, как уже говорилось об этом ранее (Ваврух).

## МОЧЕВИНА

Избыток мочевины в анализируемом образце различными способами препятствует четкому хроматографированию (Ризл): а) мочевина вытесняет аминокислоты и тем самым затрудняет их идентификацию по значениям  $R_f$ ; б) мочевина ослабляет и делает менее устойчивой реакцию аминокислот с нингидрином. Для удаления мочевины было предложено использовать уреазу (Буассона и Ло Бьянко [4]).

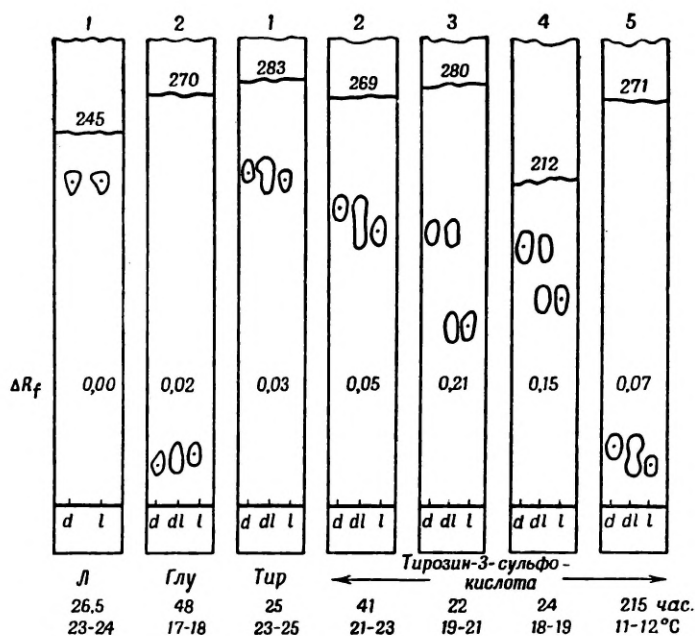
## ГИДРОЛИЗ

Аминокислоты, которые входят в состав белков и пептидов, выделяют путем гидролиза. Чаще всего гидролиз осуществляют (в 5,7—6 н. соляной кислоте) в запаянной трубке или в колбе с обратным холодильником при  $105^\circ$  в течение суток, остаток помещают в вакуум-эксикатор над щелочью, затем разбавляют водой и снова сушат в эксикаторе до полного удаления кислоты. (Некоторые авторы переводят соляную кислоту из водного слоя

в органический с помощью диэтилгексиламина.) Примесь железа в кислоте увеличивает потери, поэтому соляную кислоту рекомендуют предварительно перегонять. Присутствие сахаров в образце ведет к повышенному образованию гуминовых соединений; полностью избежать этих потерь невозможно, даже прибавляя в кислоту восстановитель ( $\text{SnCl}_2$ ). Был предложен гидролиз материала с высоким содержанием сахаров смесью муравьиной и уксусной кислот, 10 : 5,5 (Иштван). Трубки из мягкого стекла для гидролиза не пригодны, так как такое стекло выщелачивается и образовавшийся хлорид служит помехой при хроматографировании; в случае необходимости образец нужно обессолить. Более подробные сведения о гидролизе читатель найдет в следующей главе этой книги (см. стр. 466).

### НАНЕСЕНИЕ ОБРАЗЦОВ. БУМАГА

При нанесении образца на линию старта в виде точки (диаметром 7 мм) на обычных бумагах ( $80-100 \text{ г/м}^2$ ) оптимальное количество отдельных аминокислот в смеси составляет  $1-5 \text{ мкг}$ , на двумерных хроматограммах



Р и с. 171. Разделение оптических антиподов аминокислот (Котакэ и сотрудники).

Система: 1 — *l*-метил-(β-фенилизопропил)-амин — уксусная кислота — *n*-бутанол — вода (1 : 1 : 1 : 1); 2 — *l*-метил-(β-фенилизопропил)-амин — вода (4 : 1); 3 — *l*-метил-(β-фенилизопропил)-амин — уксусная кислота — *n*-бутанол — вода (1 : 1 : 2 : 6); 4 — *d*-метил-(β-фенилизопропил)-амин — уксусная кислота — *n*-бутанол — вода (1 : 1 : 1 : 1); 5 — лутидин — уксусная кислота — вода — *n*-бутанол (1 : 1 : 2 : 6).

это количество больше. В случае аминокислот, которые дают слабые пятна (например, гистидин с нингидрином), нужно наносить на бумагу большее количество. На более прочной бумаге, например на бумаге ватман 3 ( $180 \text{ г/м}^2$ ), емкость составляет до  $2 \text{ мг}$  отдельных аминокислот на  $1 \text{ см}$  ширины. Эта емкость снижается при наличии неаминокислотных примесей

и под влиянием других факторов, которые ухудшают разделение. Для длительного сохранения стандартных растворов этанол не годится, так как происходит весьма быстрая этерификация глутаминовой кислоты; более подходящим является 10—30%-ный водный раствор изопропанола. Растворимость тирозина улучшается добавлением HCl или NH<sub>3</sub>.

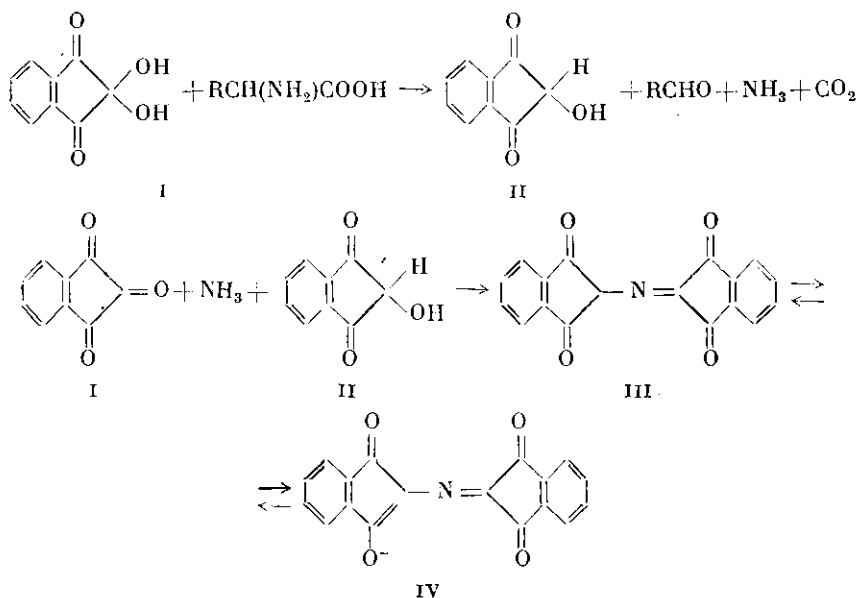
Бумага, применяемая обычно для анализа аминокислот, например ватман 1, 2, 4 и 3, а также Шлейхер — Шюль 2043 (см. стр. 100), вырабатывается из хлопкового пуха, однако можно пользоваться бумагой из древесной целлюлозы, если последняя хорошо очищена.

## ОБНАРУЖЕНИЕ

### МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ БОЛЬШОГО ЧИСЛА АМИНОКИСЛОТ

#### Нингидрин

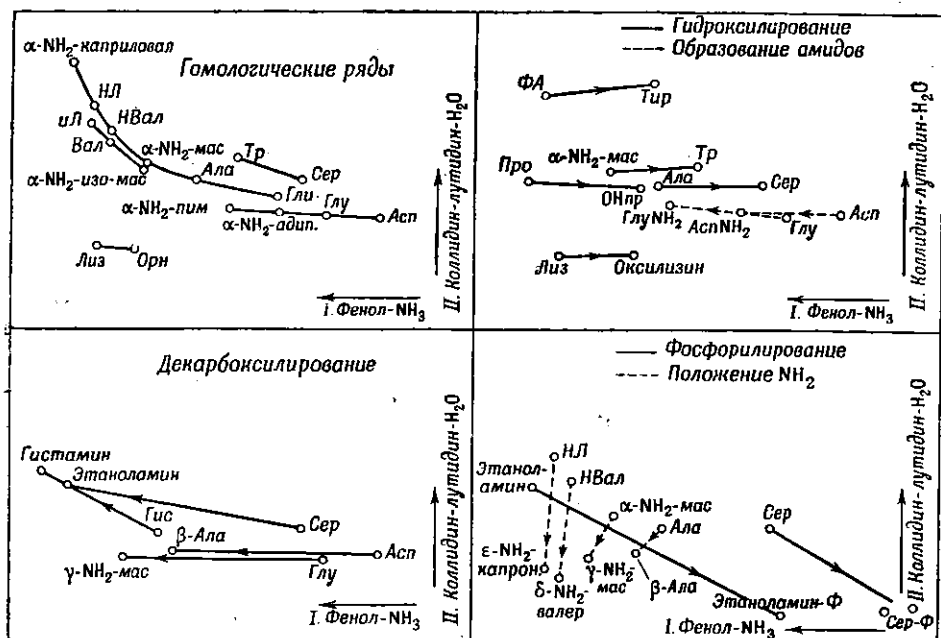
Цветная реакция аминокислот и пептидов с гидратом трикетогидриндена (нингидрином I), известная еще с 1910 г. (Рюзман), и в настоящее время остается важнейшим способом идентификации аминокислот на хроматограммах. Химизм нингидриновой реакции до сих пор подробно объяснить не удается. На первой стадии основной реакцией является реакция Штреккера — распад аминокислот с образованием углекислого газа, аммиака и альдегида, содержащего на один атом углерода меньше, чем в исходной аминокислоте.



Предполагают, что сам нингидрин при этом восстанавливается в дикетогидриндол (II), который со следующей молекулой нингидрина и выделившимся аммиаком образует анион дикетогидриндилиден-дикетогидринд-амина (IV).

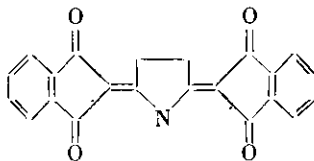
Однако этот краситель (III, IV) образуется также при действии восстановителей и аммиака на нингидрин в отсутствие аминокислот. Очевидно,

при образовании окраски аминокислоты с нингидрином эта реакция не единственна, так как, с одной стороны, реагируют и другие амины, у которых не происходит декарбоксилирование, с другой стороны, различные аминокислоты дают различное окрашивание, и, следовательно, должны возникать различные продукты. Более подробно была исследована реакция нингидрина с пролином. В результате этой реакции образуется ди-(динитрогидриндилиден)-пиррол (V) (Грассман и фон Армин) — соединение,



Р и с. 172. Зависимость между строением аминокислот и положением пятен на двумерной хроматограмме (Стьюарт и Томпсон [1]; для случая гомологических рядов дополнено по Полсону [2]).

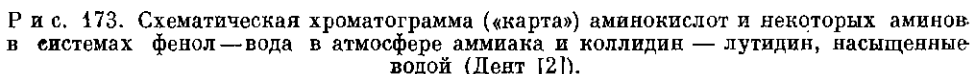
окрашенное в красный цвет, которое в дальнейшем при нагревании переходит в производное, окрашенное в желтый цвет.



V

Некоторые из образующихся красителей ведут себя как индикаторы: пары соляной кислоты окрашивают пятно в красный цвет, а при действии аммиака пятно (хотя бы временно) принимает фиолетовую или синюю окраску. Пятна, на которые действовала соляная кислота, будут малоустойчивыми. Различные неаминокислотные примеси хроматографируемого образца, а также бумага и избыток растворителя оказывают влияние на интенсивность, тон окраски и на устойчивость пятен. Поэтому необходимо (главным образом на одномерных хроматограммах) весьма тщательно

**Чувствительность.** Различные аминокислоты дают окраску различной интенсивности. Взаимная зависимость интенсивности этих окрасок меняется в зависимости от условий. Примерные данные по изменению



иАла — пятно ниже аланина, 50 — пятно, движущееся быстрее, чем аминокислотная кислота, 60 — пятно, движущееся быстрее, чем Arg, 61 — нефрозоцентид. ● обычные компоненты белковых гидролизатов, а также  $\text{AspNH}_2$  и  $\text{GluNH}_2$ , ○ остальные компоненты. Стрелками обозначено изменение положений, если заменить аммиак в атмосфере уксусной кислотой или  $\text{HCl}$ , или же в результате окисления  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

✓ **Специфичность.** Наряду с аминокислотами с нингидрином реагируют также их эфиры, пептиды, белки, первичные алифатические амины, аминоксахара, аминоспирты, лизергиновая кислота, алкалоиды спорыньи и даже N-алкиламинокислоты. Большинство других веществ реагирует слабее, чем аминокислоты. В табл. 72 указаны оттенки окрашивания, возникающего с аминокислотами. Из иминокислот пролин и оксипролин дают желтое окрашивание; желтое окрашивание дают также соединения, образующиеся

Таблица 72

РЕАКЦИЯ АМИНОКИСЛОТ И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ СОЕДИНЕНИЙ С НИНГИДРИНОМ,  
ИЗАТИНОМ И НАФТОХИНОНСУЛЬФОНАТОМ

Соединение	Нингидрин		Изагин		1,4-Нафтохинон-2-сульфонат натрия <sup>1)</sup>
	окраска а)	чувствительность б)	окраска в)	чувствительность г)	
Аланин . . . . .	ф.	0,2	тм. син.	0,2	сер. син. (з.)
β-Аланин . . . . .	син. ф. (ф., син.)	0,2			(син.)
Ала-Гли . . . . .	кр. ф.	3			(син. з.)
4-Аминопент-2-еновая кислота . . . . .	ж. → ф. е)				
Аргинин . . . . .	ф.	4	кр. ф. → син. (син. ф.)	0,5 (2)	ж. к. (св. син.)
Аспарагин . . . . .	о. (з. к.)	1			св. син.
Изоаспарагин . . . . .	син. ф. ж)				
Цитрулин . . . . .	ф.	0,5			сер.
Цистеин . . . . .	ф.		(кр. ф.)	(4)	(тм. син.)
Цистин . . . . .	ф. (сер. кр. ф.)		к. (к. сер.)	4 (5)	к. ф. (тм. син.)
Диоксифенилаланин . . . . .	к. ф.				син. сер.
Фенилаланин . . . . .	син. ф. <sup>3)</sup> (син. сер., сер. к.)	5	син. з. (син. з.)	3 (1)	сер. к. (св. з.)
Глюкозамин . . . . .	ф. к.	4	р. о.	50	
Глутамин . . . . .	ф.	2			(з. син.)
Глутатион . . . . .	син. ф.	10			(к.)
Гликокол . . . . .	кр. ф. (кр., сер.)	0,1	к. р.	3	св. сер. син. (з. син.)
Гли-Л . . . . .			р.	5	(ж. з.)
Гли-Три . . . . .			к. ф.	10	(ж. з.)
Гистамин . . . . .	к. ф. (ж. к.)	12			
Гистидин . . . . .	к. ф. (ф.)	25 б)	з. → ф. (син.)	3 (2)	к. ф. (тм. ф.)
Оксипролин . . . . .	о. (ж., к.)	1	сер. ф. (син. з.)	1 (2)	кр. (о.)
Изолейцин . . . . .	ф.	0,5	кр. ф.	0,3	сер. (св. з.)
α-Аминомасляная кислота . . . . .	ф.	0,2			сер. син. (син.)
γ-Аминомасляная кислота . . . . .	ф.				(син.)
Аспарагиновая кислота . . . . .	син. ф. (син.)	0,4	тм. син. (син.)	0,8 (5)	ф. кр. (св. син.)
Цистеиновая кислота . . . . .	син. (син. ф.)	8			
α, ε-Диаминопимелиновая кислота . . . . .	з. к. → ж и)				
Глутаминовая кислота . . . . .	ф.	0,1	з. → ф. (син. ф.)	0,5 (2)	св. сер. (з.)
Лейцин . . . . .	ф.	0,5	кр. ф. (син.)	0,5	сер. син. (з. син.)
Л-Гли, Л-Тир . . . . .			р.	5	
Лизин . . . . .	кр. ф. (ф.)	3	син. о.	1 (2)	сер. син. (св. син.)
Метионин . . . . .	ф. (сер. ф.)	1	сер. ф. (син. з.)	0,5 (2)	сер. з. (син. з.)
Метионинсульфон . . . . .	ф. (к. ф.)	5			
Метионинсульфоксид . . . . .	ф. (сер. ф.)	1			

Продолжение табл. 72

Соединение	Нингидрин		Изатин		1,4-Нафтохинон-2-сульфонат натрия <sup>а)</sup>
	окраска а)	чувствительность <sup>б)</sup>	окраска в)	чувствительность <sup>г)</sup>	
Метилгистидин . .	син. з. (сер. ф.)				
Норлейцин . . . .			син.	0,8	сер. син. (св з.)
Норвалин . . . . .			ф. син.	0,5	св. сер. син. (св. син.)
Орнитин . . . . .	ф.	3			кр. (о.)
Пролин . . . . .	ж. (син.)	1	син. (син.)	0,1 (1)	сер. син. (з.)
Серин . . . . .	ф. (к. кр. ф.)	0,3	к. ф.	5	
Таурин . . . . .	ф. (сер. ф.)	1			
Треонин . . . . .	к. ф. (сер. кр. ф.)	2	кр. к.	1	св. сер. (з.)
Триптофан . . . .	ф. (к. ф., син. сер., ж. к.)	2	о. к. (син. з.)	0,8 (1)	сер. к. (к.)
Тирозин . . . . .	к. ф. (син. сер., к.)	3	син. сер. (син. з.)	0,3 (1)	св. кр. к. (сер.)
Валин . . . . .	ф.	0,2	кр. ф.	0,2	сер. к. (син. з.)

а) Окраска на хроматограмме в феноле или смеси *n*-бутанол — уксусная кислота, бумага ватман 1, проявление *D* 112 а или *D* 112 б, 20 мин, 60°. Фиолетовый (ф.) оттенок свойственен большинству аминокислот. В скобках приводятся оттенки, которые встречаются реже.

б) Предел наблюдений в проходящем свете на двумерной хроматограмме (I — фенол, II — смесь с коллидин — лутидин) по данным Пратта и Оклэра, из на образец. Проявление опрыскиванием 0,1%-ным раствором нингидрина в бутаноле, 5 мин., 80 — 100°. В других растворах проявление гистидина является более чувствительным.

в, г) Тона окраски и границы наблюдения по Новоротко и Сарнецкой-Келлер. Реактив *D* 114 б, нагревание до 100°. Чувствительность касается точечной реакции,  $\mu\text{г}/\text{см}^2$  (в отличие от данных для нингидрина). В скобках приведены данные Сайфера и Орескеса [1] (тот же реактив, 100°),  $\mu\text{г}$  на точку.

д) Оттенки по Мютингу [1], *D* 115 а. Цветную репродукцию см. Мютинг [2]. В скобках приведены данные Гири и Нагабушанама [3], *D* 115 б.

е) Баленович и Церар.

ж) Блэк и Райт.

з) Синий тон можно усилить и стабилизировать путем опрыскивания щелочами (Пасина и Морган [2]).

и) Руланд и сотрудники.

при взаимодействии формальдегида с триптофаном, и среди них тетрагидрокарболин-3-карбоновая кислота (Корнфорт и сотрудники). Пипеколиновая кислота реагирует лишь при очень сильном нагревании хроматограммы, когда фон становится розовым. Пирролидонкарбоновая кислота (ангидрид глутаминовой кислоты) с нингидрином не взаимодействует (Эллфольк и Синг) или в крайнем случае дает слабозимую окраску. Оранжевая окраска аспарагина явилась одним из доказательств циклической структуры этого амида (Евстигнеева, Кретович и др.).

**Чистота нингидрина.** Некоторые примеси в продажных образцах нингидрина (например,  $\text{SeO}_2$ ) препятствуют реакции с аминокислотами. Как правило, достаточно такой образец перекристаллизовать, например, из воды или соляной кислоты. Надежную методику синтеза нингидрина предлагает Кейл [1].

**Способ применения.** Лучше всего образец погружать в раствор нингидрина в растворителе, в котором аминокислоты не растворяются. Однако гораздо чаще применяют опрыскивание, которое должно быть достаточно обильным, чтобы раствор проник во всю толщину бумаги, но не слишком интенсивным, чтобы не произошло вымывания пятен. Николсон предложил добавлять 0,1 % нингидрина непосредственно в протекающую фазу системы растворителей. Для фенола этот метод неприемлем. Мнение различных авторов относительно целесообразности применения этого метода весьма противоречиво.

**Температура и скорость образования окраски.** При комнатной температуре окраска возникает медленно, быстрее — при повышенной температуре, когда и сами пептиды реагируют с заметной скоростью. Для аминокислот температуру не рекомендуют поднимать выше 60° (15—30 мин); при перегревании окрашивается фон и пятна становятся менее устойчивыми. Для некоторых сортов бумаги интенсивность окраски лучше всего определять через 24 час после нагревания, когда она достигает максимума.

**Видоизменения состава проявителя.** Консен и сотрудники [2], а также многие другие авторы пользовались раствором нингидрина в бутаноле (Д 112а). Наиболее выгодным мы считаем раствор в этаноле, предложенный Патеном и Хисмом (Д 112б). Для сочетания пригоден раствор в ацетоне (Теннис и Кольб; Смит [1]; Д 112в) или в эфире; однако в недостаточно чистом ацетоне нингидрин неустойчив. Если на хроматограммах присутствуют щелочи, то необходимо добавлять уксусную кислоту (1—10 %). При добавлении фенола (Д 112г) разница в оттенке окраски различных аминокислот становится более четкой; добавка пиридина или коллидина (Д 112д) способствует образованию более интенсивного синего оттенка. Добавление некоторых неорганических солей, например солей кобальта (Уиггинс, Д 112е), меди или кадмия, меняет оттенок до красного, но повышает стойкость окраски. Открытое с помощью нингидрина пятно гомоцистеина при действии азотокислой ртути (110°) приобретает вишнево-красный оттенок в середине пятна и синий по краям (Пасика и Морган [1]).

**Стойкость окраски.** Постепенно пятна бледнеют или желтеют. «Цветомерным» изучением этих изменений занимался Рёш. Побледнение пятен можно ограничить обработкой солями некоторых металлов, как это предложили, например, Каверау и Виланд (Д 113), либо погружением бумаги в расплавленный парафин или некоторые другие вещества (Адамс и Стюарт).

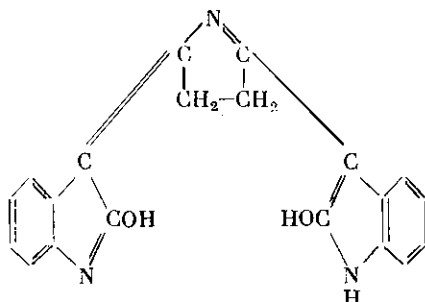
## Аллоксан

Аллоксан дает с аминокислотами реакцию, аналогичную реакции с нингидрином, но окраска получается желтой; пролин при этом не проявляется. Розенбек использовал аллоксан в качестве заменителя нингидрина. Согласно Сайферу и Орескесу [2], для некоторых аминокислот аллоксан является более чувствительным реактивом, чем нингидрин.

## Изатин

Изатин был предложен Ашэ и сотрудниками еще до открытия метода хроматографии на бумаге как специфический реактив на пролин (интенсивное синее окрашивание) и оксипролин (более слабое синевато-зеленое

окрашивание; Д 114). Согласно Грассману и фон Армину, в результате реакции образуется следующее производное:



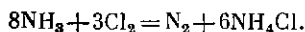
Однако в иных условиях с изатином взаимодействуют и другие аминокислоты (Сайфер и Орескес и другие авторы; Д 114). В табл. 72 приведены данные об окраске и чувствительности (Новорытко и Сарнецкая-Келлер). 5-Бромизатин обладает примерно такой же чувствительностью, но дает более яркую красную окраску. 5-Нитроизатин еще более чувствительный реактив, окраска сдвинута к фиолетовой части спектра и несколько более устойчива. Алифатические амины с изатином практически не реагируют.

#### 1,2-Нафтохинон-4-сульфонат натрия

По данным Консдена и результатам наших исследований реактив Фолина для аминокислот менее чувствителен, чем нингидрин. Тем не менее Мютинг [1] (Д 115а), а также Гири и Нагабушанам [3] (Д 115б) рекомендуют этот реактив, поскольку с аминокислотами он дает различные специфические окраски («Buntchromatographie») (см. табл. 72). Постепенно их оттенок меняется. Особенно чувствительную флуоресцентную реакцию дает, согласно Кофрани, 0,01 %-ный раствор нафтохиносulfоната натрия в метаноле; после опрыскивания бумагу нагревают в течение 1 час при температуре 60°.

#### Реакция с хлором

Райдон и Смит [1] предложили обрабатывать хроматограммы газообразным хлором; водород группы  $\text{NH}_2$  или  $\text{NH}$  замещается хлором, который связан лабильно и окисляет йодид в йод, так что после опрыскивания бумаги смесью растворов йодистого калия и крахмала появляются синие пятна (Д 7а). Особенно большое значение эта реакция имеет для азотсодержащих соединений, которые либо совсем не реагируют с нингидрином, либо реагируют слабо (пептиды, амиды, ацилированные аминокислоты, пирролидонкарбоновая кислота). К веществам, для которых эта проба является отрицательной, относится циклический тригликокол (Райдон и Смит [2]). Необходимость тщательного выветривания хлора из непрореагировавших участков бумаги является самым уязвимым местом этой неспецифической реакции. Виланд и Дозе [4] удаляют избыток хлора, вводя бумагу в атмосферу аммиака на 15—25 сек; при этом протекает следующая реакция:



Рейндель и Хоппе [1, 2] видоизменили этот метод; наряду с йодидом они вводили бензидин или *o*-толидин, которые окисляются с образованием темно-синего продукта (Д 7б).

## Индикаторы

Можно использовать буферные свойства аминокислот: Шлюйтерман и Винендаль обрабатывали хроматограммы тропеолином ОО; после действия паров соляной кислоты на красном фоне остаются желтые пятна аминокислот и других амфотерных соединений (Д 116). Этот метод пригоден главным образом для диметиламинокислоты, которая с нингидрином не реагирует. Наоборот, после блокирования аминогруппы формальдегидом аминокислоты проявляются как кислоты (Кембл и Макферсон). Ацилированные аминокислоты идентифицируются с помощью индикаторов, как обычные кислоты.

## Ароматические альдегиды

Кроме *n*-диметиламинобензальдегида, обычно применяемого для идентификации уреидоаминокислот и триптофана, другие альдегиды также дают окрашенные продукты с аминокислотами (Керзон и Гилтроу [1, 2]) (Д 108, Д 119, Д 120). Основания Шиффа, образующиеся в результате действия паров ацетальдегида (Миллетти), флуоресцируют желтым или синим цветом; при действии влаги они разлагаются.

## Флуоресценция

При сушке и главным образом при нагревании бумаги в местах, где присутствуют аминокислоты, возникают флуоресцирующие пятна (Филлипс); в некоторых случаях флуоресценция почти так же интенсивна, как и нингидриновая реакция, в других случаях флуоресценция незначительна (Войвод [2]); флуоресценция зависит, в частности, от содержания в образце примесей. Флуоресценция помогает определить местонахождение пятен, которые можно вырезать с целью препарирования или количественного анализа, если мы не желаем идентифицировать их реактивами; однако необходимо иметь в виду, что флуоресценция свидетельствует о реакции аминокислот с целлюлозой бумаги; следовательно, при нагревании будут иметь место потери (Бруш и сотрудники). Аминокислоты с заместителями при атоме азота гасят флуоресценцию самой бумаги (Гал и Гринберг).

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ

Многие реакции, рассмотренные в предыдущих разделах, можно охарактеризовать как специфичные, если мы будем обращать внимание только на интенсивность, устойчивость и оттенок окраски. В данном разделе мы рассмотрим специфичные способы проявления по группам идентифицируемых соединений.

*Гликокол* с *о*-фталевым альдегидом (свежеприготовленный 0,2 %-ный раствор в ацетоне) образует зеленое пятно, которое после облучения ультрафиолетовым светом (365 мμ) становится коричневым (Паттон и Фореман [1]); см. также Д 118.

*Серин* и *треонин*. В результате окисления оксиаминокислот периодатом образуются альдегид и аммиак, определяемый реактивом Несслера (Консен [1, 3], Д 121). Ацетальдегид, получающийся из треонина, можно идентифицировать реактивом Римини (Д 282).

*Аргинин и другие монозамещенные гуанидины.* Реакции с монозамещенными гуанидинами, к которым относится аргинин, рассмотрены выше (см. стр. 387). Важнейшей из этих реакций является реакция Сакагути с гипохлоритом или гипобромитом и  $\alpha$ -нафтолом или 8-оксихинолином (Д 104). Мы рекомендуем видоизмененную реакцию с использованием мочевины, которая медленно поглощает избыток гипобромита (Шорм и сотрудники [2], Ашэ и Кроккер [1], Д 104а); при правильном соотношении интенсивностей опрыскивания обоими растворами остается белый фон и чувствительность красного окрашивания подобна той, которая имеет место при реакции с нингидрином. Канаваин и аргинин можно идентифицировать реакцией с 1%-ным водным раствором  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_2]$  или нитропруссидом (Фирон и Белл; Смит [2]; Д 95). Смесью феррицианида и нитропрусида можно также идентифицировать  $\alpha$ -формамидиноглутаровую кислоту (Кнудсон).

*Цитруллин.* Подобно мочеvine и большинству ароматических аминов, цитруллин дает интенсивные желтые пятна с *n*-диметиламинобензальдегидом (Кирби-Берри и сотрудники [4]); мы рекомендуем методику Д 102а.

*Аминокислоты, содержащие серу.* Восстановление йода азидом цистин катализирует медленно, метионин — быстрее и цистеин — практически мгновенно (Чаргафф и сотрудники, Аве и сотрудники). Одна из модификаций реактива приведена в прописи Д 163 (по Кирби-Берри с сотрудниками [4]). Атмосфера и растворители не должны содержать сероводорода и органических соединений серы. Идентификация метионина является малочувствительной. Реакции цистеина и цистина с нитропруссидом применили для хроматографии на бумаге Вайнгард и сотрудники (Д 162а); бисульфиды реагируют только после действия цианида. Широко применяется предложенная теми же авторами реакция с йодоплатинатом (Д 84), которую мы считаем самой лучшей из всех реакций на метионин (0,1  $\mu\text{g}$  на хроматограмму). В тех местах, где находится метионин, цистеин, цистин, цистатионин, «цистеинсульфоновая» кислота, дисульфоксид цистина (желтоватое пятно), розовый фон бледнеет. В эту реакцию не вступает метионинсульфон, цистеиновая кислота и таурин. Остаток фенола на бумаге снижает чувствительность. Метионин можно также идентифицировать восстановлением щелочного раствора перманганата по Далглишу [1] (Д 36), а цистеин — восстановлением тетразолия (Д 5).

*Фенольные аминокислоты.* Тирозин дает достаточно характерный коричневый или серый оттенок окраски с нингидрином; однако иногда подходящей специфичной реакцией является реакция с реактивом Паули, дающая коричневатую-оранжевую окраску (см. раздел, посвященный гистидину). Кроме того, для идентификации использовали  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтол (Ашэ и Кроккер [1], Д 122), который дает розовую окраску, а также реактивы Фолина — Дениса и Миллона (Далглиш [3]; Д 56, Д 57). Йодированные аминокислоты будут рассмотрены отдельно (стр. 447—452).

*Пролин и оксипролин.* Обе иминокислоты дают характерные цветные реакции с нингидрином (желтую и оранжевую), с изатином (синюю и синевато-зеленую) и с 1,2-нафтохинон-4-сульфонатом (красную). Изатиновую реакцию можно с успехом использовать для количественного анализа пролина (Ашэ и сотрудники [2], Д 114). Чувствительную флуоресцентную модификацию нингидриновой реакции для анализа оксипролина описал Кларксон (Д 112в). Модификации изатиновых реакций описали Джепсон и Смит [1] (Д 114б).

*Гистидин.* Для гистидина, который дает с нингидрином относительно слабое окрашивание, обычно используют реакцию Паули, т. е. сочетание

с диазотированной сульфаниловой кислотой в щелочной среде. Наряду с гистидином красную окраску дают гистамин, диоксифенилаланин и др.; оранжевую окраску дает тирозин, желтую — аммонийные соли и другие соединения. 1-Метилгистидин в эту реакцию не вступает (Дент [2]). Вместо сульфаниловой кислоты можно, например, диазотировать *n*-хлоранилин, *n*-броманилин, *n*-анизидин (Зангер и Туппи; Д 51e). Мы рекомендуем сульфаниламид (Д 51e), предложенный Блоком. Для успешного применения этого реактива необходимо, чтобы хроматограмма не соприкасалась с фенолом. Кирби-Берри [4] идентифицировала гистидин бромом (Д 123).

*Триптофан* можно идентифицировать по поглощению в ультрафиолетовой области спектра. При реакции триптофана с нитрозными газами или азотистой кислотой возникает сначала желтая, а затем коричневая окраска, а при действии реактива Миллона (Д 57) возникает желтая окраска. Из реакций с ароматическими альдегидами наибольшее значение имеет реакция с *n*-диметиламинобензальдегидом; фиолетовый оттенок и чувствительность этой реакции напоминают реакцию аминокислоты с нингидрином. Реакцию можно усилить нагреванием, однако при слишком сильном нагревании фон желтеет, а пятно зеленеет. Методика опрыскивания приведена в прописи Д 102, а методику обработки хроматограммы погружением в раствор Смита [1] см. в Д 1026. С коричневым альдегидом триптофан и родственные соединения дают красновато-коричневую окраску; чувствительность на хроматограмму, согласно данным Виланда и Бауэра [2], составляет 5 мкг (Д 92). См. также главу, посвященную индолам (стр. 572).

*N-Алкилированные кислоты.* О проявлении моноалкиламинокислот нингидрином и о проявлении индикаторами мы уже упоминали. Для этой цели можно также использовать *n*-нитробензоилхлорид с пиридином (Платнер и Нагер).

*Медные комплексы аминокислот* можно идентифицировать 10%-ным раствором ферроцианида калия (Албанезе и Лейн) или другими специфическими реактивами на медь.

*Ферментативное разделение оптических антиподов.* Если мы опрыскаем хроматограмму ферментом, который разлагает только одну форму, и после инкубации идентифицируем оставшуюся форму нингидрином, то путем сравнения с параллельной хроматограммой, на которую не был нанесен фермент, мы можем определить оптическую конфигурацию соединения (Джонс). Для этой цели используют главным образом препараты оксидазы *d*-аминокислот из почек овцы и оксидазы *l*-аминокислот змеиного яда (Бонетти и Дент). Кетокислоты, образующиеся при действии оксидаз, можно также открыть с помощью динитрофенилгидразина (Оклэр и Паттон).

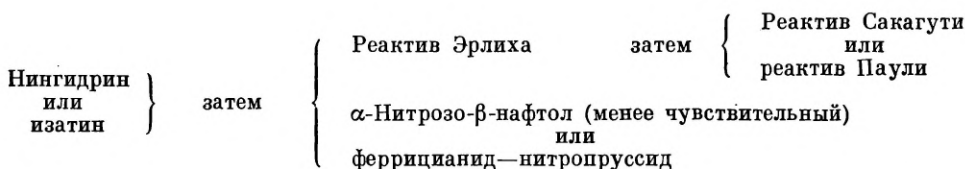
*Микробиологическое проявление* было использовано главным образом при исследовании предшественников стимуляторов роста для мутантов с отрывом одного из звеньев в цепи биосинтеза каких-либо соединений.

#### ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ НЕСКОЛЬКИМИ РЕАКТИВАМИ

На одной хроматограмме можно открывать различные типы соединений или повышать точность идентификации, если проводить несколько проявлений либо параллельно друг другу на разрезанной хроматограмме, либо каждое в отдельности. На двумерной хроматограмме возможен,

разумеется, лишь второй способ. Некоторые авторы весьма настойчиво рекомендуют поэтапное проявление несколькими реактивами. Однако этот способ требует большого опыта.

Джепсон и Смит [1] применяют следующие реактивы для погружения: нингидрин (*Д 112в*), изатин (*Д 114б*), реактив Паули (*Д 51*), реактив Эрлиха (*Д 102б*), реактив Сакагути (*Д 104в*),  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтол (*Д 122*) и феррицианид — нитропруссид (*Д 106*). Предложенные этими авторами реакции могут быть выражены следующей схемой (Смит [2]):



При диасозотечении необходимо после реактива Эрлиха, обладающего высокой кислотностью, использовать более сильные щелочи. Ряд изатин — реактив Эрлиха дает специфическую пробу на оксипролин или аллооксипролин (*Д 114в*).

После нингидрина можно идентифицировать кислоты метиловым красным, а сахара — с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты (Вудворд и Рабидо).

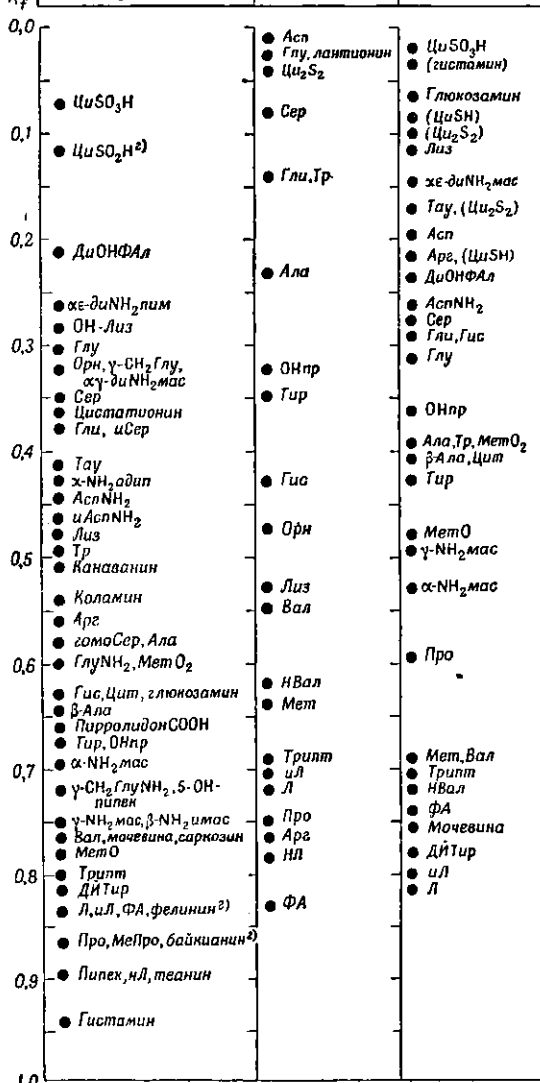
## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Вода и фенолы, спирты, низшие жирные кислоты, пиридиновые основания, а иногда и кетоны с самого начала применения хроматографии на бумаге для разделения аминокислот и до настоящего времени остаются основными составными частями систем растворителей. В литературе опубликовано несколько сот вариантов этих систем, поэтому трудно выбрать наилучшую. Особенно содержательные таблицы систем растворителей приводят Кирби-Берри и сотрудники [4], Стьюард и сотрудники [2] и Смит [2].

Вообще говоря, трудно отвергнуть целиком какую-либо из систем, поскольку даже те из них, которые обладают плохими разделяющими свойствами, могут иметь значение для подтверждения идентичности соединений по хроматографическому поведению последних во многих из этих систем. Данные таблиц и диаграмм, приведенных ниже, служат лишь указателем для предварительной идентификации; при работе нельзя обходиться без стандартных образцов. Пятна на двумерных хроматограммах остаются, как правило, достаточно типичными даже при небольших отклонениях от условий, в которых проводят эксперимент (температура, насыщение атмосферы, сорт и партия бумаги, чистота растворителей, длительность хранения смеси растворителей), тогда как на одномерных хроматограммах эти факторы вызывают изменение порядка пятен, что может привести к ошибке. Тем, кто начинает применять метод хроматографии на бумаге для анализа аминокислот, мы рекомендуем в первую очередь ознакомиться с двумерным хроматографированием и только после этого использовать при серийном исследовании большого числа образцов одномерную технику.

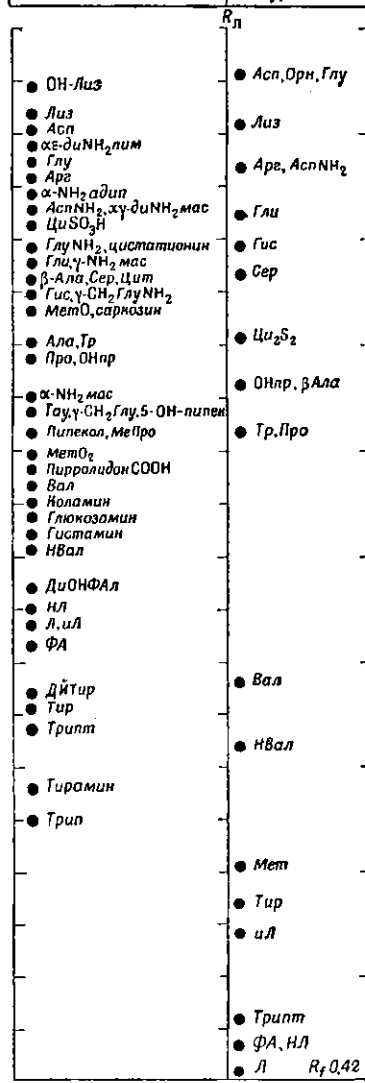
### АМИНОКИСЛОТЫ В СИСТЕМАХ, СОДЕРЖАЩИХ ФЕНОЛ ИЛИ ОРГАНИЧЕСКУЮ КИСЛОТУ<sup>a)</sup>

Фенол, насыщенный водой	м-Крезол Вода Нитрон (следы) (атм. 0,1% NH <sub>3</sub> )	Изомасляная кислота Вода (восходящая)
Р. Стьюард и сотрудники [2], 61, а)	Конденс и сотрудники [21] в)	Кирби-Берри и сотрудники [4] в)



# АМИНОКИСЛОТЫ В СИСТЕМАХ, СОДЕРЖАЩИХ ПИРИДИНОВЫЕ ОСНОВАНИЯ

Коллидин 1 2,6-Лутидин 3 (насыщено водой)	Амиловый спирт 35 (171-172°) Пиридин 35 Вода 30
Стьюард и сотрудники (2) <sup>ж)</sup>	Сен, Бурма <sup>з)</sup>



а) Значения  $R_f$  в системе фенол— $\text{NH}_3$  (которую применяют чаще всего) можно вычислить на основании двумерных хроматограмм (рис. 173, 174, 177). См. также табл. 76.

б) Аминокислоты основного характера и амины дают грязные полосы, данные о величине  $R_f$  лишь приблизительные.

В) Литературные данные о положении некоторых аминокислот, содержащих серу, весьма противоречивы (дангионин, цистин, таурин). (См. стр. 419.)

## ТИПЫ СИСТЕМ ДЛЯ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

**Фенолы и кислоты в качестве подвижной фазы**  
(табл. 73)

Несмотря на некоторые недостатки, фенол относится к наиболее часто применяемым растворителям, так как он особенно хорошо разделяет цистеиновую, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, которые в большинстве остальных систем могут частично перекрываться другими аминокислотами.

Небольшие количества солей в образце допустимы, и только соли кальция, как указывают Кацл и Ледвина, могут способствовать образованию сдвоенного пятна аспарагиновой и глутаминовой кислот. В феноле, содержащем аммиак, или на бумаге, очищенной щелочью (рис. 174), аминокислоты основного характера вместе с соединениями, имеющими длинную алифатическую цепочку, собираются вблизи линии фронта; хорошо разделяются серин, гликокол, треонин и аланин. Лишь в отдельных случаях пятна глутаминовой кислоты и серина могут сближаться настолько, что сливаются. Наоборот, добавка уксусной или соляной кислот несколько уменьшает скорость передвижения аминокислот основного характера и аминов. Недостаток фенола заключается в том, что при его применении происходит быстрое потемнение пятен, особенно в щелочной среде и в присутствии некоторых катионов, содержащихся в бумаге, например железа (см. рис. 78). Потемнение можно предотвратить действием каталитических ядов или комплексобразующих реактивов: HCN или CO (в атмосфере камеры), купрон, 8-оксихинолин, комплексоны и др. Как правило, можно пользоваться обычным продажным химически чистым фенолом; иногда его необходимо очистить перегонкой (с применением воздушного холодильника). Методика тщательной очистки фенола приведена в прописи II 71. При понижении окружающей температуры может произойти выделение воды из смеси, что приводит к различным нарушениям. Поэтому рекомендуют применять фенол, не очень насыщенный водой (80—90 вес. %). Некоторые авторы для ослабления диффузии добавляют в фенол соли (II 72).

По сравнению с фенолом в крезолах уменьшаются и сближаются между собой значения  $R_f$  кислых аминокислот, однако лучше разделяются соединения с высоким значением  $R_f$ . Иногда рекомендуют применять 80%-ную масляную или изомасляную кислоты, так как они не образуют являющийся помехой цветной фронт. О добавках органических кислот к спиртовым растворителям будет сказано ниже.

<sup>г)</sup> Интерполировано по Смиту [2].

<sup>а)</sup> При замене *m*-крезола на *o*-крезол величина  $R_f$  большинства аминокислот уменьшается, а при замене *m*-крезола на *p*-крезол — увеличивается.

<sup>б)</sup> Конден и сотрудники [2] приводят для нисходящего хроматографирования с использованием изомасляной кислоты (насыщенной водой) более высокие значения  $R_f$ , за исключением лейцина и изолейцина. Порядок аналогичен порядку, приведенному в данной таблице, лишь аргинин, гистидин и фенилаланин обладают относительно большей скоростью. Величины  $R_f$  аминокислот основного характера, аминов, цистеина и цистина мало различаются (грязные полосы).

<sup>ж)</sup> См. также у Кондена и сотрудников [2] (технический коллидин), Дента [2] (рис. 173), Кирби-Берри и сотрудников [4] (65%-ный 2,6-лутидин). Во взаимной связи фенилаланина и тирозина, так же как и глутамина и гликокола, существуют различия.

<sup>з)</sup> В этой системе Эдман дает на шведской бумаге другие значения главным образом для цистина, тирозина, лейцина и фенилаланина; Хейнс и Андерс приводят в большинстве случаев более низкие значения  $R_f$ .

Таблица 75

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В СИСТЕМАХ, СОДЕРЖАЩИХ  
СПИРТЫ И ВОДУ

2-Бутанол 3 NH <sub>3</sub> (3%-ный) I	трет-Амиловый спирт, насыщенный водой (14-21 день)	бензиловый спирт, насыщенный водой	н-Бутанол 4 Этанол I Вода I	н-Бутанол 9 Уксусная кислота I Вода I
Роланд; Гросс а)	Миеттинен, Виртанен б)	Консен и сотрудники (2) в)	Кирби-Берри и сотрудники [4] 2)	Стьюард и сотрудники [2] 2)
R <sub>ФА</sub>	R <sub>Л</sub>	R <sub>ФА</sub>	R <sub>ДЙТИР</sub>	R <sub>Г</sub>
0,0	● Арг, Лиз, Орн, Асп, Цис S <sub>2</sub>	● Орн, Лиз, Асп, Глу, Ламт ● Сер, Арг, Цис S <sub>2</sub> ● Гли, Тр, Гис ● Ала	● Цис SO <sub>3</sub> H ● Цис S <sub>2</sub> ● Арг, Асп, Глу, Лиз ● Орн, α-γ-диNH <sub>2</sub> мас ● АспNH <sub>2</sub>	● Цис SO <sub>3</sub> H, αε-диNH <sub>2</sub> пим ● Лиз, Орн, Лиз ● АспNH <sub>2</sub> , Орн, αγ-диNH <sub>2</sub> мас ● Асп, Гис, Арг, канаванин ● ГлуNH <sub>2</sub> , Цит
0,1	● Асп, Глу, Цис S <sub>2</sub> ● Лиз ● Арг	● Глу ● Гис	● Глу, Цит ● β-Ала, ОНпр ● Гли, Сер ● МетO, γ-NH <sub>2</sub> мас ● Тау ● МетO <sub>2</sub> ● Тр ● ДиОНФАЛ, глюкозамин	● Глу, МетO, и АспNH <sub>2</sub> , гистамин ● Сер ● Гли, Тау, глюкозамин, α-NH <sub>2</sub> -адип?, 5-ОНпипек? ● ОНпр, гомоСер
0,2	● Гли, Сер ● Тр, Гис	● Гли ● Сер ● Тр	● Тр ● ДиОНФАЛ, глюкозамин	● Тр, и ГлуNH <sub>2</sub> , ДиОНФАЛ, β-Ала, саркозин
0,3	● Ала	● ОНпр ● Ала	● Вал ● НВал, Про	● Ала
0,4	● Про	● Про	● Тир	● Про
0,5	● Тир	● Тир	● Мет ● иЛ	● γ-NH <sub>2</sub> мас, γ-метГлу, Тир ● α-NH <sub>2</sub> мас ● β-NH <sub>2</sub> мас, δ-ОНЛ ● Гванин ● γ-ОНЛ ● Байкианин
0,6	● Вал	● Трилиз	● Вал, Мет, Трипт ● ФА	● β-NH <sub>2</sub> имас ● Липекол ● Трипт? ● Коламин ● Вал
0,7	● Мет	● Вал	● Л	● НВал, МетПро, тирамин?, гуанидиномас ● МетO <sub>2</sub> ?, δ-NH <sub>2</sub> Валер
0,8	● иЛ	● Мет ● ФА	● НЛ	● ФА
0,9	● Л	● иЛ	● α-NH <sub>2</sub> мас? ● Л, НВал ● иЛ?	● ЛNH <sub>2</sub> ● ПирролидонCOOH
1,0	● ФА	● Л	● Мочевина	● Л ● НЛ ● иЛ?, ДЙТир ● Трип
R <sub>Г</sub> 0,3	R <sub>Л</sub> 0,36	R <sub>ФА</sub> 0,36	R <sub>ДЙТИР</sub> 0,54	R <sub>Г</sub> 0,4

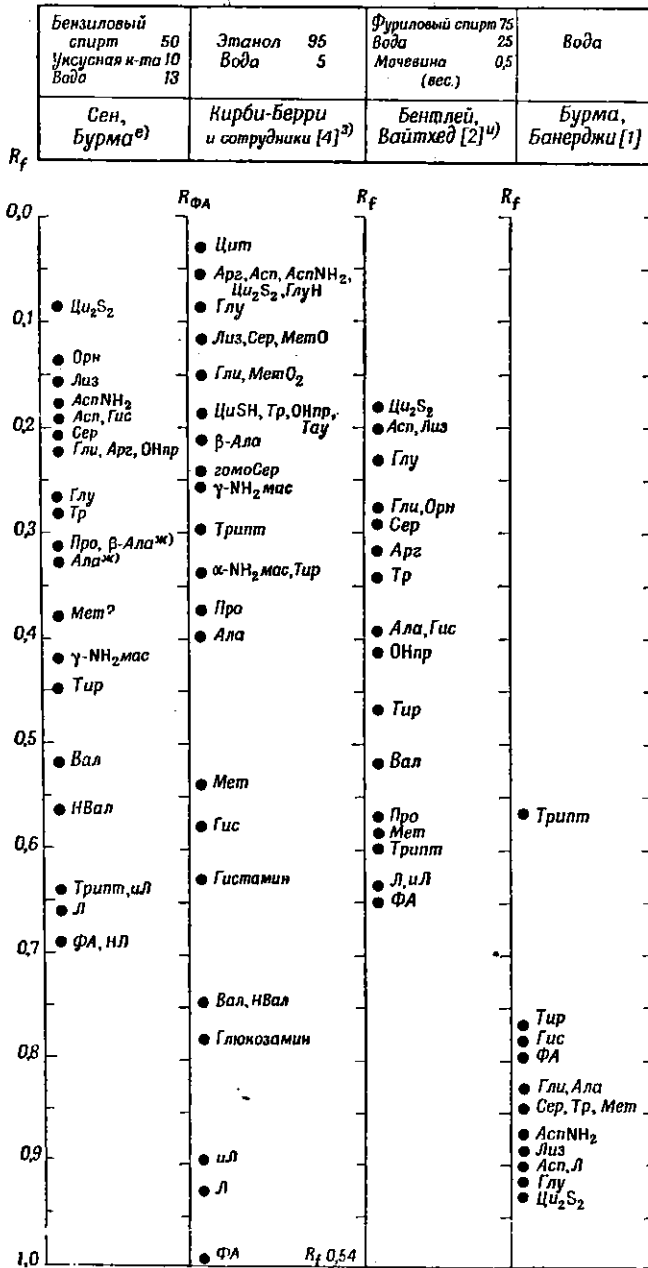
а) Согласно данным Консена и сотр. [2], подобный порядок имеет место в системе н-бутанол, насыщенный Н<sub>2</sub>O (атмосфера камеры содержит 3% NH<sub>3</sub>); НВал и НЛ имеют более высокое значение R<sub>Г</sub>, нежели их разветвленные изомеры. Миеттинен и Виртанен приводят более низкое значение R<sub>Г</sub> для ФА, чем для иЛ, при хроматографировании в н-бутаноле, насыщенном Н<sub>2</sub>O. (См. стр. 421).

б) Консен и сотр. [2] приводят для ФА такую же величину R<sub>Г</sub>, как и для Л, для НЛ выше, чем для Л, а для Тир и НВал выше, чем для Вал.

в) Миеттинен и Виртанен в той же системе приводят величину R<sub>Г</sub> для Тир меньшую, чем для Вал.

г) Данные, относящиеся к α-аминомасляной кислоте и иЛ, очевидно, ошибочны.

Продолжение табл. 75



<sup>а)</sup> Данные, отмеченные вопросительным знаком, мы считаем не очень точными. Положение пятен в применяющейся чаще смеси Партриджа (4 : 1 : 5) можно определить на схематической двумерной хроматограмме (рис. 174), а после повторного хроматографирования — на рис. 182 (см. стр. 422). обширный материал опубликовали Смит [2] (60 : 15 : 25) и Кирби-Берри с сотр. [4] (4 : 1 : 1).

<sup>е)</sup> Бурма и Банерджи [2] приводят несколько иное значение  $R_f$ ; Мет между Вал и НВал.

<sup>ж)</sup> В данных, относящихся к β-Ала и Ала, очевидно, допущена ошибка.

<sup>з)</sup> Для Ала и аминокислот, очевидно, приведен ошибочный порядок величин  $R_f$ . Довольно распространенными являются системы, содержащие 70 % n-пропанола (величины  $R_f$  см. у Бентлея и Вайтхеда [2]), изопропанола (величины  $R_f$  см. у Бурмы и Банерджи [2]), трет-бутанола (величины  $R_f$  см. у Иргенсона). Литературные данные, касающиеся этих систем, разноречивы.

<sup>и)</sup> При добавлении 8 % пиридина вместо мочевины величина  $R_f$  уменьшается. Для Арг и Лиз это уменьшение не столь существенно.

### Щелочная подвижная фаза (табл. 74)

Консен и сотрудники [2], разработавшие метод распределительной хроматографии, впервые использовали технический коллидин. Позднее было установлено, что чистый *симм*-коллидин менее выгоден, чем, например, его смесь с лутидином (2,4- или 2,5-диметилпиридином) (Дент [2]). Кроме того, использовались различные другие смеси пиридиновых оснований, а также смеси с хинолином (Самарина и сотрудники; пиколин — хинолин — вода, 65 : 10 : 25) или различными алкалоидами; хорошее разделение обеспечивает, например, смесь Эдмана: пиридин — амиловый спирт — вода (35 : 35 : 30 или 40 : 40 : 15). Из щелочных систем, приведенных Кирби-Берри и сотрудниками [4], многие относятся к группе растворителей, смешивающихся с водой. К ним, например, принадлежит система *n*-бутанол — пиридин — вода (5 : 5 : 2 или 1 : 4 : 1). Применяя 80%-ный пиридин и приливая *n*-бутанол к этой смеси, можно изменять абсолютное значение  $R_f$  в широких интервалах (Кейл, частное сообщение). К использованию щелочных органических систем (особенно для двумерной хроматографии) авторы пришли, стремясь заменить фенол щелочным растворителем. Многие другие смеси, например бутанол с уксусной кислотой, обладают сходными разделяющими свойствами и не имеют такого неприятного запаха, как пиридин.

### Спирты и кетоны (табл. 75)

Бутанол и бензиловый спирт, а также их смесь использовали еще Консен и сотрудники [2]; значения  $R_f$  при этом получаются довольно низкими, однако если не препятствовать перетеканию растворителя (Миеггинен и Виртанен [1]), то можно обеспечить довольно хорошее разделение аминокислот с более высоким значением  $R_f$  (пролин, тирозин, валин, метионин, триптофан, фенилаланин, лейцин, изолейцин, нор-лейцин).

Часто используют систему *n*-бутанол с этанолом или метанолом, еще чаще — смеси *n*-бутанола с муравьиной, уксусной или пропионовой кислотами. Разделение аминокислот в смеси *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10) приведено на рис. 181 и 184. Из аминокислот, которые там не обозначены, цитруллин дает пятно ниже глутамина, а пролин — пятно выше аланина. Рекомендуют также систему 2-бутанол — муравьиная кислота — вода (5 : 3 : 2) по Хорнеру и Швану. *n*-Бутанол с уксусной кислотой и водой используют в настоящее время для разделения аминокислот чаще, чем все остальные системы, и главным образом в двумерной технике хроматографирования. Чаще всего эта смесь берется в соотношении 4 : 1 : 5 (смесь Партриджа [1]); для экономии бутанола это соотношение можно заменить соотношением 144 : 13 : 43 (Микеш и Томашек, частное сообщение). Кейл [2] достиг более полного разделения повторным хроматографированием (рис. 182). *n*-Бутанол с пропионовой кислотой можно с успехом применять для одновременного анализа аминокислот, сахаров и органических кислот (см. рис. 105 и 133).

Довольно часто применяется метилэтилкетон в различных комбинациях, например с пиридином и водой (70 : 15 : 15) по Виланду и Бауэру [2], для разделения валина, метионина, изолейцина и лейцина (триптофан, фенилаланин и тирозин не обнаруживали) или с *трет*-бутанолом и водой (2 : 2 : 1) по Буассона [2].

Еще основоположники метода распределительной хроматографии на бумаге (Консен и сотрудники [2]) указывали, что можно использовать растворители, полностью смешивающиеся с водой, однако при этом получаются слишком высокие значения  $R_f$  или возникают расплывчатые пятна. Позднее было показано, что при оптимальном содержании воды разделение происходит очень хорошо; однако камера должна быть тщательно герметизована.

Несколько работ посвящено изучению зависимости величин  $R_f$  от содержания воды в растворителе; некоторые результаты этих работ воспроизводятся на рис. 166. При более высокой концентрации воды получаются высокие и близкие друг к другу значения  $R_f$  (однако не равные единице) даже для сильно адсорбирующихся циклических аминокислот, например триптофана. При слишком низких концентрациях воды значение  $R_f$  получается низким и происходит плохое разделение. Между двумя крайними значениями располагается область оптимальных концентраций. Порядок передвижения большинства аминокислот с изменением содержания воды не меняется; фенилаланин и триптофан при малом содержании воды в растворителе относятся к более быстрым аминокислотам, поскольку они в этом случае передвигаются быстрее. Кривые для триптофана и гистидина или пролина и фенилаланина перекрещиваются при применении метанола уже при низких концентрациях воды, а при применении изопропанола — и при более высоких концентрациях (Йиргенсонс). Вопросу адсорбции и распределения при хроматографировании в системах с различным содержанием воды посвятили свою работу Синг и Тизелиус [2] (см. также стр. 75). Рокланд и сотрудники [1] исследовали зависимость диффузности (относительной длины пятна) от содержания воды в пропаноле.

Из спиртов применялся метанол, этанол, *n*-пропанол, изопропанол, *трет*-бутанол, фуриловый спирт, тетрагидрофуриловый спирт, моноэфиры этиленгликоля (от метилового до пропилового), из кетонов — ацетон, из азотистых оснований — пиридин и его низшие гомологи. Для достижения хорошего разделения в метаноле должно содержаться 5% воды, в изопропанолe — 30% (по литературным данным; по данным авторов — меньше 30%). При применении фурилового спирта рекомендуют добавлять мочевины или пиридин (Бентлей [1]).

#### Хроматография на пропитанных бумагах (табл. 76)

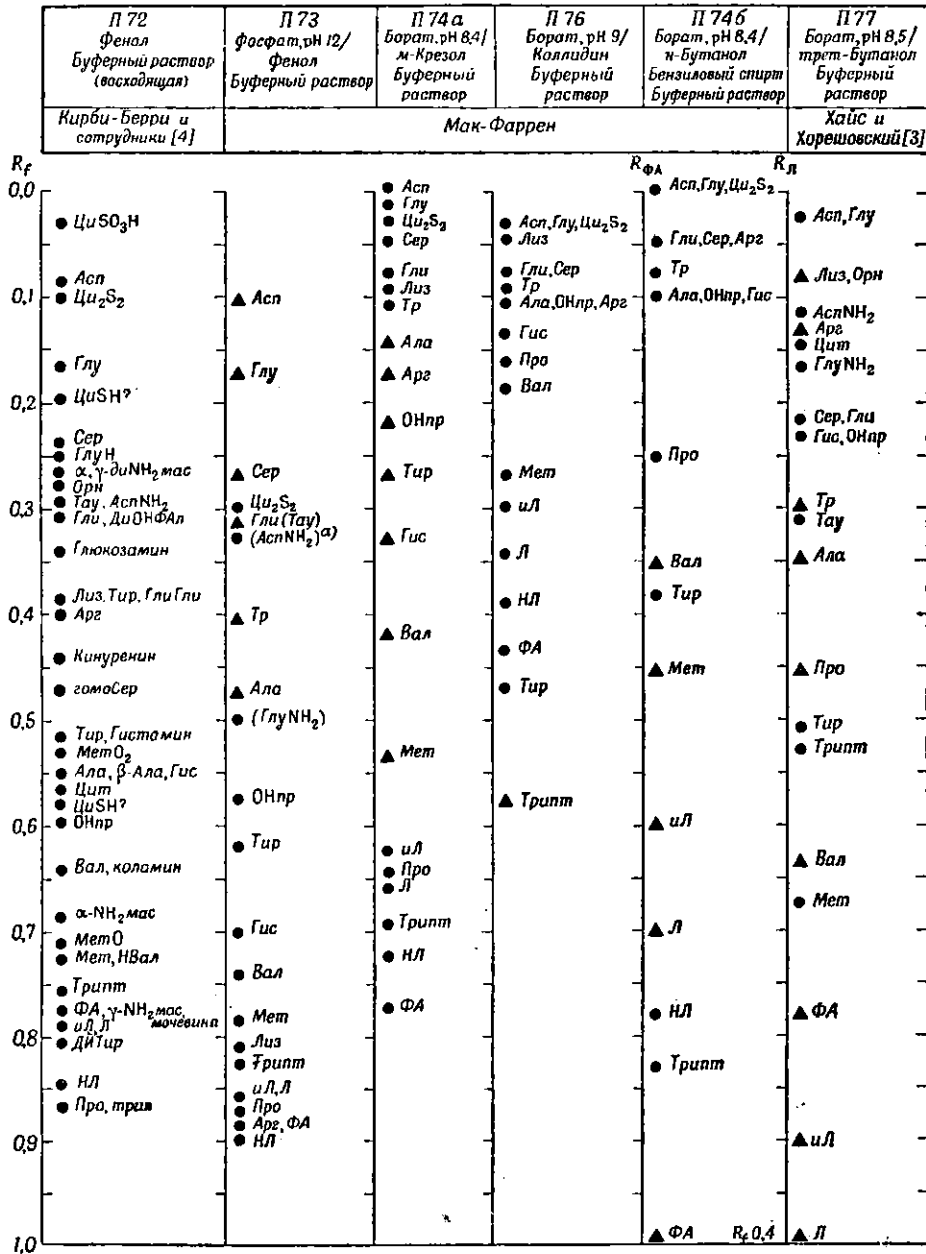
На рис. 168 показано, что pH образца влияет на величину  $R_f$  и качество разделения. Сплошной чертой обозначены нижняя и верхняя границы пятна, а пунктирной — центр тяжести пятна. Одно из благоприятных следствий пропитывания бумаги буферным раствором состоит в том, что происходит уменьшение скорости передвижения вещества по бумаге. Кроме того, подбирая pH, можно регулировать величину  $R_f$  таким образом, чтобы пятна отделялись друг от друга как можно лучше. Согласно Мак-Фаррену, на пропитанных буферным раствором бумагах величина  $R_f$  аминокислот воспроизводится со средним отклонением около 0,01, если обеспечено полное насыщение камеры и постоянная температура. Молярность буферного раствора и химический характер соли не влияют на величину  $R_f$ .

Влияние pH на разделение аминокислот показано на рис. 167. Некоторые методики приведены в прописях П 73 и П 77. Согласно нашим данным, особенно выгодно применять системы фенол — буферный раствор

Таблица 76

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В СИСТЕМАХ, СОДЕРЖАЩИХ  
БУФЕРНЫЙ РАСТВОР

(бумага ватман 1; 22°; обычные аминокислоты, которые хорошо разделяются  
в данной системе, обозначены ▲)



а) Данные, приведенные в скобках, интерполированы в соответствии с нашими исследованиями.

с рН 12 (П 73) и *трет*-бутанол — буферный раствор с рН 8,5 (П 77; Хайс и Хорешовский [31]); первая из них хорошо разделяет цистеинсульфоновую кислоту, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, серин, гликокол, треонин и аланин от остальных обычных свободных аминокислот, тогда как вторая при длительном проявлении (приблизительно неделя) отделяет лейцин, изолейцин, фенилаланин, валин, тирозин, пролин, аланин, треонин, аргинин и лизин от остальных (за исключением метионина, триптофана, оксипролина и гистидина). Аспарагин мешает в первой системе определению гликокола, а во второй — лизина; глутамин в первой системе передвигается вместе с аланином, а во второй — вместе с аргинином.

### ОБМЕННАЯ И ВЫСАЛИВАЮЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Виланд и Берг [3] изучали также хроматографию, основанную на принципе обмена катионов; они разделяли гистидин, лизин и аргинин на карбоксицеллюлозе (1%  $\text{COOH}$ ), используя 0,05 *М* муравьинокислый аммоний, насыщенный при рН 8–10 (рис. 169) (см. стр. 405). Остальные аминокислоты в этих условиях перемещались с фронтом растворителя.

Высаливающая хроматография дает в гомологических рядах обратный порядок пятен по сравнению с распределительной хроматографией, и поэтому, согласно Хагдалю и Тизелиусу, а также Афанасьеву и Талмуду, она может быть использована в качестве дополнения к обычным хроматографическим системам (рис. 170). Хагдаль и Тизелиус отметили, что на хроматограмме устанавливается градиент концентрации с максимумом у линии фронта; согласно нашим исследованиям, оказалось, что для достижения этого градиента влажность атмосферы камеры должна быть ниже той, которая соответствует равновесию с подвижной фазой.

### ОДНОМЕРНЫЕ СИСТЕМЫ, ПРЕДЛОЖЕННЫЕ ДЛЯ АНАЛИЗА СМЕСИ БОЛЬШОГО ЧИСЛА АМИНОКИСЛОТ

Ни одна из известных систем растворителей не способна полностью разделять обычные аминокислоты, однако многие системы позволяют идентифицировать большое число соединений при совместном их присутствии, что особенно ценно при проведении некоторых количественных или серийных анализов, для которых двумерная хроматография пригодна в меньшей степени. О системах фенол — буферный раствор с рН 12, *трет*-бутанол — буферный раствор с рН 8,4 и о повторном хроматографировании в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода мы уже упоминали. Приведем еще некоторые системы, имеющие практическое значение:

*n*-бутанол или 2-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10) (многие авторы);

2-бутанол — 3%-ный  $\text{NH}_3$  (3 : 1) (Роланд и Гросс и др.);

70%-ный *n*-пропанол или изопропанол (многие авторы);

изопропанол — уксусная кислота — вода (70 : 20 : 10) (Деккер и сотрудники);

бутанон — пропионовая кислота — вода (75 : 25 : 30) (Клейтон и Стронг).

### СИСТЕМЫ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕКОТОРЫХ ГРУПП АМИНОКИСЛОТ

*Отделение оптических антиподов.* *d*- и *l*-формы кинуренина, 3-окскинуренина, 2,3-, 2,4-, 2,5- и 3,5-диоксифенилаланина и 3,4-диокси-2-метилфенилаланина отличаются значениями  $R_f$  на величину до 0,1 в системе бутанол — уксусная кислота — вода, где компоненты могут быть взяты в различных соотношениях (Далглиш [1, 2]; Лэмбуй). Считают, что в этих случаях, помимо двух полярных групп ( $\text{NH}_2$  и  $\text{COOH}$ ), находящихся в выгодном отдалении в боковой цепочке, в *орто*-положении бензольного ядра имеется еще необходимый заместитель. *d*-Изомер кинуренина связывается более прочно на поверхности целлюлозы, нежели *l*-изомер (Далглиш [2]).

Берлингоцци и сотрудники с целью разделения антиподов изучали различные системы растворителей, содержащие оптически активные кислоты. Рекомендуются условия для разделения фенилгликокола и фенилаланина приведены в прописи II 78. Заслуживает внимания поведение  $\alpha, \epsilon$ -диаминопимелиновой кислоты (Руланд и сотрудники) в системах с органическими растворителями основного характера, например в смеси метанол — вода — 10 н. соляная кислота — пиридин (80 : 17,5 : 2,5 : 10) форма *ll* имеет более высокое значение  $R_f$ , нежели форма *dd* или *мезо*. В 70%-ном метаноле *d*-гистидин имеет значение  $R_f$ , приблизительно в два раза меньшее, чем его антипод (Вейхерт). Расщепление антиподов тирозин-3-сульфоновой кислоты см. на рис. 171 (см. стр. 406).

*Аминокислоты, реагирующие с реактивом Паули.* Подходящей системой является, например, *n*-бутанол с уксусной кислотой или изопропанол с аммиаком и водой (10 : 1 : 1). Гистидин разлагается во многих системах, и в особенности на бумаге, пропитанной щелочным буферным раствором. Разделение изомерных диоксифенилаланинов описывает Лэмбуй, а также Соуркес и сотрудники.

*Основные аминокислоты.* Так же как и у аминов, значения  $R_f$  аминокислот основного характера увеличиваются при наличии аммиака в атмосфере или при пропитывании бумаги щелочным буферным раствором (Хайс и Хорешовский [3], Мак-Фаррен) и уменьшаются при подкислении. Мак-Фаррен рекомендует применять для разделения аминокислот основного характера лутидин, насыщенный 0,022 *M* фосфатным буфером с pH 6,2 (см. также рис. 181 и 182). Для изучения действия дегидрогеназы на лизин Буланже и Остё [4] выбрали смесь фенол — изопропанол — муравьиная кислота — вода (85 : 5 : 10 : 100).

*Кислые аминокислоты (цистеиновая, цистеинсульфиновая, аспарагиновая и глутаминовая).* В данном случае наиболее пригодна фенольная система (с аммиаком или буферным раствором с pH 12). Для отделения глутаминовой кислоты от  $\alpha$ -аминоадипиновой была использована специальная система растворителей: масляная кислота — изовалериановая кислота — вода (45 : 45 : 10; Бергстрём и Пээбо). Изомерные  $\epsilon$ -метилглутаминовые кислоты имеют в феноле следующий порядок величин  $R_f$ : глутаминовая кислота <  $\alpha$ -метилглутаминовая <  $\beta$ -метилглутаминовая <  $\gamma$ -метилглутаминовая (Смрт и Шорм).

*Лейцины и фенилаланин.* Разделение этой группы вызывает затруднения, поскольку в большинстве систем растворителей по крайней мере две аминокислоты взаимно перекрывают друг друга, причем изолейцин, имеющий такую же или меньшую величину  $R_f$  по сравнению с лейцином и фенилаланином, располагается по отношению к ним в различных положе-

ниях. С большим или меньшим успехом можно применять бутанол, насыщенный водой, *трет*-амиловый спирт, насыщенный водой, в атмосфере аммиака или диэтиламина (Уорк), крезолы с аммиаком, смесь пиридин — изоамиловый спирт — вода (35 : 35 : 30). Здесь также важную роль играет сорт бумаги. Система *трет*-бутанол — буферный раствор с рН 8,5 (П 77) разделяет фенилаланин, изолейцин и лейцин на бумаге ватман 1 очень полно (рис. 180). Заметное снижение величины  $R_f$  у изолейцина по сравнению с лейцином в системах, содержащих третичные спирты, вероятно, обусловлено пространственными затруднениями, состоящими в сближении аминогруппы с гидроксильной группой спирта.

**Метионин.** Валин и метионин, имеющие близкие значения  $R_f$  в системах, содержащих бутанол и уксусную или муравьиную кислоту, а также во многих других системах, лучше всего удается разделить в системах с бензиловым спиртом или пиридиновыми основаниями, где метионин имеет более высокое значение  $R_f$ . Неблагоприятно влияет на разделение окисление метионина при хроматографировании; последнее можно ограничить, если очистить бутанол небольшим количеством натрия, а затем перегнать. Чаргафф и сотрудники использовали для разделения цистина и метионина изомасляную кислоту.

Представляет интерес влияние степени окисления метионина (и этионина) на величину  $R_f$  в различных системах растворителей. В системе бутанол — уксусная кислота:  $\text{Мет} > \text{МетО}_2 > \text{МетО}$ ; в системах с пиридиновыми основаниями:  $\text{Мет} > \text{МетО}_2 > \text{МетО}$ ; в феноле:  $\text{Мет} > \text{МетО} > \text{МетО}_2$ .

**Цистеин и цистин** самопроизвольно окисляются кислородом воздуха с образованием сложной смеси, поэтому, как правило, их предварительно переводят в цистеиновую кислоту (см. стр. 432). Кроме того, цистеин может давать с другими сульфгидрильными соединениями, присутствующими в образце, смешанные бисульфиды и таким образом усложнять хроматограмму (Ливермор и Мюкке). Согласно Рокланду и Ундервуду [2], оказывает влияние сорт бумаги: на бумаге ватман цистеин, гомоцистеин и глутатион открыть не удавалось, на бумаге Шлейхер — Шульц 589 (синяя полоска) это возможно.

Цистеин можно анализировать в системе, содержащей N-этилмалеинимид (Хейнс и сотрудники), или добавлять к анализируемому образцу 0,05 M раствор N-этилмалеинимида (Смит и Таллер). Чантрен, однако, наблюдал, что N-этилмалеинимид дает с различными тиолами соединения, которые реагируют с нингидрином и могут быть ошибочно приняты за аминокислоты.

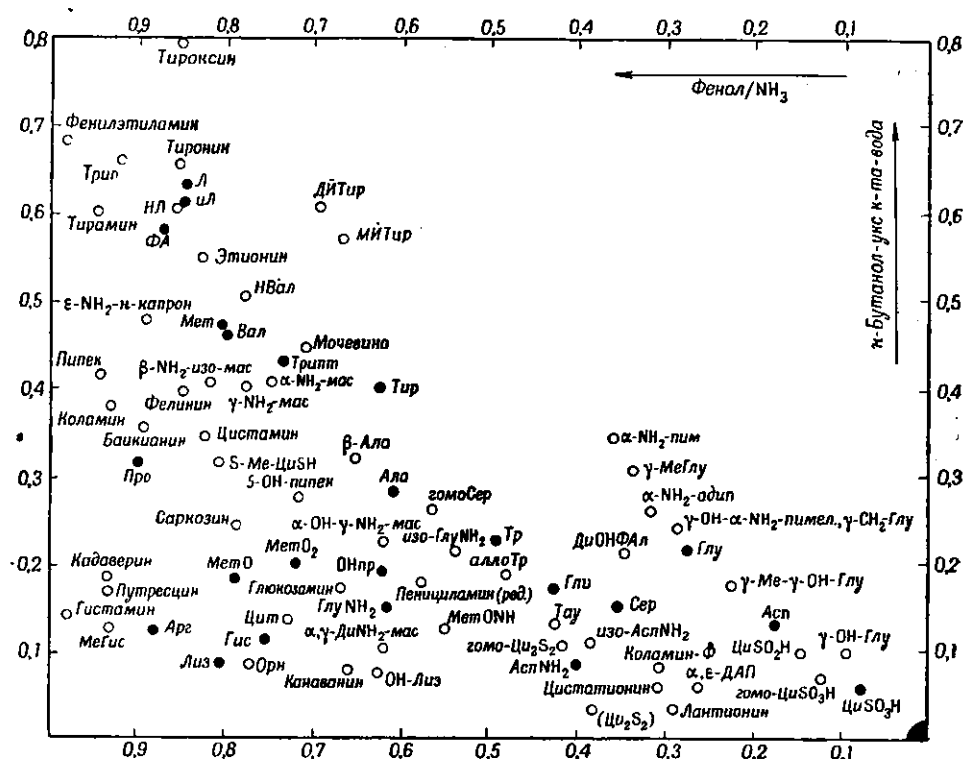
**Триптофан.** Эта аминокислота из-за менее интенсивной реакции с нингидрином идентифицируется на хроматограмме с большим трудом.

Для специфического проявления *n*-диметиламинобензальдегидом могут служить различные системы, например бутанол — уксусная кислота — вода. Виланд и Бауэр [2] хроматографируют триптофан (для проявления коричневым альдегидом) в 0,02 M соляной кислоте; триптофан движется более медленно по сравнению с остальными аминокислотами. В системе растворителей, содержащей формальдегид, образуется (неколичественно) продукт конденсации, который продвигается быстрее и дает при реакции с нингидрином желтую окраску (Корнфорт и сотрудники).

**$\alpha$ - и  $\omega$ -Аминокислоты.** Для  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, точно так же как и для других  $\omega$ -аминокислот (Рид), характерны более низкие значения  $R_f$ , чем у соответствующих  $\alpha$ -аминокислот в нейтральных спиртовых

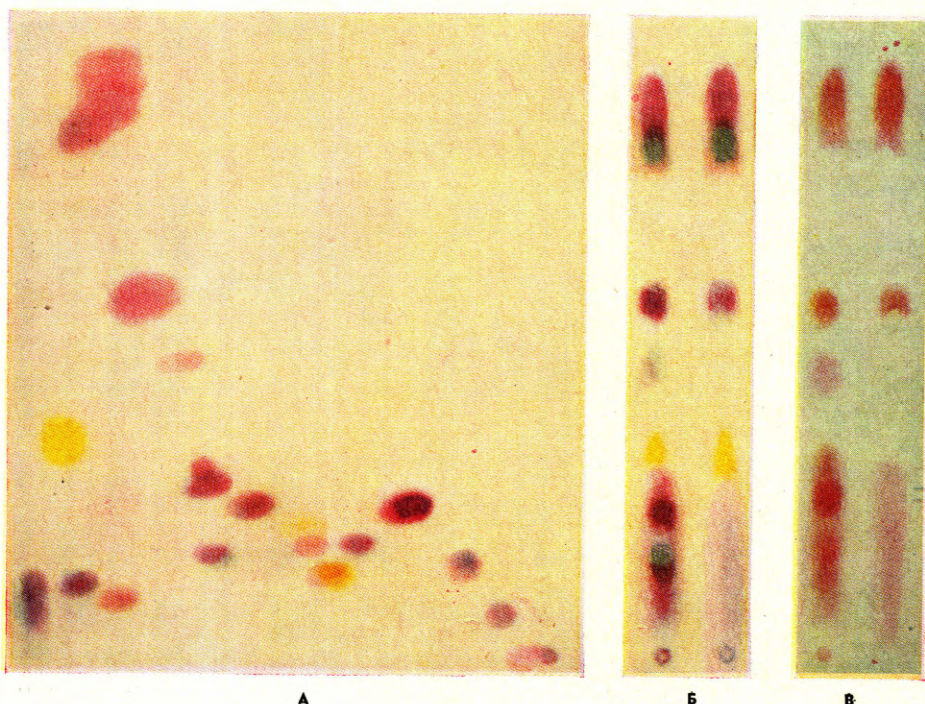
системах. Например, в бутаноле или в насыщенной водой смеси бутанола и бензильного спирта сближается положение  $\gamma$ -аминомасляной кислоты и аланина. Наоборот, в системе бутанол — уксусная кислота — вода значения  $R_f$   $\alpha$ - и  $\omega$ -изомеров отличаются тем меньше, чем больше доля уксусной кислоты в смеси (Синг [1]).

*N*-Алкилированные аминокислоты. Для разделения *N*-метил- и *N*-диметиламинокислот могут служить, например, коллидин (Гал и Гринберг [2]), бензильный спирт (Кун и Руэлиус), бутанол с уксусной кислотой и другие системы. При метилировании значение  $R_f$  повышается (Шлюйтерман и Винендаль).



Р и с. 174. «Карта» аминокислот и некоторых аминов в системе: I — фенол, насыщенный водой (в атмосфере  $\text{NH}_3$ ), II — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Эта «карта» была получена путем интерполяции и сверки «карт» Смита [2], Копольдовой [1], Коулсона, Стьюарда и сотрудников [1] и др. Согласно Коулсону,  $\beta$ -аминоизомасляная кислота в бутаноле, содержащем уксусную кислоту, имеет более низкое значение  $R_f$ , нежели  $\gamma$ -амино-*n*-масляная кислота. Согласно Смит, имеет место противоположная зависимость. Обычные аминокислоты обозначены ●.  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -ДАП —  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -диаминопентан.

*N*-Ацилированные аминокислоты разделяются в системах растворителей такого же типа, как и применяемые для органических кислот (например, *n*-бутанол — аммиак), и идентифицируются теми же способами. Дитиокарбаминокарбоновые кислоты Йеншовский разделял в 70%-ном пропаноле (идентифицируются азотнокислым серебром или йодазидной реакцией). Об аминокислотах, арилированных динитрофенилом, см. стр. 475.



Р и с. 175. Хроматография аминокислот.

А. Системы: I — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) (на рис. снизу вверх); II — фенол с аммиаком (на рис. справа налево). Проявление нингидрином (Д1126). Нанесено 400 мкг гидролизата казеина. Отдельные пятна сверху: лейцины (фиолетовое пятно частично сливается с синевато-серым пятном ФА), Вал (с Мет), Тир (слабое серовато-коричневое пятно), Про (желтое пятно), Ала, Тр (серовато-фиолетовое пятно), Глу (четкое пятно справа), Гли (розоватое пятно), Сер, Глу NH<sub>2</sub> (под Ала), АспNH<sub>2</sub> (оранжевое под Гли и Сер), Асп (синее пятно справа). Снизу слева: неидентифицированные соединения у линии фронта, Арг, Лиз (розоватые пятна), Гис (едва различимое коричневатое пятно), справа ЦиSO<sub>3</sub>H, у линии старта неидентифицированные пятна. См. схематическую хроматограмму на рис. 174.

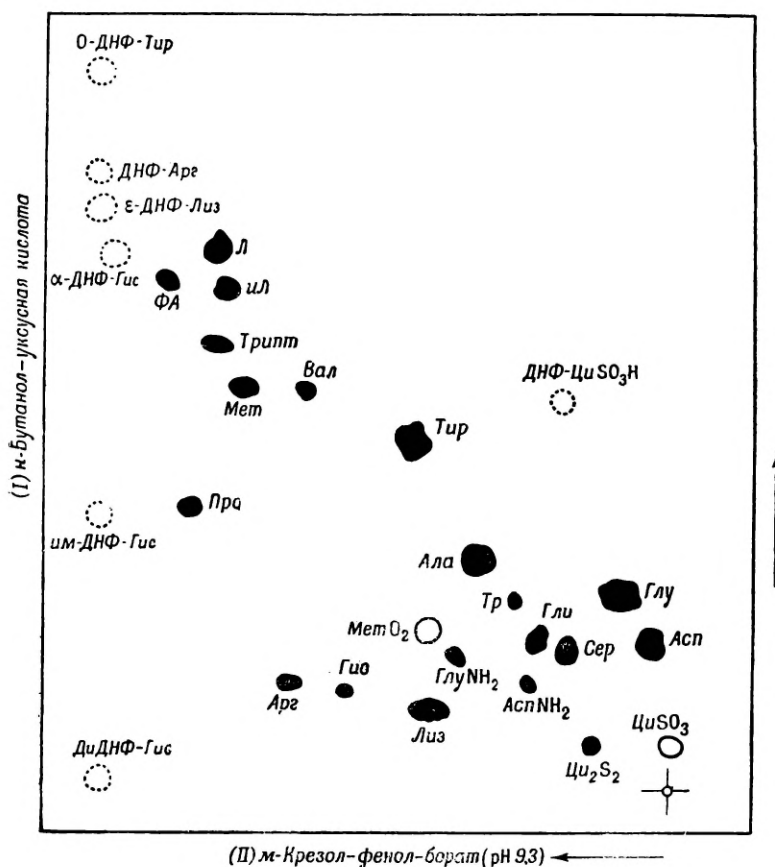
Б. Система I *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Слева — 200 мкг ферментативного гидролизата казеина, справа — кислотный гидролизат частично расщепленного образца смеси алкалоидов спорыньи эрготоксинового типа. Основные пятна: Л, ФА, Вал, Про.

В. То же, что и Б, но после проявления нингидрином обработано раствором азотнокислой меди (Д113) с целью стабилизации пятен.

Медные комплексы аминокислот были разделены в феноле, насыщенном водой (Миллз), в лутидине с водой или в 50 %-ном водном растворе пиридина (Миура), в тетрагидрофуране с водой (Эрдем и сотрудники) или 80 %-ном водном растворе диоксана (Бек и Цазар [1]).

### СИСТЕМЫ ДЛЯ ДВУМЕРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ориентировку в хроматограммах, полученных при применении различных двумерных систем растворителей, мы облегчим, если соединим положения алифатических моноаминомонокарбоновых кислот линиями. От



Р и с. 176. Двумерная хроматограмма аминокислот и некоторых ДНФ-аминокислот, растворимых в воде (Леви [2]).

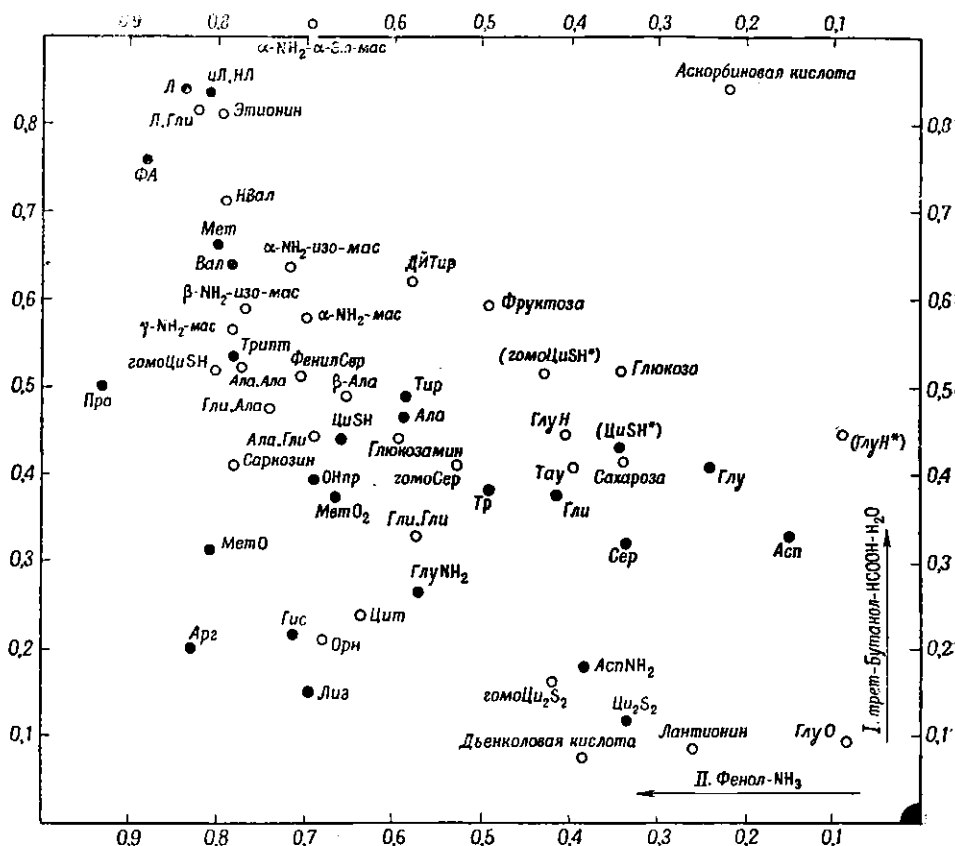
Первое направление: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5); второе направление: *m*-крезол — фенол (1 : 1), насыщенный боратным буферным раствором, pH 9,3.

От этой «оси» хроматограммы остальные аминокислоты удалены с определенной закономерностью (Полсон [2]; Стьюард и Томпсон [1], см. рис. 172, стр. 408).

Метод рационального выбора оптимальных систем для двумерного хроматографирования приводят Харди и сотрудники.

### Комбинация с фенолом в одном направлении

Эти комбинации довольно многочисленны. Известна схематическая хроматограмма («карта») Дента [2] для системы с фенолом и аммиаком в одном направлении и «коллидином» (в частности, со смесью коллидин — лутидин) в другом направлении. Она воспроизводится на рис. 173. (см. стр. 409). Пунктирными линиями соединены относительные положения одних и тех же соединений при различных условиях. Весьма обширные «карты» приводят



Р и с. 177. «Карта» аминокислот (и некоторых сахаров и пептидов) (Рокланд и Ундервуд).

Системы растворителей. Первое направление: трит-бутанол — муравьиная кислота — вода (695 : 10 : 295); второе направление: фенол — вода (775 : 225 вес.) + 1% конц.  $\text{NH}_3$ . Звездочкой обозначены пятна сульфидрильных соединений, которые окислялись между первым и вторым пропуском растворителя.

также Стьюард и сотрудники [2]. Коллидин можно заменить различными смесями основного характера (например, смесью *n*-бутанол — пиридин — вода 1 : 1 : 1; обширную «карту» приводит Смит [2]).

Наиболее часто применяется комбинация фенол — аммиак) в одном направлении, *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) — в другом, предложенная Линггудом и Войводем. На рис. 174 приведена подробная «карта», аналогичная «картам» Смита [2] и Стьюарда с сотрудниками [2], а на рис. 176 — модификация Леви и Чунга [2].

Фенол в одном направлении комбинировали со многими другими растворителями (см. рис. 177 по Рокланду и Ундервуду [2]). Приведен также цветной рис. 175.

### Комбинации растворителей, не содержащие фенола

Были предложены следующие комбинации:

I: амиловый спирт — пиридин — вода (35 : 35 : 30), II: масляная кислота — изовалериановая кислота — вода (45 : 45 : 10), по Эдману;

I: *трет*-бутанол — бутанон — вода (4 : 4 : 2), II: *трет*-бутанол — метанол — вода (4 : 5 : 1), по Буассона [2];

I: этанол — *н*-бутанол — вода — пропионовая кислота (10 : 10 : 5 : 2), II: *н*-бутанол — ацетон — вода — дициклогексиламин (10 : 10 : 5 : 2), по Харди с сотрудниками;

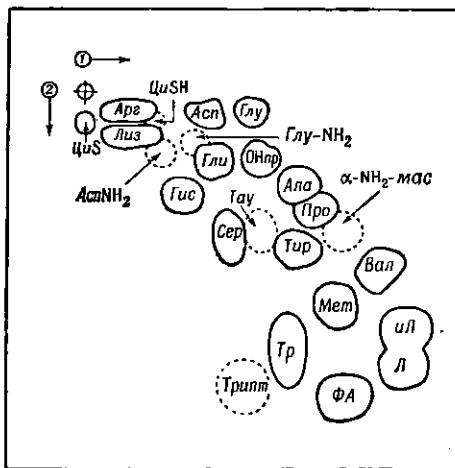


Рис. 178. Идентификация аминокислот на малых хроматограммах (14×15 см) (Редфилд).

Системы: I — метанол — вода — пиридин (80 : 20 : 4); II — *трет*-бутанол — метилэтилкетон — вода — диэтиламин (40 : 40 : 20 : 4). На бумагу нанесено по 0,01 μл аминокислот.

I: *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5); II: α-пиколин — уксусная кислота — вода (75 : 2 : 23) или α-пиколин — пиридин — вода (72 : 5 : 23), по Пфенигу. На рис. 178 приведена комбинация Редфилда [1]. *трет*-Бутанол можно заменить *н*-бутанолом (Сисакян и сотрудники), однако лейцины при этом не разделяются.

### Сушка после пропускания первого растворителя

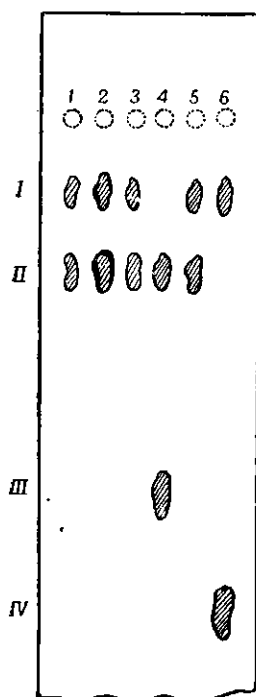
Температура, при которой удаляется растворитель после первого хроматографирования, является существенным фактором. Радиоавтоматомы Бруша и сотрудников убедительно показывают, что сушка при 85° после первого хроматографирования в феноле обуславливает значительные потери аминокислот. Образующиеся при этом соединения, которые перемещаются с линией фронта в другом растворителе, не реагируют с нингидрином.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ ПО РЕАКЦИЯМ, ПРОВЕДЕННЫМ ПЕРЕД ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЕМ

### Гидролиз

Глутамин разлагается уже при умеренном подкислении с нагреванием; при полном кислотном гидролизе происходит разложение триптофана, аспарагина и большинства пептидов. Если кислотный гидролиз ослабляет

пятно, в то время как другие пятна усиливаются, то можно сделать предположение о наличии пептидов. При этом, однако, следует иметь в виду, что некоторые пептиды обладают исключительной стойкостью по отношению к гидролизу, и, наоборот, некоторые непептидные соединения могут давать продукты расщепления, реагирующие с нингидрином.



#### Действие ферментов

Путем применения специфических амидаз были идентифицированы аспарагин и глутамин (Мардашев и Сёмина) (рис. 179).

#### Окисление

Цистин и цистеин, которые в процессе хроматографирования разлагаются на большое число соединений, рекомендуют предварительно окислять перекисью водорода или надмуравьиной кислотой (II 89)

Р и с. 179. Идентификация глутамина и аспарагина с помощью бактериальных ферментов (Мардашев и Сёмина).

На схеме обозначены только те пятна, интенсивность которых меняется во время опыта. I—Асп; II—Глу; III—Ала; IV—γ-аминомасляная кислота. 1, 3, 5 — экстракты из животных тканей, в которых хотят доказать наличие  $\text{AspNH}_2$  и  $\text{GluNH}_2$ ; pH 8—5,6—4,5; 2 — деаминарование (pH 8) усиливает пятна Асп и Глу; 4 — влияние декарбоксилирования аспарагиновой кислоты (pH 5,6); 6 — влияние декарбоксилирования глутаминовой кислоты (pH 4,5).

и идентифицировать образующуюся цистеиновую кислоту. В случае метионина мы обнаруживаем на хроматограммах пятно его сульфоксида; кроме того, пятно метионина во многих системах перекрывается другими аминокислотами (валин или лейцин), поэтому его окисляют перекисью водорода или надмуравьиной кислотой в сульфон. Согласно Денту [2], в отличие от метионина сульфоксид окисляют в сульфон перекисью, но лишь после добавления молибдата в качестве катализатора (II 79). Мы рекомендуем контролировать результат окисления хроматографическим методом и обращаем внимание на то, чтобы метионин и цистин окислялись по возможности полнее, но нужно следить, чтобы при этом не разрушались остальные аминокислоты. Окисление цистеина перекисью водорода или бромной водой в присутствии других аминокислот приводит к образованию пятен артефактов, как это отмечает Ван Хальтерен. О разделении продуктов окисления метионина на хроматограмме см. у Мацуо. Изменениями в расположении пятен после окисления можно охарактеризовать также и остальные серусодержащие аминокислоты (цистатинин, пенициламин, гомоцистеин, лантионин) и их производные (пептиды и др.). Микеш и Голейшовский [2] использовали для метиониновых производных так называемую диагональную хроматографию: после первого пропускания растворителя эти соединения окисляли парами надмуравьиной кислоты, вторичное хроматографирование проводили в той же системе, но в другом направлении. Продукты окисления отклоняются от размещения пятен

по диагонали (см. рис. 62). Пример использования окисления для двумерной идентификации приводит также Бреннер и сотрудники.

Окисление перйодатом можно использовать для негативной идентификации серина и треонина, так как при окислении эти аминокислоты исчезают (Гири и сотрудники [2]).

### Образование комплексов с медью

В то время как  $\alpha$ -аминокислоты растворяют основной карбонат меди с образованием комплексов,  $\omega$ -аминокислоты в этих условиях не реагируют (Шимков). Медные комплексы  $\alpha$ -аминокислот перемещаются затем на другое место хроматограммы, отделяясь от свободных аминокислот (Крумплер и Дент [1]). Оттенок окраски, возникающей при реакции медных комплексов с нингидрином, более слабый, а тон более розовый.  $\gamma$ -Аминокислоты и аминокислоты с еще более отдаленной от карбоксила аминогруппой перемещаются точно так же, как и без обработки карбонатом меди.  $\beta$ -Аминокислоты исчезают только при обработке избытком карбоната. Карбонат меди не должен содержать соду, которая мешает при анализе. Эти методы по возможности не рекомендуется применять для систем, содержащих кислоту, растворяющую карбонат.

### Реакция с карбонильной группой

Каналин — замещенный гидроксилламин  $\text{NH}_2\text{—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{CH—}$   $\text{—(NH}_2\text{)—COOH}$  — дает с различными карбонильными производными оксимы, которые можно хроматографически идентифицировать (Уокер). Возможность неферментативного трансаминирования следует иметь в виду при хроматографировании образцов, содержащих кетокислоты, если мы наносим образцы при температуре выше  $60^\circ$  (Гири и Кальянкар [1]).

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ<sup>1)</sup>

Поскольку аминокислоты начали хроматографировать на бумаге раньше всех других соединений и в очень широких масштабах, число работ, посвященных их количественному анализу, весьма обширно. Почти все приемы, которыми располагал метод количественного анализа с применением хроматографии на бумаге, были использованы для этой цели. С определением аминокислот после разделения на бумаге не может конкурировать никакой другой метод, кроме хроматографии на ионообменниках (которая с точки зрения затраты времени и сложности аппаратного оформления является более трудной и требует применения больших образцов). Мы считаем, что именно такой большой выбор приблизительно одинаково выгодных методик свидетельствует скорее о том, что ни одна из них не является полностью удовлетворительной.

Многие авторы достигли весьма высокой точности результатов анализа. Это возможно лишь при скрупулезной точности самой работы, тщательной обработке результатов и при очень внимательном отношении к определенному методу. Однако в повседневной практике соблюдать эти

<sup>1)</sup> Эта глава основана на тексте, написанном З. Францем для первого чешского издания этой книги.

нормы очень трудно. Мы считаем, что для самых лучших методов максимальная ошибка при 5 определениях достигает 5—20%. Все эти методы тем точнее, чем полнее разделение, вот почему благоприятным является повторное хроматографирование (Кейл [2]). Одновременное присутствие других аминокислот наряду с аминокислотой, которую мы определяем, оказывает влияние на конечный результат по следующим причинам. В случае частичного перекрывания пятен могут сравниваться лишь образцы приблизительно одинакового состава. Другие аминокислоты снижают адсорбцию, которая может вызывать потери аминокислот по пути их перемещения. Потери снижаются также в результате образования комплексов с примесями в самой бумаге. Наоборот, нельзя достичь такого положения, на которое указывают Бек и Эбри [2], а именно когда избыток другой аминокислоты может направлять анализируемую аминокислоту в свое пятно. Во всех случаях полезно, когда соотношение аминокислот в стандартной смеси подобно их соотношению в испытуемом образце. Для некоторых методик это условие является необходимым. Существенное влияние на разделение оказывают примеси неаминокислотной природы.

Несмотря на оптимизм ряда авторов, мы считаем мало надежными и недостаточно точными методы *in situ* (т. е. методы определения непосредственно на бумаге), если анализ проводят на двумерных хроматограммах. Трудности многих методов состоят в том, что при нагревании готовых хроматограмм с целью их сушки могут иметь место потери, особенно если не удалены растворители (Фауден и Пенни [3]; Гал [1]; Бруш и сотрудники). При выборе метода решающим является возможность быстрого проведения анализа большого числа образцов, особенно когда можно применять методы визуального сравнения (лучше всего использовать убывающее количество стандартного вещества и возрастающее количество образца). Важным фактором при выборе метода является также точность, которую можно достигнуть в результате проведения анализа по более сложной методике, например по модифицированному Микешом способу Кейла [2] *in situ* или по модифицированной Коннелом нингидриновой колориметрии, а также методу динитрофенилирования (Леви [1]).

Принцип ретенционного определения рассмотрен на стр. 188, радиометрические методы приведены на стр. 199.

## НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ НА БУМАГЕ

### МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПО ВЕЛИЧИНЕ ПЯТЕН

Согласно данным Фишера и сотрудников, площадь пятен пропорциональна логарифму количества вещества. Если метод определения основан на измерении величины пятна, то необходимо, чтобы образцы были нанесены абсолютно равномерно (не только в отношении размера нанесенной точки, но и в отношении объема образца и размещения вещества в точке), расстояние между линией старта и пятном должно быть достаточным и края пятна не должны быть слишком диффузными. Для повышения контрастности пятно можно при необходимости копировать на твердую фотографическую бумагу. Несмотря на то, что Апэ и Фромажо [2] указывают относительно большую точность результатов (2—4%), этот метод нашел сравнительно небольшое распространение, очевидно потому, что трудно добиться абсолютно равномерного нанесения.

## МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПО ИНТЕНСИВНОСТИ ОКРАСКИ ПЯТЕН

### Визуальная оценка

До некоторой степени предварительной оценкой количества вещества является оценка интенсивности окраски пятен по сравнению с произвольно выбранной шкалой. Для сравнительных биологических исследований этого иногда бывает вполне достаточно (Дент и Шиллинг [4], Копольдова [2]). Ненадежным мы считаем метод, основанный на разбавлении образца до степени, близкой к возможной границе наблюдения.

### Фотометрическое измерение

На основании предварительных опытов Блок [2, 4] установил, что для определения количества вещества в пятне на хроматограмме достаточно фотометрировать середину пятна. Один из его методов основан на сопоставлении двумерных хроматограмм нескольких разбавлений стандартной смеси и испытуемого образца (см. стр. 184).

Полсон [1] сравнивал метод фотометрирования с визуальным методом. В обоих случаях пятна испытуемого образца сравнивались со стандартной смесью различной степени разбавления. В результате было установлено, что фотометрический метод не является более точным, тогда как времени он отнимает больше. Колоушек и Коулсон [3] считают, что ошибка при фотометрическом методе достигает 25—50%.

## МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПО ВЕЛИЧИНЕ ПЯТЕН И ИНТЕНСИВНОСТИ ИХ ОКРАСКИ

### Визуальная оценка

*По сравнению со шкалой.* Колоушек и Коулсон [3], а также Косиковский при оценке пятен учитывают их величину. Соухон и Грунау калибруют шкалу по пятнам аминокислот известных концентраций, так что можно получать абсолютные величины даже при малой точности самого хроматографического метода.

*Метод стандартного разбавления.* Сравняются различные степени разбавления стандартных образцов с различными степенями разбавления анализируемого образца (Полсон и сотрудники [3]), см. стр. 183.

*Метод убывающих количеств стандартного образца и возрастающих количеств анализируемого образца* по существу является видоизменением предыдущего метода. На бумагу (для одномерного хроматографирования) наносят поочередно образцы стандартной смеси аминокислот (например, в количестве 30, 20, 10  $\mu$ л) и образцы анализируемой смеси (в обратном порядке, например 10, 20, 30  $\mu$ л). Подробно см. в прописи II 80 (Хайс и Франц [2]). См. рис. 180 и 181.

*Модифицированный метод стандартной добавки* (Кирби-Берри [2]), описанный на стр. 183, можно рекомендовать для анализа биологического материала (см. рис. 96), так как техника проведения анализа по этому методу ограничивает возможность нежелательного влияния неаминокислотных составных частей образца.

### Фотометрия всего пятна

Полоску, вырезанную из хроматограммы, перемещают вдоль щели, которая должна быть длиннее ширины пятна, и измеряют экстинкцию (как правило, при 570 мμ) (см. также стр. 185). Полученные значения наносят на график и получают ряд пиков. Определяют величину площадок между пиками и основаниями. Этот метод использовали для определения количества аминокислот большое число авторов, например Булл и сотрудники, Редфилд и Баррон [2]. Согласно данным этих авторов, точность метода довольно высока (ошибка составляет 4—9%). Возможные источники ошибок следующие: отклонения в интенсивности цветной реакции (поэтому хроматографируют стандартный и анализируемый образцы на одном и том же листе бумаги, стараясь равномерно распределить реагенты и обеспечить равномерное нагревание), неприменимость закона Ламберта — Бера (поэтому можно сравнить лишь пятна приблизительно одинаковой компактности и интенсивности), неравномерность бумаги. Неудобством этого метода является также длительность измерения полосок (что можно исключить автоматизацией) и длительность измерения площадей между пиком и осью абсцисс.

Влияние неравномерной прозрачности бумаги можно ограничить промасливанием, например парафиновым маслом (Гиллер и сотрудники, Грассман и сотрудники [2]), или фотометрированием только отраженного света, а не проходящего. Широко распространен метод Кейла [2], по которому хроматограмму фотографируют в падающем свете и фотометрируют негатив (*И 81*) (рис. 182, 183). Стандартная смесь должна, само собой разумеется, по возможности более точно отвечать составу анализируемого образца, поскольку зависимость между концентрацией аминокислоты на поверхности и отклонением гальванометра сложна.

Микеш [1] объединил метод определения по убывающим количествам стандартного образца и возрастающим количествам анализируемого образца с методом Кейла [2]. При этом измеряют поперечную полосу, содержащую пятна определенной аминокислоты в различных количествах. По сравнению с методом Хайса и Франца [2] этот метод дает вполне объективные результаты; стандартная смесь может отличаться от состава анализируемого образца в большей степени, нежели в первоначальном методе Кейла [2], и получающиеся результаты можно рассматривать как абсолютные значения, а не как процент от общего содержания аминокислот.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕ РАЗДЕЛЕНИЯ НА БУМАГЕ И ЭЛЮИРОВАНИЯ

### ВЫМЫВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ

#### Колориметрия с нингидрином

На этой основе было разработано большое число методов, ошибка которых составляет около 5% (для гистидина эта величина больше). К наиболее старым из них относится метод, предложенный Нэфталином. Для колориметрии используются чаще всего реактивы, которые наряду с нингидрином содержат еще продукт его восстановления — гидриндаптин, так как иначе кислород воздуха будет способствовать получению

весьма неустойчивых результатов. Однако этот реактив реагирует еще и с аммиаком, поэтому следы аммиака необходимо предварительно удалять с бумаги, лучше всего путем подщелачивания (обработка 1%-ным едким кали в абсолютном метаноле с последующим нагреванием в сушильном шкафу по Буассона [1], кипячение с 1%-ным водным раствором щелочи, смачиванием щелочью вырезанного пятна и т. п.). Согласно Фаудену [1], остаток фенола на хроматограмме необходимо удалить, дважды промывая свежеперегнанным эфиром. Весьма распространенный нингидриновый раствор Мура и Стейна [1] содержит  $\text{SnCl}_2$ ; согласно более новой модификации, вместо  $\text{SnCl}_2$  добавляют небольшое количество предварительно приготовленного гидриндантина (Коннел и сотрудиники, II 82; Мур и Стейн [2]). Пасхина использует реактивы, содержащие цианистый калий, фенол и пиридин.

Одномерные хроматограммы можно разрезать на большое число полосок, каждую из этих полосок элюировать, колориметрировать и результат нанести на график. Лучше всего (главным образом в случае двумерных хроматограмм) вырезать только те площадки, которые содержат аминокислоту. В этом случае необходимо ориентироваться либо на проявляемую параллельно, но неразрезанную хроматограмму, либо на проявление, при котором заметные потери аминокислот не наблюдаются. Было предложено нагревание (15 мин,  $100^\circ$ ) с последующим наблюдением флуоресценции аминокислот, проявление слабым раствором нингидрина (Ландуа и Авапара [1]; Швердтфегер), лучше всего подкисленным уксусной кислотой, а также другие методики. Согласно Пернису и Вундерли, нет необходимости заменять полное нингидриновое проявление на бумаге реактивом Мура и Стейна [1]: образующийся краситель элюируется вместе с оставшимися непрореагировавшими аминокислотами, которые затем реагируют в пробирке. Тщательное промывание бумаги перед хроматографированием, особенно щелочами, снижает данные слепого опыта и улучшает результаты.

### Комплексы с медью

Хроматограмму разрезают на полоски, которые оставляют на ночь в суспензии фосфорнокислой меди(II). Утром нерастворившийся осадок вместе с бумагой центрифугируют. Растворенные медные комплексы аминокислот полярографируют (Мартин и Миттельман) или определяют медь колориметрическим путем с диэтилдитиокарбаматом (Войвод [1, II 83]). Предварительное проявление нингидрином для этого метода не годится, так как сам нингидрин связывается с медью; ввиду этого Босер рекомендует проводить обнаружение по флуоресценции, которую можно вызвать обработкой образца 0,1 н. фосфатным буферным раствором с pH 7,4 и нагреванием в течение 5 мин до  $105^\circ$ . Методы, предусматривающие образование медных комплексов, менее чувствительны, нежели нингидриновые. Образованию комплексов могут препятствовать вещества, вымытые из бумаги.

### Другие методы

Некоторые авторы сжигали элюат из пятен по микрометоду Къельдаля с последующим определением аммиака.

Аминокислоты можно также определять манометрически по реакции с нингидрином (Чаннинг и Юнг) или с хлорамином Т (Кембл и Макферсон).

### ЭЛЮИРОВАНИЕ КРАСИТЕЛЯ, ОБРАЗОВАВШЕГОСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПРОЯВЛЕНИЯ НА БУМАГЕ

Некоторым авторам (например, Томпсону и Стьюарду; Веллингтону) удалось не только проявить аминокислоты нингидрином, но и элюировать и колориметрировать образовавшиеся окрашенные продукты. Воспроизводимость результатов можно повысить, если вымывать комплексы этих продуктов реакции с катионами тяжелых металлов, например с кадмием (Монтрей и Коувин; *П* 84) или с медью. Гири и сотрудники [4, 5] элюируют, например, сектор круговой хроматограммы смесью 3,8 мл 75%-ного этанола и 0,2 мл 0,1%-ного сульфата меди(II) (тон более красный и окраска кажется более интенсивной). Боде, а также Фишер и Дёрфель получают медные комплексы на бумаге и элюируют метанолом. Они дают критическую оценку количественного анализа аминокислот методом хроматографии на бумаге. Согласно нашим данным, недостатком этого метода является то, что объективная фотометрия может привести к ошибке скорее, чем визуальное определение, например, если мы имеем в центре пятна иной (более слабый) тон окраски.

### ПЕРЕВОД АМИНОКИСЛОТ В ПРОИЗВОДНЫЕ ПЕРЕД ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЕМ

Некоторые трудности при определении аминокислот, например некое количественное протекание нингидриновой реакции и возможность взаимодействия аминокислот с бумагой (Кофрани) и друг с другом (Бек и Эбри [2]), привели к тому, что некоторые авторы стали хроматографировать вместо аминокислот их производные, например медные комплексы. Особенно удобным является перевод аминокислот в динитрофениламинокислоты взаимодействием с 1-фтор-2,4-динитробензолом, что было тщательно проверено на примере определения N-концевых аминокислот (подробнее см. на стр. 469). ДНФ-производные окрашены в желтый цвет, поэтому разделение их можно изучать визуально; они фотометрируются в элюате при 360 мμ без обработки какими-либо другими реактивами (Леви [1], *П* 85). Рекомендуемые системы и положения пятен на двумерной хроматограмме приведены на рис. 189. Лейцин и изолейцин остаются неразделенными. Несмотря на сложности, обусловленные рядом операций, предшествующих собственно хроматографированию, и некоторыми побочными реакциями, этот метод приобрел широкое распространение. Анализируемые образцы могут, очевидно, содержать белки и неорганические соли.

### *Применение на практике*

Мы не можем здесь привести примеры, иллюстрирующие все случаи применения хроматографии на бумаге для исследования реакций образования и превращения аминокислот. Различные другие методы фракционирования и чистота аминокислот обычно контролируются методом хроматографии на бумаге. При изучении неферментативных реакций часто пользуются хроматографическим исследованием аминокислот и сахаров.

Это позволяет определить пригодность пищевых продуктов и снижение их качества в процессе хранения.

Мы не будем здесь упоминать о применении этих реакций для анализа белков; способы гидролиза обсуждаются на стр. 405 и 466. Из большой области применения этих методов для анализа свободных аминокислот биологического материала мы приведем лишь некоторые методические подробности, а также способы определения некоторых редких соединений, дающих положительную реакцию с нингидрином, с которыми может столкнуться читатель. Для животного материала мы приведем некоторые нормальные показатели и обратим внимание на методы, имеющие значение для диагностики.

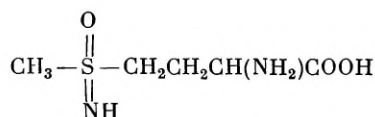
### АМИНОКИСЛОТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Хроматографией на бумаге можно пользоваться для анализа большого числа образцов культуральной питательной среды с целью сравнения обмена веществ у многих микроорганизмов. Из менее распространенных аминокислот, присутствие которых в бактериях было обнаружено методом хроматографии на бумаге, мы приводим гомосерин, пантонин ( $\alpha$ -амино- $\beta$ , $\beta$ -диметил- $\gamma$ -оксимасляную кислоту), широко распространенную  $\alpha$ -аминомасляную кислоту,  $\alpha$ , $\epsilon$ -диаминопимелиновую кислоту (Уорк), табтоксинин ( $\alpha$ , $\epsilon$ -диамино- $\beta$ -оксипимелиновую кислоту),  $\delta$ -оксилизин. В состав пептидных антибиотиков (стр. 469) входит много необычных аминокислот. Из  $\omega$ -аминокислот, которые могли бы получаться путем  $\alpha$ -декарбоксилирования дикарбоновых моноаминских кислот, был найден  $\beta$ -аланин,  $\gamma$ -аминомасляная и  $\delta$ -аминовалериановая кислоты.

Хроматографически было исследовано большое число ферментативных превращений аминокислот, вызываемых микроорганизмами.

### АМИНОКИСЛОТЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

В нескольких работах были систематически исследованы соединения, реагирующие с нингидрином и содержащиеся в растениях. Было также найдено много новых аминокислот и других соединений, что позволяет лучше понять азотистый обмен растений. Количественный анализ кормовых растений (как белковой фракции, так и свободных аминокислот) дает сведения относительно их пищевой ценности (Неринг и сотрудники; Колоушек и Кутачек [4]). В пищевой промышленности, главным образом в сахарной, а также при производстве вина, пива, чая, табака и какао, методом хроматографии на бумаге было исследовано содержание аминокислот в исходном сырье и их изменение в процессе переработки. Хроматография на бумаге оказала помощь при выделении и доказательстве существования токсичного фактора из муки, отбеленной хлористым азотом, который был идентифицирован в виде сульфоксимины метионина



Превращения аминокислот (радиоактивных и немеченых) были исследованы особенно подробно при изучении фотосинтеза.

### Методика

Принципы операций, предшествующих нанесению образца на бумагу, были рассмотрены на стр. 403. Сухой растительный материал, как правило, сначала обезжиривают эфиром в приборе Сокслета; для уменьшения потерь эфирную вытяжку необходимо извлечь водой (Буланже и сотрудники [3]). Колоушек (частное сообщение) не наблюдал потери аминокислот при обезжиривании сухих трав. Небольшое количество жиров удаляется при применении ионообменников для деминерализации и удаления сахаров. Свободные аминокислоты экстрагируют, как правило, 70—80%-ным этанолом; при обработке зерновых культур по методу Фиаловой лучше всего применять экстракцию водой и только после этого водную вытяжку осаждать спиртом.

### Вновь открытые аминокислоты

Обзор новых аминокислот, открытых с помощью хроматографии на бумаге, приводят Колоушек [2], Гроббелаар и сотрудники, Стьюард и сотрудники [2] и Виртанен [1]. Очень много пятен, реагирующих с нингидрином, до сих пор остаются еще неидентифицированными.

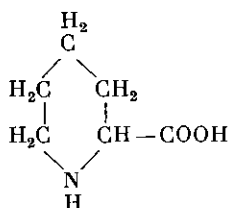
Стьюард и сотрудники [2] приводят обзор свойств и методов обнаружения, а также двумерную «карту» 86 пятен. Постоянно открывают новые пятна, вещества ранее открытых пятен выделяют и идентифицируют. При этом выясняется роль вновь открытых соединений в обмене веществ. Были также открыты кетокислоты, соответствующие многим вновь открытым аминокислотам (см. стр. 250). Большинство вновь открытых аминокислот содержится в небелковой фракции, но некоторые (например,  $\gamma$ -оксиглутаминовая и  $\gamma$ -метилглютаминовая кислоты) являются составной частью белков. Аминокислотная фракция экстракта, обычно получаемая с помощью катионообменников, анализируется методом двумерной хроматографии на бумаге, а преобладающий заряд соединений определяется путем электрофореза на бумаге. После этого проводят собственно выделение, хроматографируя в зависимости от характера соединений либо на ионообменниках, либо на бумаге (целлюлозе). Хроматография на бумаге применяется также при деструктивном разложении и сравнении образующихся при этом соединений с синтетическими образцами. При выделении циклических иминокислот рекомендуется предварительно отделить  $\alpha$ -аминокислоты путем обработки хроматограммы азотистой кислотой.

Обзор вновь открытых аминокислот мы приводим по Виртанену [1]. Подробные сведения можно найти в обзорах, цитированных в введении.

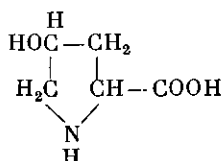
К *аминодикарбоновым кислотам* относится  $\gamma$ -оксиглутаминовая,  $\gamma$ -метилглютаминовая,  $\gamma$ -метил- $\gamma$ -оксиглутаминовая,  $\gamma$ -метилглютаминовая кислота, а также амид последней (Доун и Фауден). Цепочка из 6 атомов углерода имеется у аминокислоты, семь углеродных атомов содержат  $\gamma$ -окси- $\alpha$ -аминопимелиновая кислота и ее лактон.

$\omega$ -Аминокислоты (предполагаемые продукты декарбоксилирования аминокислот) широко распространены. К ним, например, относятся  $\beta$ -аланин,  $\gamma$ -аминомасляная,  $\gamma$ -амино- $\beta$ -метилмасляная и  $\gamma$ -амино- $\alpha$ -оксимасляная кислоты.

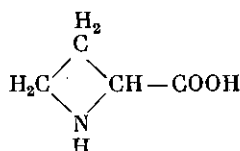
*Пиперидиновые, пирролидиновые и азетидиновые производные.* Наряду с нингидриновой реакцией, которая для этих соединений выражена очень слабо или требует нагревания до высокой температуры, проявление часто осуществляют реакцией с изатином. Особенно высоко содержание циклических иминов (включая пролин и оксипролин) в пыльце растений, что, по всей вероятности, связано с ее низкой влажностью. Из производных пиперидина были найдены: пипеколиновая кислота (пиперидин-2-карбоновая кислота), 5-оксипиперидин-2-карбоновая кислота, 4-оксипиперидин-2-карбоновая кислота (из двух последних 4-оксипипеколиновая кислота перемещается в феноле быстрее и характеризуется цветной реакцией с нингидрином; Виртанен и Кари [2]), байкианин (4,5-дегидропипеколиновая кислота). Из пирролидиновых производных мы приводим аллооксипролин,  $\gamma$ -метилпролин и  $\gamma$ -метилоксипролин. Азетидин-2-карбоновая кислота содержит четырехчленный цикл.



Пипеколиновая  
кислота



Оксипролин



Азетидин-2-карбоновая  
кислота (Фауден [2])

*Аминокислоты, содержащие серу.* Кроме известного ранее аллинина, в растениях было обнаружено S-метилпроизводное метионина (3-амино-3-карбоксипропилдиметилсульфоновая соль) и (+)-сульфоксид l-S-метицистеина.

*Фенольные аминокислоты.* Довольно широко распространен 3,4-диоксифенилаланин. В водорослях содержатся йодированные аминокислоты.

*Другие аминокислоты.* Из N-метиламинокислот в отдельных случаях в растениях был обнаружен саркозин. Наряду с орнитином, в растениях содержится его N-ацетилпроизводное. Широко распространен цитруллин, который, например в ольхе, образует одну из основных небелковых форм источника азота. Гомосерин был найден в свободном состоянии; кроме того, он образуется в результате гидролиза азетидин-2-карбоновой кислоты.

## СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ, СОДЕРЖАЩИЕСЯ В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ

С помощью хроматографии на бумаге были получены интересные данные о наборе аминокислот в различных тканях и выделениях животного организма и в продуктах его обмена при различных физиологических и патологических состояниях.

Были подвергнуты анализу даже очень мелкие организмы, и среди них в первую очередь насекомые; взаимное соотношение аминокислот во многих случаях является специфичным для каждого вида, так что это обстоятельство может быть использовано для таксономических целей.

## КРОВЬ

Приготовление образца сыворотки или плазмы, включающее депротеинизацию (осаждением, ультрафильтрацией или диализом), обезжиривание и обессоливание, обсуждалось на стр. 404 (см. II 69, II 70). На бумагу для одномерного хроматографирования наносят, как правило, экстракт, соответствующий 0,5 мл исходной сыворотки, а для двумерного хроматографирования — двойное количество этого экстракта. После обессоливания экстракта сыворотки можно использовать для разделения системы *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) в первом направлении и фенол с аммиаком — во втором (рис. 174, 175).

Для количественного анализа лучше всего пользоваться одномерной хроматографией. Если определение проводят путем визуального сравнения, то выгоднее всего пользоваться модифицированным методом стандартных добавок (стр. 183). Смесь аминокислот лучше всего добавлять уже к исходному образцу, так как все операции, и главным образом обезжиривание, могут сопровождаться потерями. Для более точного количественного анализа чаще всего использовали после элюции нингидриновую реакцию в различных модификациях. Из одномерных систем растворителей хорошо зарекомендовала себя смесь *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10); одну хроматограмму оставляют для перетекания (рис. 181). Кроме того, можно рекомендовать повторное хроматографирование в бутаноле с уксусной кислотой и водой; для соединений с более низким значением  $R_f$  лучше подходят фенол с аммиаком или различные смеси, содержащие фенол; для соединений с более высоким значением  $R_f$  пригоден *трет*-бутанол с буферным раствором (II 77). Йиргл (частное сообщение) изучил систему *n*-бутанол — метанол — муравьиная кислота (6 : 1 : 3) на бумаге ватман 3, которая позволяет проводить анализ необессоленных образцов. Воду добавлять лишь на дно камеры для насыщения атмосферы, что вызывает затруднения при воспроизводстве метода.

Вся кровь или изолированные кровяные шарики сначала подвергаются гемолизу, а затем обрабатываются точно так же, как плазма или сыворотка.

## Содержание отдельных аминокислот

В табл. 77 приводится пример содержания аминокислот в человеческой плазме по данным, полученным методом хроматографии на ионообменниках и на бумаге. Аминокислотный набор крови не столь разнообразен, как у мочи. Увеличение содержания аминокислот в крови наступает при почечной недостаточности; однако ни при каких других патологических состояниях соотношение интенсивности пятен отдельных аминокислот не имеет столь ярко выраженного изменения, чтобы хроматографирование на бумаге можно было использовать для целей диагностики.

В основном метод хроматографии на бумаге применяется для исследовательских целей либо при экспериментах на животных, либо для клинических наблюдений. Содержание фенилаланина резко падает при фенилпировиноградной олигофрении. При нефрозе количество некоторых аминокислот в крови снижается. Содержание аминокислот падает также при беременности; содержание аминокислот в крови плода всегда больше, чем в крови матери.

Таблица 77

СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ В НЕГИДРОЛИЗОВАННОЙ ПЛАЗМЕ (СЫВОРОТКЕ КРОВИ)  
И В МОЧЕ ЗДОРОВЫХ ВЗРОСЛЫХ ЛЮДЕЙ ПО ДАННЫМ  
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Аминокислота	Плазма		Сыворотка крови	Моча		
	Стейн и Мур [3], Эверед		Браун и сотрудники [2]	Стейн [1], Эверед	Мютинг [3]	Браун и сотрудники [2]
	5 + 4 а)			7 + 5 а)	40 а)	
	ионный обмен под контролем хроматографии на бумаге		хроматография на бумаге	ионный обмен под контролем хроматографии на бумаге	хроматография на бумаге	
	мг/мл			мг/сутки		мг/мл
α-Аланин . . . . .	24	37	18 27 34	12 в) 71	29 76 116	16 63 164
β-Аланин . . . . .				Присутствует (Дент [2] и Уэстолл [2])		
α-Аминоадипиновая кислота . . . . .				8 в) 11		
α-Аминомасляная кислота . . . . .	1	4	Присутствует (Эверед)	Присутствует (Дент [1], Кирби-Берри [2], Копольдова [1])		
γ-Аминомасляная кислота . . . . .			Присутствует (Дент [2], Буланже и Бизерт [2])	<5	Присутствует [26]	Буланже и сотрудники
β-Аминоизомасляная кислота . . . . .	0	3		5 185	Присутствует в различных концентрациях	
Аргинин . . . . .	0 в)	20	8 12 14	0 в) 24	4 12 13	22 28 74
Аспарагиновая кислота . . . . .	0 в)	2	0 5 8	<10 в)	0 5 12	0 81
Аспарагин . . . . .	6 в)			34 в) 92		
Цитруллин . . . . .	0	5		0 <5		
Цистин . . . . .	7	13	15 23 38	<5 в) 15	33 70 105	0 91
Этаноламин . . . . .		Следы	0 Следы	0 11		
Глутаминовая кислота . . . . .	3	12	13 16 18	0 в) а) 40	8 21 33	0
Глутамин . . . . .	83 б)		28 40 48	Присутствует в большой концентрации		
Глутатион . . . . .				Присутствует (Буланже и сотрудники [26])		
Гликокол . . . . .	11 в)	19	12 19 37	24 199	35 94 244	42 212 672
(Гиппуровая кислота) . . . . .				1000—2500		
Гистидин . . . . .	7	15	14 21 30	16 г) 320	47 93 156	0 69 107
Оксализин . . . . .				0		
Оксипролин . . . . .				Следы при цистинурии (Эверед)		
				0		
Лантанион . . . . .				Присутствует при синдроме Фанconi и у грудных детей		
				При нарывах (Буланже и сотрудники [26])		
Лейцин . . . . .	11	23	12 23 32	<5 14	8 18 30	0 19 46
Изолейцин . . . . .	7	13		<5 28	0	
Лизин . . . . .	13	30	8 16 30	0 г) 48	18 96 112	0 27 39

Продолжение табл. 77

Аминокислота	Плазма	Сыворотка крови	Моча		
	Стейн и Мур [3], Эверед	Браун и сотрудники [2]	Стейн [1], Эверед	Мютинг [3]	Браун и сотрудники [2]
	5 + 4 а)		7 + 5 а)	40 а)	
	ионный обмен под контролем хроматографии на бумаге	хроматография на бумаге	ионный обмен под контролем хроматографии на бумаге	хроматография на бумаге	
	мг/мл		мг/сутки		мг/мл
Метионин . . . . .	2	6	<5 в) 9	28 69 95	
1-Метилгистидин	1 в)		10 43 (47г) 384)	Присутствует	
3-Метилгистидин . .	1 в)		21 47		
Орнитин . . . . .	6 в)	8	а)		
Фенилаланин . . . .	7	10	9 24	3 8 15	0
(Фенилацетилглутамин) . . . . .			250 500		
Пролин . . . . .	12	33	0 в) <10	0	0
Саркозин . . . . .			0 9		
Серин . . . . .	10 в)	13	27 в) 73	35 77 149	0 33 76
Таурин . . . . .	3	12	35 294		
Треонин . . . . .	12	17	15 в) 53	5 16 25	0 18 44
Триптофан . . . . .	11 б), в)		в)	8 17 27	
Тирозин . . . . .	7	15	11 35	4 12 19	9 16
Валин . . . . .	15	37	<5 в) 8	22 53 87	0

а) Число людей.

б) Определено другими (не хроматографическими) методами.

в) Из-за плохого отделения от соседней полосы (пятна) или вследствие низкого содержания идентификация и определение являются менее точными.

г) Потери при анализе. Приведенная величина является минимальной.

д) В абсолютно свежей моче Стейн не обнаружил глутаминовой кислоты.

Если приведены два числа, то левое означает наименьшее число сведений, а правое — наибольшее. Из трех чисел берется средняя величина.

Пол людей, прошедших проверку, не приводится, поскольку зависимость от пола не обнаружена.

## ТКАНЬ

Животную ткань, как правило, гомогенизируют, а затем подвергают обработке точно так же, как и кровь. В процессе автолиза происходит быстрое увеличение количества свободных аминокислот (главным образом в мозге), поэтому препариремый орган рекомендуется сначала заморозить (лучше всего жидким воздухом) и депротеинизировать еще перед оттаиванием. Поскольку содержание свободных аминокислот во многих тканях довольно значительно, мы можем определять их иногда без обессоливания. Линднер помещал срезы тканей непосредственно на бумагу.

Большое число работ было посвящено сравнению набора свободных аминокислот в нормальных и неопластических тканях (например, Робертс и сотрудники). Внутренние органы дают особенно сильные пятна таурина,

этаноламинофосфорной кислоты и глутатиона. К наиболее сильным пятнам небелковой фракции мозга относятся пятна соединений, биохимически близких к глутаминовой кислоте, глутамину и  $\gamma$ -аминомасляной кислоте.

## МОЧА

### Методика

Если образец невозможно сразу использовать для анализа, необходимо его поместить на хранение в холодильный шкаф и добавить консервирующие вещества, например хлороформ или толуол. Относительно обессоливания см. стр. 93 и 404. Мочевину, которая оказывает неблагоприятное действие чаще всего в области, близкой валину и аминотмасляным кислотам, можно удалить с помощью уреазы. Количество образца составляет, как правило, 50  $\mu$ л обессоленной мочи для одномерной хроматограммы и 100  $\mu$ л для двумерной. Если исследованию подвергается образец с аномально высоким содержанием аминокислот, то на хроматограмму берется 15  $\mu$ л; в этом случае нет необходимости в обессоливании. Ввиду большой разницы в объеме и концентрации полученной мочи многие авторы рекомендуют брать на анализ объемы, получающиеся за определенное время (например, за 2 сек; Дент [3]), или объем, содержащий заданное количество некоторых легко определяемых составных частей мочи, например 20 — 40  $\mu$ г креатинина или 250  $\mu$ г общего азота.

Для двумерной хроматографии обессоленной мочи Копольдова [1, 2] и другие рекомендуют в качестве первого растворителя фенол с аммиаком, а в качестве второго — смесь *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) (рис. 174); классической комбинацией Дента является фенол с аммиаком для первого направления и коллидин — лутидин — вода для второго (рис. 173). Для одномерной хроматографии часто пользуются смесью *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10) (рис. 184). При хроматографировании на бумаге, пропитанной буферным раствором (например, II 72, II 77), для анализа достаточно даже 25  $\mu$ л необессоленной мочи. Недостаток одномерных систем и двумерных комбинаций фенол/бутанол — уксусная кислота состоит в том, что в этих системах таурин плохо отделяется от остальных компонентов. Однако таурин можно предварительно отделить с помощью ионообменных смол.

Для визуальной оценки в случае мочи выгодно применять модифицированные методы стандартных добавок (Кирби-Берри и Кейн [3]), см. стр. 183.

### Нормальный и патологический аминокислотный состав мочи

Содержащиеся в моче здоровых людей гликокол, серин, таурин, глутамин, аланин,  $\beta$ -аминоизомасляная кислота и гистидин дают, как правило, более интенсивно окрашенные пятна. В то время как состав аминокислот крови человека напоминает состав аминокислот обычных белков, в моче преобладают заменимые аминокислоты. Данные табл. 77 были получены путем количественного хроматографического анализа на ионообменных и на бумаге. Эти данные можно считать более точными, нежели результаты, полученные микробиологическими методами. Небелковых связанных аминокислот в моче содержится в два и даже в три раза больше, чем свободных; в таблице они не приводятся. Большое число других неидентифицированных

фицированных соединений, реагирующих с нингидрином, охарактеризовал Уэстолл.

Соотношение интенсивности пятен отдельных аминокислот мочи проявляет большое индивидуальное различие (Кирби-Берри [2]). Влияние состава пищи сказывается менее резко. При введении с пищей избытка определенной аминокислоты, как правило, повышается выделение этой аминокислоты и некоторых других аминокислот. Явная аминоацидурия имеет место при парентеральном введении аминокислот, при пенициллиновой терапии обнаруживается пеницилламин ( $\beta,\beta$ -диметилцистеин). После употребления мясной пищи в моче обнаруживается 1-метилгистидин (получающийся из ансерина и открытый Серлем и Уэстоллом) и повышается содержание гистидина и таурина. После принятия в пищу фиников на хроматограммах мочи появляются неидентифицированные пятна, дающие с нингидрином синюю окраску. К особенно резким генетически обусловленным различиям относится концентрация  $\beta$ -аминоизомасляной кислоты (Крумплер и сотрудники [2]); приблизительно у 5% населения ее пятна являются весьма сильными, а у остального населения слабыми. Из видовых особенностей мы сошлемся на количество серусодержащей аминокислоты фелинина у кошек (Уэстолл [1]).

Повышение содержания всех или ряда аминокислот с изменением их взаимного соотношения имеет место при печеночной недостаточности<sup>1</sup>), при токсическом повреждении мочеточников, при болезни Вильсона, при синдроме Фанconi (Дент [1]), при цистинозе (болезнь Лигнац-Фанconi, Биккель и сотрудники), иногда при галактоземии и дегенеративных заболеваниях мышц. Из гормональных влияний повышение экскреции вызывает терапия АКТГ или кортизоном. Характерный вид мочи приобретает при цистинурии (1 человек из 600 нормальных): наряду с цистином повышается содержание аргинина, орнитина и главным образом лизина. При фенилпировиноградной олигофрении повышается экскреция фенилаланина и его кислых продуктов обмена; из конъюгированных аминокислот повышается содержание фенилацетилглутамина. Особый синдром представляет собой остеомалиция, сопровождающаяся избыточным выделением гликокола (Эверед).

#### ДРУГИЕ ПРОДУКТЫ ОБМЕНА И СЕКРЕТЫ ЖИВОТНОГО ОРГАНИЗМА

Обработка образцов и аминокислотный состав лимфы (Браун и сотрудники), экссудатов серозных полостей, гноя и спинномозговой жидкости аналогичны обработке и составу сыворотки крови. Депротеинизированную вытяжку наносят в количестве, в два раза большем, чем количество плазмы.

При различных неврологических и психиатрических заболеваниях Кемали и Порцелатти обнаружили количественное отклонение в содержании некоторых аминокислот; при фенилпировиноградной олигофрении повышается уровень фенилаланина.

При анализе аминокислот спермы необходимо иметь в виду повышение их количества в процессе хранения.

<sup>1</sup>) При небольшом нарушении функции печени в первую очередь повышается экскреция цистина, таурина,  $\beta$ -аминоизомасляной кислоты, метилгистидина, этаноламина и метионина (Дент и Уолш [5]).

Анализам аминокислот, содержащихся в молоке и молочных продуктах, посвящено большое число работ, представляющих интерес для сыроварения (например, Колоушек и Михалик [5]).

Для анализа человеческой слюны Гольдберг и сотрудники, а также другие авторы пользуются ультрафильтратом, сгущенным таким образом, что 0,1 мл соответствует 5 мл первоначально взятого образца. Согласно Муру и Гиллигану, в слюне преобладает аланин и  $\gamma$ -аминомасляная кислота, составной частью слюны являются, далее, аминокислоты — аспарагиновая, глутаминовая и гликокол. Как и в случае мочи, аминокислотный состав слюны проявляет ярко выраженную индивидуальную изменчивость. При отборе желудочного сока для анализа аминокислот нужно стараться, чтобы материал не был загрязнен слюной, дуоденальным соком, кровью и остатками пищи. Белки удаляются осаждением этанолом или диализом и на бумагу наносится количество, эквивалентное 0,03—0,3 мл сока. Данные, полученные Гиллиганом и сотрудниками, не совпадают с данными Канского (частное сообщение, рис. 185); Гиллиган и сотрудники находили высокую концентрацию  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, но не обнаруживали серина и треонина. В желудочном соке пациентов с желудочными и дуоденальными заболеваниями содержание аминокислот такое же, как и у здоровых людей; у больных раком это содержание повышено. Поскольку имеют место исключения как в той, так и в другой группе, эти данные нельзя использовать для точного диагноза.

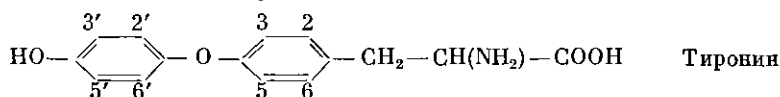
Относительно высокое содержание аминокислот на поверхности тела и в поте хорошо известно всем, кто работает в области хроматографии на бумаге. Ни в коем случае нельзя касаться хроматографической бумаги руками, если они предварительно не вымыты, так как пальцы оставляют следы в виде пятен, реагирующих с нингидрином. Характерным для состава пота является содержание в нем цитруллина. Однако в поте нельзя доказать присутствия глутамина (Ротман и Салливан, Крал и сотрудники [1, 2]) (см. рис. 96 и рис. 184).

## Галоидированные аминокислоты

Значительный прогресс в изучении физиологии и патологии щитовидной железы был достигнут в прошлом десятилетии благодаря применению радиоактивного йода. В биохимическо-аналитической стороне этого исследования основным техническим приемом была хроматография на бумаге (примеры см. у Хайса [1] и Рош с сотрудниками [3, 4]), которая за последние годы дополнилась электрофорезом на бумаге. Сначала метод хроматографии на бумаге использовали для идентификации аминокислот щитовидной железы, йодированных  $J^{131}$  (Финк и сотрудники). Среди более чем пятидесяти работ главное место занимают работы Рош и сотрудников. Хроматографическим путем была проверена чистота синтетических веществ, исследовано искусственное йодирование белков и аминокислот осуществлена очистка от радиоактивных примесей. В биологическом материале были исследованы производные йода, как свободные (неорганический йодид, аминокислоты, кислоты), так и связанные пептидной связью в белках. Были подвергнуты анализу щитовидная железа, кровь, различные органы, секреты (желчь) и экскреты (моча, пот, кал). К открытиям, имеющим большое значение, относится идентификация 3, 5, 3'-трийодтиронина, а позднее 3,3'-дийодтиронина и 3,3',5'-трийодтиронина как

дальнейших биологически активных секретов щитовидной железы (Гросс и сотрудники [2, 3], Рош и сотрудники [8]). Были также исследованы превращения (дезйодирование, окислительное дезаминирование, декарбоксилирование) под действием гомогенатов ткани и ферментных препаратов.

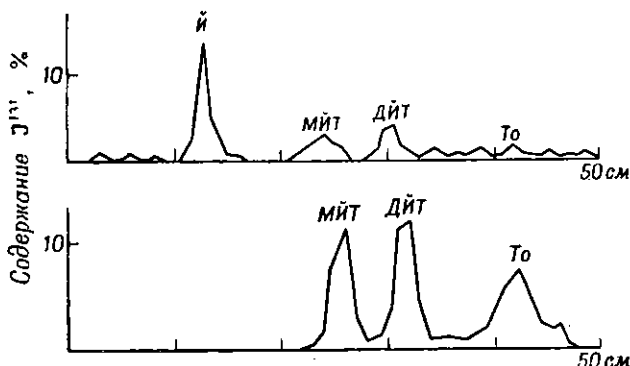
Наряду с йодпроизводными тирозина и тиронина в этом разделе мы будем рассматривать йодированные гистидины и бромированные тирозины.



В обычных системах растворителей, основанных на принципе распределения, тирозин имеет более низкое значение  $R_f$ , нежели тиронин; аналогичная зависимость имеет место у их производных. В кислых системах растворителей тирозины имеют следующий порядок  $R_f$ : тирозин < монойодтирозин < дийодтирозин; в аммиачных системах: дийодтирозин < тирозин < монойодтирозин. Подобная зависимость имеет место для моно- и дийодгистидина в системах обоих типов. В случае йодированных тиронинов картина будет сложнее. Из сравнения изомерных пар 3,5- и 3,3'-дийодтиронина, так же как и 3, 5, 3'- и 3, 3', 5'-трийодтиронина (Рош и сотрудники [8]), установлено, что в большинстве систем кислого и основного характера имеет место следующая закономерность: замещение йодом в положение 3,5 повышает величину  $R_f$  по сравнению с замещением в положение 3', 5'. Бромированные соединения (моно- и дибромтирозин и дибромтиронин) имеют несколько более низкое значение  $R_f$  по сравнению с их йодистыми аналогами.

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА

В фильтрат после обычного удаления белков не переходят свободные йодированные аминокислоты, которые остаются на белковом осадке («белковый йод»). Ввиду этого проводят экстракцию бутанолом (II 86; Рохе



Р и с. 186. Радиохроматограмма *n*-бутанольных экстрактов из гидролизата меченого тиреоглобулина (Рош и сотрудники).

Вверху — щелочной гидролиз  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; внизу — ферментативный гидролиз трипсином. Й — йодид; МИТ — монойодтирозин; ДИТ — дийодтирозин; То — тироксин.

и сотрудники [1]). Для гидролиза белков, содержащих йодированные аминокислоты, нельзя применять кислоты, так как в кислой среде йод отщепляется или обменивается. Для этой цели применяют щелочной гидролиз

Таблица 78

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ИОДИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТ И РОДСТВЕННЫХ ИМ СОЕДИНЕНИЙ

Соединение	n-Бутанол 75 НСООН 13 H <sub>2</sub> O 10	n-Бутанол 78 CH <sub>3</sub> COOH 5 H <sub>2</sub> O 17	n-Бутанол, насыщен- ный 3 п. NH <sub>3</sub> а)	n-Бутанол 4 Диоксан, насыщен- ный 2 н. NH <sub>3</sub> б) 1	трет- Амило- вый спирт 5 NH <sub>3</sub> 1 H <sub>2</sub> O 4	Коллидин, насыщен- ный H <sub>2</sub> O, атмосфера NH <sub>3</sub>	Метанол 2 0,2 н. NH <sub>4</sub> - ацетат, 5 pH 6,1 3-5%, вос- ходящая	95%-ный этанол 2 0,2 н. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1 pH 7,8
	Ашэ и Кроккер [1]	Реш и сотрудники [1, 2, 8]	Реш и сотрудники [8]	Реш и сотрудники [8]	Реш и сотрудники [5]	Реш и сотрудники [8]	Реш и сотрудники [6, 8]	Реш и сотрудники [6]
Неорганический йодид . . . . . Йод . . . . .	0,29 в) 1,00 в)	0,20	0,31		0,18	0,85	0,68	0,71
Тирозин . . . . . Моноидтирозин . . . . . Дийодтирозин . . . . .	0,30 0,45 0,55	0,40 г) 0,43 0,55	0,11 г) 0,13 а) 0,08 а)	0,12 0,17 0,11		0,28 е) 0,11 е)	0,60 0,45 0,35	0,47 0,45 0,30
Тиронин . . . . . Моноидтиронин . . . . . 3,5-Дийодтиронин . . . . . 3,3'-Дийодтиронин . . . . . 3,5,3'-Трийодтиронин . . . . . 3,3',5'-Трийодтиронин . . . . . Тироксин . . . . .	0,62 0,71 Как тиро- ксин в) 0,78	0,70 0,75 0,70 0,70 0,68 0,75	0,60 0,66 0,51 0,64 0,43 0,48	0,64 0,64 0,48 0,60 0,40 0,46	0,50 0,35 0,40 0,20 0,25	0,65 0,68 0,58 0,70 0,63 0,59	0,0 0,0 0,23 0,0 0,10 0,0	0,70 0,74 0,60 0,60
Трийодтироуксусная кислота Глюкуронид трийодтиронина Глюкуронид тироксина . . . . .	<0,40 ж)			0,33	0,55	0,28 е) 0,20 е)		

Продолжение табл. 78

Соединение	н-Бутанол 75 НСООН 15 Н <sub>2</sub> O 10	н-Бутанол 78 CH <sub>3</sub> COOH 5 Н <sub>2</sub> O 17	н-Бутанол, насыщен- ный 3 н. NH <sub>3</sub> а)	н-Бутанол 4 Диоксан, насыщен- ный 1 2 н. NH <sub>3</sub> б)	трет- Амило- вый спирт 5 NH <sub>3</sub> 1 Н <sub>2</sub> O 4	Коллидин, насыщен- ный Н <sub>2</sub> O, атмосфера NH <sub>3</sub>	Метанол 2 0,2 н. NH <sub>4</sub> - ацетат, рН 6,1 5 3—5°, вос- ходящая	95%-ный этанол 2 0,2 н. — (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , рН 7,8 1 (16—17°)
	Ашв и Кроккер [1]	Рош и сотрудники [1, 2, 8]	Рош и сотрудники [8]	Рош и сотрудники [8]	Рош и сотрудники [5]	Рош и сотрудники [8]	Рош и сотрудники [6, 8]	Рош и сотрудники [6]
Тиреоглобулин . . . . .						0,0		
Моноидгистидин . . . . .		0,12	0,21 <sup>а)</sup>					
Дийодгистидин . . . . .		0,40	0,13 <sup>а)</sup>					
Монобромтирозин . . . . .	0,41	0,38	0,06 <sup>а)</sup>					
Дибромтирозин . . . . .	0,50							
Дибромтиронин . . . . .	0,66							

а) Подобную последовательность соединений и тщательное их разделение обеспечивает изамиловый спирт, насыщенный 2 н. NH<sub>3</sub> (Рош и сотрудники) [8]. Повышая концентрацию NH<sub>3</sub>, можно соответственно уменьшить величину R<sub>f</sub>.

б) Подобное разделение дает система н-бутанол—диоксан—2 н. NH<sub>3</sub> (4:1:5) (Чакраборти и Гангули), а также н-бутанол—этанол—2 н. NH<sub>3</sub> (5:1:2) (Чайков и сотрудники).

в) н-Бутанол, насыщенный 1 н. НСООН; Гросс [1].

г) Интерполировано по Чакраборти и Гангули.

д) н-Бутанол, насыщенный 2 н. NH<sub>3</sub> (Гросс [1] и Рош с сотрудниками [2]).

е) Коллидин, насыщенный концентрированным NH<sub>3</sub> (Гросс [1]).

ж) Интерполировано по Гроссу [1].

[гидрат окиси бария (*II 87b*) или гидрат окиси лития, *II 87a*)] или ферментативный гидролиз (трипсин или смесь протеиназ панкреатического сока, *II 92*, Рош и сотрудники [1], после которых, возможно, следует папаин, Рош и сотрудники [8]). На рис. 186 показано, что и при щелочном гидролизе имеет место дезйодирование.

Йодированные аминокислоты экстрагируют из гидролизатов бутанолом (*II 86*), йодгистидины концентрируют (с потерей дийодгистидина) путем адсорбции на силикагеле, затем извлекают с помощью 0,1 н. соляной кислоты (Рош и сотрудники [2]). На возможный артефакт — сдвоение пятна тироксина, обусловленное наличием трихлоруксусной кислоты, которую применяют для депротенизации, — указал Экланд. Электролитическим обессоливанием галоидированные тирозины и тиронины дегалоидируются (Джепсон и Смит [2]; Смит [2]).

### ОБНАРУЖЕНИЕ

В подавляющем большинстве работ обнаружение основано на радиоактивности соединений; комбинируется автордиографическая техника с измерениями счетчиком Гейгера — Мюллера. Для большей чувствительности радиоактивных измерений рекомендуют применять добавки радиоактивных соединений в качестве меток даже при выделении из неактивного биологического материала йодированных аминокислот. Химическое проявление применяется главным образом для идентификации образцов для сравнения или для неактивных носителей. Йодированные аминокислоты можно идентифицировать нингидрином (низкая чувствительность, особенно для йодированных тиронинов — приблизительно 15—40  $\mu\text{g}$ ) либо сочетанием с реактивом Паули или с другими диазотированными аминами (чувствительность еще меньше—20—50  $\mu\text{g}$ ). С  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом тироксин не реагирует, а галоидированные тирозины, дийод- и трийодтиронины реагируют (Ашэ и Крокер [1], Рош и сотрудники [7]). Наиболее чувствительное проявление (до 0,1  $\mu\text{g}$  тироксина и 0,01  $\mu\text{g}$  неорганического йода) основано на каталитическом действии йода, как свободного, в виде йодида, так и связанного с органической молекулой; катализируется восстановление сульфата церия арсенитом натрия (Боуден и сотрудники; *D 124*).

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Для анализа этой группы соединений был использован довольно большой набор растворителей главным образом потому, что часть из них разделяет одни комбинации соединений, но не разделяет другие комбинации. Таким образом, они взаимно дополняют друг друга. Применяют главным образом щелочные системы (с пиридиновыми основаниями или аммиаком), но также и кислые (например, фенол или бутанол с уксусной кислотой). Полезным дополнением является применение подвижных буферных растворов (углекислого аммония, в котором большинство соединений остается на линии старта; Рош и сотрудники [6]). Бумага, пропитанная буферным раствором (0,067 *M* раствор фосфата, pH 6), рекомендуется для смеси *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (Фосетт и Кирквуд); кроме того, к образцу добавляют 3  $\mu\text{g}$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Некоторые авторы насыщают атмосферу 15%-ным водным раствором бисульфита натрия.

Выбор растворителей для определенной цели разделения приведен в табл. 78, там же указаны значения  $R_f$  в наиболее часто применяемых растворителях (например, кислые системы и коллидин для йодированных тирозинов, аммиачные системы для йодированных тиронинов).

Даже для предварительной идентификации соединения необходимо хотя бы одно двумерное хроматографирование (Гросс [1]). В литературе описано большое число комбинаций, содержащих, с одной стороны, системы, обычные для анализа аминокислот (фенол, коллидин с лутидином, бутанол с уксусной или муравьиной кислотой), с другой стороны — системы с аммиаком, приведенные в табл. 78.

### ПРЕПАРАТИВНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Хроматография на бумаге часто применялась для выделения синтетических продуктов (Леммон и сотрудники) или соединений, имеющих в биологическом материале. Из бумаги их можно извлекать разбавленным аммиаком или водными растворами спиртов с постепенным добавлением аммиака.

Для определения радиоактивности применяются обычные методы (см. стр. 199); с помощью трубки Гейгера — Мюллера измеряют элюаты из пятен или хроматограммы, предварительно разрезанные на поперечные полосы или непосредственно перемещаемые перед щелью. При удалении минимум на 4 см можно иногда измерять все пятно сразу, что менее точно (Фосетт и Кирквуд). Количественно можно определять и почернение на авторадиграфмах (Гросс [1]).

Белые пятна, возникающие при восстановлении цериевой соли арсенитом при каталитическом действии соединений йода, можно (согласно Боудену и сотрудникам) фотометрировать непосредственно на бумаге или определять методом, напоминающим ретенционный анализ (Лисицкий); см. Д 124а.

### ЛИТЕРАТУРА

- Acland J. D., *Nature*, **176**, 694 (1955).  
 Adams H. W., Stuart R. G., *Analyst*, **76**, 553 (1951).  
 Афанасьев П. В., Талмуд Д. Л., *ДАН СССР*, **90**, 619 (1953).  
 Acher R., Crocker C., *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 704 (1952). [1]  
 Acher R., Fromageot C., Jutisz M., *Biochim. biophys. Acta*, **5**, 81 (1950). [2]  
 Albanese A. A., Lein M., *Science*, **110**, 163 (1949).  
 Auclair J. L., Patton R. L., *Rev. canad. Biol.*, **9**, 3 (1950).  
 Awapara J., *Arch. Biochem.*, **19**, 173 (1948). [1]  
 Awapara J., *J. biol. Chem.*, **178**, 113 (1949). [2]  
 Awapara J., Sato Y., *Clin. chim. Acta*, **1**, 75 (1956). [3]  
 Awe W., Reinecke I., Thum J., *Naturwissenschaften*, **41**, 528 (1954).  
 Balenović K., Cerar D., *J. Chem. Soc.*, **1955**, 1631.  
 Beck M. T., Császár J., *Acta chim. Hung.*, **7**, 465 (1955). [1]  
 Beck M. T., Ébrey P., *Mag. Kém. Folyóirat*, **59**, 350 (1953), *Acta chim. Hung.*, **4**, 231 (1954). [2]  
 Bentley H. R., Whitehead J. K., *Nature*, **164**, 182 (1949). [1]  
 Bentley H. R., Whitehead J. K., *Biochem. J.*, **46**, 341 (1950). [2]  
 Bergeret B., Chatagner F., Fromageot C., *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 147 (1952).  
 Bergström S., Pääbo K., *Acta chem. Scand.*, **3**, 202 (1949).  
 Berlingozzi S., Adem bri G., Bucci G., *Gazz. chim. Ital.*, **84**, 393 (1954).  
 Bickel H. и corp., *Acta paediatr.*, **42**, Suppl., **90**, 1—237 (1952).  
 Black S., Wright N. G., *J. biol. Chem.*, **213**, 27 (1955).  
 Block R. J., *Science*, **108**, 608 (1948). [1]

- Block R. J., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 72, 337 (1949). [2]  
 Block R. J., Food Ind., 25, 824 (1950). [3]  
 Block R. J., Arch. Biochem. Biophys., 31, 267 (1951). [4]  
 Bode F., Biochem. Z., 326, 433 (1955); Bode F., Hübener H. J., Brückner H., Hoeres K., Naturwissenschaften, 39, 524 (1952).  
 Boissonas R. A., Helv. chim. Acta, 33, 1957 (1950). [1]  
 Boissonas R. A., Helv. chim. Acta, 33, 1966 (1950). [2]  
 Boissonas R. A., Helv. chim. Acta, 33, 1972 (1950). [3]  
 Boissonas R. A., Lo Bianco S., Experientia, 8, 425 (1952). [4]  
 Bonetti E., Dent C. E., Biochem. J., 57, 77 (1954).  
 Boser H., Z. physiol. Chem., 296, 10 (1954).  
 Boulanger P., Biserte G., Bull. Soc. Chim. biol., 31, 696 (1949). [1]  
 Boulanger P., Biserte G., Bull. Soc. Chim. biol., 33, 1930 (1951). [2]  
 Boulanger P., Biserte G., Courtot F., Bull. Soc. Chim. biol., 34, 366 (1952). [2b]  
 Boulanger P., Biserte G., Scriban R., Ann. Nutrition Alimentation, 5, 149 (1951). [3]  
 Boulanger P., Osteux R., Compt. rend., 238, 406 (1954). [4]  
 Bowden C. H., MacLagan N. F., Wilkinson, Biochem. J., 59, 93 (1955).  
 Braun P., Földi M., Kisfaludy S., Szabó Gy., Nature, 177, 1134 (1956). [1]  
 Braun P., Kisfaludy S., Dubsky M., Orvosi Hetilap, 95, 682 (1954). [2]  
 Brenner M., Müller H. R., Lichtenberg E., Helv. chim. Acta, 35, 217 (1952).  
 Brimley R. C., Nature, 163, 245 (1949).  
 Brush M. K., Boutwell R. K., Barton A. D., Heidelberger C., Science, 113, 4 (1951).  
 Bull H. B., Hahn J., Baptist V. H., J. Am. Chem. Soc., 71, 550 (1949).  
 Burma D. P., Banerjee B., Science and Culture (India), 15, 363 (1950). [1]  
 Burma D. P., Banerjee B., J. Indian chem. Soc., 28, 655 (1951). [2]  
 Clarkson T. W., Biochim. biophys. Acta, 18, 453 (1955).  
 Clayton R. A., Strong F. M., Anal. Chem., 26, 1362 (1954).  
 Connel G. E., Dixon G. H., Hanes C. S., Canad. J. Biochem. Physiol., 33, 416 (1955).  
 Consden R., Nature, 162, 359 (1948). [1]  
 Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Biochem. J., 38, 224 (1944). [2]  
 Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Biochem. J., 40, 33 (1946). [3]  
 Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Biochem. J., 41, 590 (1947). [4]  
 Cornforth J. W., Dalgliesh C. E., Neuburger A., Biochem. J., 48, 598 (1951).  
 Coulson C. B., J. Sci. Food Agr., 6, 674 (1955).  
 Crumpler H. R., Dent C. E., Nature, 164, 441 (1949). [1]  
 Crumpler H. R., Dent C. E., Harris H., Westall R. G., Nature, 167, 307 (1951). [2]  
 Curzon G., Giltrow J., Nature, 172, 356 (1953). [1]  
 Curzon G., Giltrow J., Nature, 173, 314 (1954). [2]  
 Dalgliesh C. E., Nature, 166, 1076 (1951). [1]  
 Dalgliesh C. E., J. Chem. Soc., 1952, 137, 3940. [2]  
 Dalgliesh C. E., J. Chem. Soc., 1952, 3943. [3]  
 Decker P., Riffart W., Chem. Ztg., 74, 261 (1950). [1]  
 Decker P., Riffart W., Oberneder G., Naturwissenschaften, 38, 288 (1951). [2]  
 Dent C. E., Biochem. J., 41, 240 (1947). [1]  
 Dent C. E., Biochem. J., 43, 169 (1948). [2]  
 Dent C. E., в книге Dyke S. C. (red.); Recent Advances in Clinical Pathology, 2, изд. Churchill, London, 1951, pp. 238—258. [3]  
 Dent C. E., Schilling J. A., Biochem. J., 44, 318 (1949). [4]  
 Dent C. E., Walshe J. M., Brit. med. Bull., 10, 247 (1954). [5]  
 de Verdier C. H., Ågren G., Acta chem. Scand., 2, 783 (1948).  
 Done J., Fowden L., Biochem. J., 51, 451 (1952).  
 Dragúnová L., Langer P., Nature, 178, 537 (1956).  
 Drell W., J. Am. Chem. Soc., 77, 5429 (1955).  
 Edman P., Arkiv. Kemi, Mineral. Geol., 22A, No. 3 (1954).  
 Ellfolk N., Syngé R. L. M., Biochem. J., 59, 523 (1955).  
 Erdem B., Prijs B., Erlenmeyer, Helv. chim. Acta, 38, 267 (1955).  
 Evered F. D., Biochem. J., 62, 416 (1956).

- Fawcett D. M., Kirkwood S., *J. biol. Chem.*, 204, 787 (1953).  
 Fearon W. R., Bell E. A., *Biochem. J.*, 59, 221 (1955).  
 Fialová Z., Disertace, Karlova university, Praha, 1952—1953.  
 Fink R. M., Dent C. E., Fink K., *Nature*, 160, 801 (1947).  
 Fisher R. B., Parsons D. S., Holmes R., *Nature*, 164, 183 (1949). [1]  
 Fisher R. B., Parsons D. S., Morrison G. A., *Nature*, 161, 764 (1948). [2]  
 Fischer F. G., Dörfel H., *Biochem. Z.*, 324, 544 (1953).  
 Fletcher K., Stanley P. G., *Nature*, 175, 730 (1955).  
 Fowden L., *Biochem. J.*, 48, 327 (1951); 50, 355 (1952). [1]  
 Fowden L., *Nature*, 176, 347 (1955). [2]  
 Fowden L., Penney J. R., *Nature*, 165, 846 (1950). [3]  
 Friedberg F., *Naturwissenschaften*, 41, 141 (1954).  
 Gal E. M., *Science*, 111, 677 (1950). [1]  
 Gal E. M., Greenberg G. M., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 71, 88 (1949). [2]  
 Gilligan D. R., Moor J. R., Warren S., *J. nat. Cancer Inst.*, 12, 657 (1951).  
 Giri K. V., Kalyankar G. D., *Nature*, 40, 224 (1953). [1]  
 Giri K. V., Krishnamurthy K., Venkitasubramanian, *J. Ind. Inst. Sci.*, 34, 209 (1952). [2]  
 Giri K. V., Nagabhushanam A., *Naturwissenschaften*, 39, 548 (1952). [3]  
 Giri K. V., Radhakrishnan A. N., Vaidyanathan C. S., *Anal. Chem.*, 24, 1677 (1952). [4]  
 Giri K. V., Radhakrishnan A. N., Vaidyanathan C. S., *J. Indian Inst. Sci.*, 35, 145 (1953). [5]  
 Goldberg H. J. V., Gilda J. E., Tishkoff G. H., *J. dental Research*, 27, 493 (1948).  
 Gorbach G., edic G., Philippi E. H., *Z. physiol. Chem.*, 301, 185 (1955).  
 Gordon A. H., *Biochem. J.*, 45, 99 (1949).  
 Grassmann W., von Armin K., *Ann.*, 519, 192 (1953). [1]  
 Grassmann W., Hannig K., Plöckl M., *Z. physiol. Chem.*, 299, 258 (1955). [2]  
 Grobbelaar N., Pollard J. K., Steward F. C., *Nature*, 175, 703 (1955).  
 Gross J., *Brit. med. Bull.*, 10, 218 (1954). [1]  
 Gross J., Leblond C. P., Franklin A. E., Quastel J. H., *Science*, 111, 605 (1950). [2]  
 Gross J., Pitt-Rivers R., *Lancet*, 1, 439 (1952). [3]  
 Hackman R. H., Lazarus M., *Biochim. biophys. Acta*, 17, 147 (1955).  
 Hagdahl L., Tiselius A., *Nature*, 170, 799 (1952).  
 Hais I. M., *Českoslov. Farmacie*, 1, 681 (1952). [1]  
 Hais I. M., Franc Z., неопубликованные данные. [2]  
 Hais I. M., Horešovský O., *Chem. Listy*, 48, 549 (1954). [3]  
 Hanes C. S., Hird F. J. R., Isherwood F. A., *Nature*, 166, 288 (1950).  
 Hardy T. L., Holland D. O., Nayler J. H. C., *Anal. Chem.*, 27, 971 (1955).  
 Heyns K., Anders G., *Z. physiol. Chem.*, 287, 8 (1951).  
 Hiller E., Zinnert F., Frese G., *Biochem. Z.*, 323, 245 (1952); 324, 93 (1953).  
 Horner L., Schwahn H., *Ann.*, 591, 99 (1955).  
 Chaikoff I. L., Taurog A., Wheat J. D., *Proc. Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy*, Geneva, 1955. Vol. 12, United Nations, New York, 1956, p. 466.  
 Chakraborty K. P., Ganguli N. C., *Naturwissenschaften*, 42, 580 (1955).  
 Channing D. M., Young G. T., *J. Chem. Soc.*, 1953, 2481.  
 Chantrenne H., *Arch. intern. Physiol.*, 61, 558 (1953), *РЖХим.*, 1954, № 34238.  
 Chargaff E., Levine C., Green C., *J. biol. Chem.*, 175, 67 (1948).  
 István K., *Mag. Kém. Folyóirat*, 59, 252 (1953).  
 Jenšovský L., *Chem. Listy*, 49, 940 (1955).  
 Jepson J. B., Smith I., *Nature*, 172, 1100 (1953). [1]  
 Jepson J. B., Smith I., *Nature*, 177, 84 (1956). [2]  
 Евстигнеева Г., Кротович В. Л., *ДАН СССР*, 93, 1069 (1953).  
 Jirgensons B., *Univ. Texas Pubs.*, 5109, 56 (1951).  
 Jones T. S. G., *Biochem. J.*, 42, lix (1948).  
 Kácl K., Ledvina M., *Chem. Listy*, 47, 242 (1953).  
 Kawerau E., Wieland T., *Nature*, 168, 77 (1951).  
 Keil B., *Chem. Listy*, 48, 725 (1954). [1]  
 Keil B., в книге *Chromatografie. Přírodověd. nakl. Praha*, 1952, str. 102. [2]  
 Kemali D., Porcellati G., *Acta neurol.*, 8, 321 (1953).  
 Kemble A. R., Macpherson H. T., *Nature*, 170, 664 (1952).  
 Kirby-Berry H., *Univ. Texas Pubs.*, 5109, 88 (1951). [1]

- Kirby-Berry H., Univ. Texas. Pubs., 5109, 157 (1951). [2]  
 Kirby-Berry H., Cain L., Arch. Biochem., 24, 179 (1949). [3]  
 Kirby-Berry H., Sutton H. E., Cain L., Berry J. S., Univ. Texas Pubs., 5109, 22 (1951). [4]  
 Knudson Jr. A. G., Nature, 176, 830 (1955).  
 Kofrányi E., Z. physiol. Chem., 299, 129 (1955).  
 Koloušek J., Sborník ČsAZV, 26A, 221 (1953). [4]  
 Koloušek J., Sborník ČsAZV, rostl. Výroba, 28, 969 (1955). [2]  
 Koloušek J., Coulson C. B., Chem. Listy, 46, 186 (1952), J. Sci. Food Agric., 6, 380 (1955). [3]  
 Koloušek J., Kutáček M., Sborník Pathofysiol. Trávení Výživy, 7, 293 (1953). [4]  
 Koloušek J., Michalík S., Sborník ČsAZV, 27A, 281 (1954). [5]  
 Kopoldová J., Čas. Lékařů čes., 89, 416 (1950). [1]  
 Kopoldová J., Sborník lékařský, 52, 90 (1950). [2]  
 Kosikovsky F. V., J. Dairy Sci., 34, 235 (1951).  
 Kotake M., Sakan T., Nakamura N., Senoh S., J. Am. Chem. Soc., 73, 2973 (1951).  
 Král J., Haš I. M., Ženíšek A., Čas. Lékařů čes., 92, 62 (1953). [1]  
 Král J., Ženíšek A., Čas. Lékařů čes., 93, 1155 (1954). [2]  
 Kuhn R., Ruelius H. W., Chem. Ber., 83, 420 (1950).  
 Lambooy J. P., J. Am. Chem. Soc., 76, 133 (1954).  
 Landua A. J., Awapara J., Science, 109, 385 (1949). [1]  
 Landua A. J., Fuerst R., Awapara J., Anal. Chem., 23, 163 (1951). [2]  
 Lemmon R. M., Tarpey W., Scott K. G., J. Am. Chem. Soc., 72, 758 (1950).  
 Levy A. L., Nature, 174, 126 (1954). [1]  
 Levy A. L., Chung D., Anal. Chem., 25, 396 (1953). [2]  
 Lindner G., Naturwissenschaften, 43, 201 (1956).  
 Lingood F. V., Woiswod A. J., Brit. J. exp. Pathol., 30, 93 (1949).  
 Lissitzky S., Bull. Soc. Chim. biol., 37, 89 (1955).  
 Livermore A. H., Muecke I. C., Nature, 173, 265 (1954).  
 McFarren E. F., Anal. Chem., 23, 168 (1951).  
 Мардашев С. Р., Семина Л. А., Вопросы медицинской химии, 1, 66 (1949).  
 Mareček V., Českoslov. Farmacie, 4, 339 (1955).  
 Martin A. J. P., Mittelman R., Biochem. J., 43, 353 (1948).  
 Matsuo Y., Nature, 171, 1021 (1953).  
 Miettinen J. K., Virtanen A. I., Acta chem. Scand., 3, 459 (1949).  
 Mikeš O., Chem. Listy, 51, 138 (1957). [4]  
 Mikeš O., Holeyšovský V., Chem. Listy, 51, 1497 (1957). [2]  
 Milletti M., Ann. Chimica, 43, 338 (1953).  
 Mills C. F., Biochem. J., 57, 603 (1954).  
 Miura K., J. agr. chem. Soc. Japan, 23, 369 (1950—1951); C. A., 46, 11040 (1952).  
 Mortreuil M., Khouvine Y., Bull. Soc. Chim. biol., 36, 425 (1954).  
 Moor J. R., Gilligan D. R., J. nat. Cancer Inst., 12, 691 (1951).  
 Moore S., Stein W. H., J. biol. Chem., 176, 367 (1948). [4]  
 Moore S., Stein W. H., J. biol. Chem., 211, 907 (1954). [2]  
 Mueller G. C., Bowman G., Herranen A., Anal. Chem., 27, 1357 (1955).  
 Müting D., Naturwissenschaften, 39, 303 (1952). [1]  
 Müting D., Z. ges. innere Med., 9, 638 (1954). [2]  
 Müting D., Z. physiol. Chem., 297, 61 (1954). [3]  
 Naftalin L., Nature, 161, 763 (1948).  
 Nehring K., Schwerdtfeger E., Zimmermann G., Pharmazie, 9, 221 (1954).  
 Nicholson D. E., Nature, 163, 954 (1949).  
 Noworytko J., Sarnecka-Keller M., Acta biochim. Polon., 2, 91 (1955).  
 Oshima Y., Yoshihara S., Sakamoto Y., J. agr. chem. Soc. Japan, 27, 102 (1953).  
 Partridge S. M., Biochem. J., 42, 238 (1948). [4]  
 Partridge S. M., Biochem. J., 44, 521 (1949). [2]  
 Пасхина Т. С., Биохимия, 19, 702 (1954); Труды Комиссии анал. хим., 6 (9), 389 (1955).  
 Pasička A. E., Morgan J. F., Biochim. biophys. Acta, 18, 236 (1955). [4]  
 Pasička A. E., Morgan J. F., Biochim. biophys. Acta, 19, 366 (1956). [2]  
 Patton A. R., Foreman E. M., Science, 109, 339 (1949). [1]  
 Patton A. R., Chism P., Anal. Chem., 23, 1683 (1951). [2]  
 Pernis B., Wunderly Ch., Biochim. biophys. Acta, 11, 209 (1953).  
 Pfennig N., Naturwissenschaften, 41, 62 (1954).

- Phillips D. M. P., *Nature*, **161**, 53 (1948).
- Plattner P. A., Nager U., *Helv. chim. Acta*, **31**, 2203 (1948).
- Polson A., *Biochim. biophys. Acta*, **2**, 575 (1948). [1]
- Polson A., *Biochim. biophys. Acta*, **3**, 205 (1949). [2]
- Polson A., Mosley V. M., Wyckoff R. W. G., *Science*, **105**, 603 (1947). [3]
- Porath J., Flodin P., *Nature*, **168**, 202 (1951).
- Pratt J. J., Auclair J. L., *Science*, **108**, 213 (1948).
- Redfield R. R., *Biochim. biophys. Acta*, **10**, 344 (1953). [1]
- Redfield R. R., Barron E. S. G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **35**, 443 (1952). [2]
- Reed L. J., *J. biol. Chem.*, **183**, 451 (1950).
- Reindel F., Hoppe W., *Naturwissenschaften*, **40**, 221 (1953). [1]
- Reindel F., Hoppe W., *Chem. Ber.*, **87**, 1103 (1954). [2]
- Rhuland L. E., Work E., Denman R. F., Hoare D. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4844 (1955).
- Roberts E., Frankel S., *J. biol. Chem.*, **187**, 55 (1950).
- Rockland L. B., Blatt J. L., Dunn M. S., *Anal. Chem.*, **23**, 1142 (1951). [1]
- Rockland L. B., Underwood J. C., *Anal. Chem.*, **26**, 1557 (1954). [2]
- Roche J., Jutisz M., Lissitzky S., Michel R., *Biochim. biophys. Acta*, **7**, 257 (1951). [1]
- Roche J., Lissitzky S., Michel R., *Biochim. biophys. Acta*, **8**, 339 (1952). [2]
- Roche J., Lissitzky S., Michel R., в книге Glück D. (red.): *Methods of Biochem. Analysis I. Interscience*, New York, 1954, p. 243. [3]
- Roche J., Michel R., *Ann. Review Biochem.*, **23**, 481 (1954). [4]
- Roche J., Michel R., Jouan P., Wolff W., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 819 (1955). [5]
- Roche J., Michel R., Nunez J., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 809 (1955). [6]
- Roche J., Michel R., Tata J., *Biochim. biophys. Acta*, **15**, 500 (1954). [7]
- Roche J., Michel R., Wolf W., Nunez J., *Biochim. biophys. Acta*, **19**, 308 (1956). [8]
- Roland Jr. J. F., Gross A. M., *Anal. Chem.*, **29**, 502 (1954).
- Rosebeek S., *Chem. Weekblad*, **46**, 813 (1950).
- Rösch S., *Die Farbe*, **1**, 1 (1952).
- Rothman S., Sullivan M. B., *J. invest. Dermatol.*, **13**, 319 (1949).
- Ruhemann S., *J. Chem. Soc.*, **97**, 1438 (1910).
- Rydon H. N., Smith P. W. G., *Nature*, **169**, 922 (1952). [1]
- Rydon H. N., Smith P. W. G., *J. Chem. Soc.*, **1955**, 2542. [2]
- Rýzl M., *Disertace*, Karlova universita, Praha, 1952.
- Saifer A., Oreskes I., *Science*, **119**, 124 (1954). [1]
- Saifer A., Oreskes I., *Anal. Chem.*, **28**, 501 (1956). [2]
- Самарина О. П., Крицман М. Г., Якобсон Л. М., Конникова С., *Биохимия*, **15**, 287 (1950).
- Sanger F., Tuppy H., *Biochem. J.*, **49**, 463, 481 (1951).
- Searle J. M., Westall R. G., *Biochem. J.*, **48**, 1 (1951).
- Sen S. P., Burma D. P., *Transact. Bose Res. Inst. (Calcutta)*, **19**, 19 (1952—1953).
- Shaw K. N. F., Fox S. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3421 (1953).
- Schauer H. K., Bulirsch R., *Z. Naturf.*, **10b**, 683 (1955).
- Schwerdtfeger E., *Chem. Technik*, **6**, 192 (1954).
- Свасьян Н. М., Безингер Е. Н., Гаркави П. Г., Кивман Г. Я., *ДАН СССР*, **96**, 343 (1954).
- Sluyterman L. A., Veenendaal H. J., *Rec. Trav. chim.*, **68**, 717 (1949).
- Smith E. L., Tuller E. F., *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**, 114 (1955).
- Smith I., *Nature*, **171**, 43 (1953). [1]
- Smith I., *Ph. D. Thesis*, London, 1955. [2]
- Smrt J., Šorm F., *Chem. Listy*, **46**, 164 (1952).
- Souchon F., Grunau G., *Z. ges. exp. Med.*, **119**, 641 (1952).
- Sourkes T., Heneage P., Trano Y., *Arch. Biochem. biophys.*, **40**, 185 (1952).
- Stein W. H., *J. biol. Chem.*, **201**, 45 (1953). [1]
- Stein W. H., Moore S., *J. biol. Chem.*, **190**, 103 (1951). [2]
- Stein W. H., Moore S., *J. biol. Chem.*, **211**, 915 (1954). [3]
- Steward F. C., Thompson J. F., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1**, 233 (1950). [1]
- Steward F. C., Zacharius R. M., Pollard J. K., *Suomalaisen Tiedeakatemian Toimituksia, A II*, **60**, 322—366 (1955). [2]
- Synge R. L. M., *Biochem. J.*, **48**, 429 (1951). [1]
- Synge R. L. M., Tiselius A., *Acta chem. Scand.*, **3**, 231 (1949). [2]
- Шимков Я. П., *Диссертация*, Москва, 1906.

- Šorm F., Mikeš O., Collection Czechosl. chem. Commun., 15, 288 (1950). [1]  
Šorm F., Šebesta K., Turský T., Chem. Listy, 46, 375 (1952), Collection Czechosl. chem. Commun., 18, 140 (1953). [2]  
Thompson J. F., Steward F. C., Plant Physiol., 26, 421 (1951). [1]  
Thompson J. F., Zacharius R. M., Steward F. C., Plant Physiol., 26, 375 (1951). [2]  
Toennies G., Kolb J. J., Anal. Chem., 23, 823 (1951).  
Underwood J. C., Rockland L. B., Anal. Chem., 26, 1553 (1954).  
Van Halteren B., Nature, 168, 1090 (1951).  
Vavruč I., Chem. Listy, 46, 116 (1952).  
Vigne J. P., Fondarai J., Bull. Soc. chim. France, 1956, 124.  
Virtanen A. I., Angew. Chem., 67, 381 (1955). [1]  
Virtanen A. I., Kari S., Acta chem. Scand., 9, 170 (1955). [2]  
Walker J. S., J. biol. Chem., 218, 549 (1956).  
Weichert R., Acta chem. Scand., 9, 547 (1955).  
Wellington E., Canad. J. Chem., 30, 581 (1952).  
Westall R. G., Biochem. J., 55, 244 (1953). [1]  
Westall R. G., Biochem. J., 60, 247 (1955). [2]  
Wieland T., Angew. Chem., 60, 313 (1948). [1]  
Wieland T., Bauer L., Angew. Chem., 63, 511 (1951). [2]  
Wieland T., Berg A., Angew. Chem., 64, 418 (1952). [3]  
Wieland T., Dose K., Angew. Chem., 66, 781 (1954). [4]  
Wiggins L. F., Williams J. H., Nature, 170, 278 (1952).  
Winegard H. M., Toennies G., Block R. J., Science, 108, 506 (1948).  
Woiwod A. J., Biochem. J., 42, xxviii (1948); 45, 412 (1949). [1]  
Woiwod A. J., Nature, 166, 272 (1950). [2]  
Woodward C. C., Rabideau G. S., Anal. Chem., 26, 248 (1954).  
Work E., Biochim. biophys. Acta, 3, 400 (1949); Nature, 165, 74 (1950); Biochim. J., 49, 17 (1951).  
Wynn V., Williams T. N. W., Nature, 165, 768 (1950).  
Zeníšek A., Král J. A., Biochim. biophys. Acta, 12, 479 (1953).

# ПЕПТИДЫ И ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ

---

Б. Мелон

## Пептиды

В природном материале (животном и растительном) пептиды обычно находятся в смеси с белками и свободными аминокислотами. Прежде чем приступить к хроматографическому разделению пептидов, необходимо отделить их от указанных соединений. Белки чаще всего отделяют осаждением спиртом, трихлоруксусной кислотой, диализом или кипячением. В качестве примера экстракции пептидов из животного материала см. П 88.

Отделение пептидов от аминокислот в большинстве случаев является очень кропотливым делом. Иногда эту задачу можно решить посредством электрофореза на бумаге, и то лишь в тех случаях, если речь идет об основных или кислых пептидах с подвижностью, отличающейся от подвижности аминокислот.

Другим приемом разделения является повторная фенольная экстракция, когда в фенольный слой гораздо легче переходят пептиды, нежели свободные аминокислоты. Можно достигнуть желаемой цели путем применения специальных ионообменных смол типа сульфированных полистиролов (Харрис и Ли [1]). В случае необходимости можно применять и фенилизотиоцианатные методы постепенного расщепления пептидов (стр. 479), когда на первом этапе реакции удаляются все свободные аминокислоты вместе с N-концевой аминокислотой высших пептидов.

При фракционировании смеси пептидов обычно пользуются одним из методов, приведенных на стр. 468. Необходимо также упомянуть о высоко результативном методе разделения пептидного материала, а именно о противоточном распределении, подробное описание которого в рамках этой главы не представляется возможным. Дальнейшее разделение менее сложной смеси пептидов проводится затем обычными методами хроматографирования на бумаге.

### СВЯЗЬ МЕЖДУ СТРОЕНИЕМ И ВЕЛИЧИНОЙ $R_f$

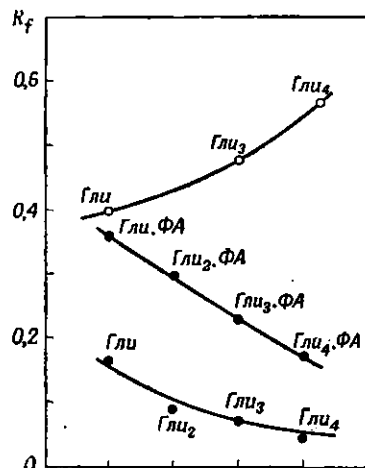
Абсолютные значения  $R_f$  для пептидов в отдельных растворителях не являются полностью воспроизводимыми и часто зависят от влажности в хроматографической камере. Довольно хорошо воспроизводится относи-

тельная величина  $R_f$  пептидов по сравнению с определенной аминокислотой, которая в данной хроматографической системе имеет такую же или весьма близкую величину  $R_f$ . Преимущество этого способа становится очевидным в случае, когда необходимо допустить перетекание фронта растворителя. Контроль процесса хроматографирования облегчается добавлением индикатора; например, нейтральный красный имеет в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) такое же значение  $R_f$ , как и лейцин.

Существует простая зависимость между величиной молекулы пептида и значением  $R_f$ ; с ростом числа аминокислотных остатков в молекуле пептида значение  $R_f$  увеличивается в фенольных растворителях и падает в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода. Эти закономерности

Рис. 187. Зависимость величины  $R_f$  пептидов от количества остатков аминокислот (Гли) (Кук и Леви).

● *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5),  
○ фенол — вода (4 : 1).



приведены на рис. 187. Дипептиды, являющиеся производными цистеиновой кислоты, имеют более высокое значение  $R_f$  в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, если на аминоконце имеется цистеиновая кислота, нежели пептиды одинакового суммарного состава с цистеиновой кислотой на карбоксильном конце. Аналогичные зависимости распространяются и на пептиды, содержащие аргинин. Большое число пептидов, содержащих валин или лейцин, имеет в смеси бутанол — уксусная кислота более высокое значение  $R_f$ , нежели лейцин.

Расчету величины  $R_f$  пептидов на основе предположения аддитивности групповых констант посвящена работа Парди.

### ОБНАРУЖЕНИЕ ПЕПТИДОВ

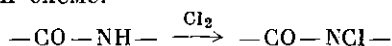
Обычно применяемой и весьма чувствительной для низших пептидов реакцией является проявление нингидрином. Эту реакцию проводят путем погружения хроматограммы в 0,2—0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне. Пятна пептидов с более длинной цепочкой имеют сначала иной оттенок и только спустя определенное время, когда интенсивность окраски уже не увеличивается (приблизительно через 24 час), пятна приобретают обычный сине-фиолетовый цвет. Некоторые пептиды, главным образом производные цистеиновой кислоты, плохо реагируют с нингидрином.

При проявлении пептидов 0,025%-ным раствором нингидрина на бумаге появляется лишь слабое окрашивание, но непрореагировавшую часть пептидов можно элюировать из бумаги и после гидролиза определить содержание аминокислот. При работе с нингидрином, как правило, не рекомендуется нагревать бумагу. Проявленные нингидрином пятна на

бумаге с течением времени бледнеют. Их стойкость значительно повышается при погружении хроматограммы в 1 %-ный раствор азотнокислой меди в ацетоне (Виланд и Каверау [2]).

Другим методом обнаружения пептидов является флуоресценция пятен, которая возникает после нагревания хроматограммы в течение продолжительного времени при 105—110°. При этом способе обнаружения необходимо стремиться к тому, чтобы хроматограммы не соприкасались с парами фенола, особенно при сушке (Зангер и Туппи [4]).

Реакция нингидрина с высшими пептидами требует относительно большого количества исходного материала. Чувствительным методом для анализа этих соединений является хлорирование пептидной связи, протекающее по следующей схеме:



Хлор, связанный с азотом, лабилен и отщепляет от йодистого калия йод. Чувствительность реакции и стойкость окраски повышаются при добавлении бензидаина или толидина (Рейндель и Хоппе; Д 76). В отличие от нингидринового способа этим методом можно определять и циклические пептиды, и пептиды с замещенной аминогруппой.

### Специальные проявляющие реактивы

Наиболее известно взаимодействие пептидов с реактивом Сакагути, содержащим аргинин. Хорошо зарекомендовала себя модификация этого метода, согласно которой используют 8-оксихинолин (Джепсон и Смит; Д 104в). Многие пептиды гистидина и тирозина дают с реактивом Паули и его модификациями (Д 51) более интенсивное окрашивание, нежели с нингидрином. Триптофановые пептиды можно идентифицировать либо реакцией с *n*-диметиламинобензальдегидом (Д 102), либо с коричневым альдегидом (Виланд [1]; Д 92б) в атмосфере газообразного HCl. В первом случае возникает синее окрашивание, во втором — коричневое. Тирозиновые пептиды реагируют с  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом (Ашэ и Кроккер; Д 122). Пептиды со связанным цистеином, цистином, метионином или метионинсульфоксидом можно идентифицировать йодоплатиновой кислотой (Д 84б, Теннис и Кольб [2]). Пролиновые пептиды дают с изатином синее окрашивание, если пролин присутствует в виде N-концевой аминокислоты (Ашэ и сотрудники [2]; Д 114).

Микробиологическое проявление применяется при исследовании пептидов с высокой биологической активностью, например антибиотиков или факторов роста. У токсичных пептидов наличие активных компонентов определяют непосредственной пробой на животных.

Радиоавтография—важное средство при выделении пептидов, содержащих радиоактивный элемент; например, таким способом можно обнаружить пептиды с радиоактивной серой (метиониновые пептиды) или пептиды с радиоактивным фосфором (при исследовании активных центров ферментов после реакции с меченым диизопропилфторфосфатом; Шаффер и сотр.).

### Методика проявления пептидов на бумаге

При одномерном хроматографировании в большинстве случаев пептиды проявляют при помощи опрыскивания (концентрированным раствором нингидрина или других специфических реактивов) узких полосок бумаги, отрезанных с краев хроматограммы.

## НАНЕСЕНИЕ ОБРАЗЦОВ НА БУМАГУ

Образцы пептидов наносят на бумагу с помощью капилляров. Целесообразно наносить пептиды растворенными в смеси пропанол — вода (1 : 4), которая, с одной стороны, предотвращает излишнее растекание образца на бумаге, а с другой — избирательно растворяет пептидный материал, получающийся после элюции с фенольных или крезольных хроматограмм.

## ОРИЕНТИРОВОЧНЫЕ ОПЫТЫ

В отличие от хроматографии аминокислот, для которой применяют стандартные растворители, рекомендуется перед каждым опытом по препаративному разделению смеси пептидов изучить ряд хроматографических систем и выбрать ту, которая обладает оптимальной разделяющей способностью. В качестве примера можно привести пептиды, которые имеют в смеси бутанола с уксусной кислотой весьма малое значение  $R_f$ , так что их разделение заняло бы много времени, и, наоборот, в феноле имеют слишком высокое значение  $R_f$ . Для таких пептидов рекомендуют обычно систему, содержащую бутанол, уксусную кислоту и фенол. Другой задачей предварительных опытов является установление необходимой ширины хроматографической бумаги, на которую нужно нанести данное количество смеси пептидов. Известное количество пептидного материала (например, 1/30) наносят на полосу длиной 1 см и на основании ориентировочного хроматографирования определяют общую длину линии, на которую необходимо нанести оставшееся основное количество пептидов. Если в нашем распоряжении имеется небольшое количество материала, то такие предварительные опыты лучше всего проводить методом восходящей двумерной хроматографии, где одно нанесение оказывается достаточным для испытания двух систем.

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Для разделения пептидов пользуются обычно такими же системами растворителей, как и для разделения аминокислот. Для разделения пептидов основного характера рекомендуют системы, содержащие фенол или крезол, для нейтральных пептидов — смеси, содержащие бутанол и уксусную кислоту, или системы, содержащие амиловый спирт; для кислых пептидов, главным образом для пептидов цистеиновой кислоты, рекомендуют системы, содержащие соединения основного характера, например пиридин.

Из большого числа рекомендованных хроматографических систем растворителей мы приведем лишь некоторые, хорошо зарекомендовавшие себя при разделении пептидов:

Фенол, насыщенный 0,3%-ным аммиаком

m-Крезол, насыщенный 0,03%-ным аммиаком

Коллидин, насыщенный водой

Пиридин — изоамиловый спирт — вода (1 : 1 : 2)

2-Бутанол — 3%-ный аммиак (1 : 1)

А—*n*-бутанол—уксусная кислота—  
вода (4:1:5);  
Б—смесь, состоящая из равных объе-  
мов смесей а) 1246 мл *n*-бута-  
нола с 84 мл воды и б) 620 мл  
пропионовой кислоты с 790 мл  
воды;  
В—2-бутанол—3%-ный аммиак (3:1);

Г—пиридин—изоамиловый спирт—вода  
(7 : 7 : 6);  
Д—коллоид, насыщенный водой;  
Е—фенол—вода (4 : 1);  
Ж—фенол с 28% воды;  
З—фенол + 0,3% аммиака;  
И—м-крезол + 3% аммиака;  
К—м-крезол + 0,03% аммиака.

Дипептид или высший пептид	А	Б	В <sup>а)</sup>	Г	Д	Е	Ж	З	И	К
		R <sub>Глу</sub>				R <sub>Глу</sub>				
Ала·Ала	—	—	—	0,15	—	—	0,66	—	—	—
Ала·Арг	0,14	—	Арг	—	—	—	0,91	—	—	—
Ала·Глу	0,34	—	Глу	—	—	—	—	—	—	—
Ала·Гли	—	—	—	0,12	0,32	—	0,58	0,65	—	0,29
Ала·Л	—	—	—	0,34	—	—	0,76	—	—	—
Ала·Сер	0,23	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Арг·Ала	0,26	—	Арг	—	—	—	0,91	—	—	—
Арг·Глу	0,19	—	Глу <sup>1/4</sup>	—	—	—	0,67	—	—	—
Арг·Гли	0,25	—	Лиз	—	—	—	0,89	—	0,67	—
Арг·Л	0,56	—	Мет	—	—	—	0,95	—	—	—
Арг·ФА	0,50	—	Вал	—	—	—	0,94	—	—	—
Арг·Трипт	0,46	—	Вал	—	—	—	0,93	—	—	—
Арг·Тир	0,38	—	Сер	—	—	—	0,88	—	—	—
Арг·ЦиSO <sub>3</sub> H	—	0,25	—	—	—	—	—	—	—	—
Асп·Глу	—	—	—	—	—	—	—	0,05	—	—
Асп·Гли	—	—	—	0,04	—	—	0,14	—	—	—
ЦиSO <sub>3</sub> H·Ала	—	0,80	—	—	—	0,30	—	—	—	—
ЦиSO <sub>3</sub> H·Глу	—	0,50	—	—	—	0,50	—	—	—	—
ЦиSO <sub>3</sub> H·Гли	—	0,50	—	—	—	0,26	—	0,10	—	—
ЦиSO <sub>3</sub> H·ФА	—	1,40	—	—	—	1,10	—	—	—	—
ЦиSO <sub>3</sub> H·Вал	—	1,30	—	—	—	1,00	—	—	—	—
Глу·Арг	—	—	—	—	—	—	—	0,11	—	—
Глу·ЦиSO <sub>3</sub> H	—	0,42	—	—	—	0,23	—	—	—	—
Глу·Лис	—	—	—	—	—	—	—	0,40	—	—
Глу·ФА	0,65	—	Арг	—	—	—	—	—	—	—
Гли·Ала	0,37	—	—	—	0,32	—	—	0,63	—	0,29
Гли·Арг	0,16	—	Арг	—	—	—	0,88	—	—	—
Гли·Асп	—	—	—	0,04	—	—	0,09	—	—	—
Гли·Глу	—	—	—	—	—	—	—	0,18	—	—
Гли·Гли	0,09	—	—	—	0,28	—	—	0,54	—	0,18
Гли·ОНпр	—	—	—	—	0,28	—	—	0,59	—	0,25
Гли·Л	—	—	—	0,29	0,53	—	0,72	0,79	—	0,66
Гли·ФА	0,36	—	—	—	0,79	—	—	0,70	—	0,72
Гли·Про	—	—	—	—	0,34	—	—	0,69	—	0,69
Гли·Трипт	—	—	—	0,34	0,85	—	0,70	0,66	—	0,63
Гли·Тир	—	—	—	0,27	—	—	0,55	—	—	—
Гли·Вал	—	—	—	—	0,47	—	—	0,74	—	0,51
Гис·Л	—	—	—	—	—	—	—	—	0,86	—
ИЛ·Арг	0,56	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Л·Ала	0,72	—	Л	0,37	—	—	0,82	—	—	—
Л·Асп	—	—	—	0,11	—	—	0,37	—	—	—
Л·Цис	—	—	—	0,34	—	—	0,69	—	—	—
Л·ЦиSO <sub>3</sub> H	—	—	—	—	—	—	—	0,43	—	—

Продолжение табл. 79

Дипептид или высший пептид	А	Б	В <sup>а)</sup>	Г	Д	Е	Ж	З	И	К
		R <sub>Глу</sub>				R <sub>Глу</sub>				
Л·Глу	—	—	—	0,12	—	—	0,48	—	—	—
Л·Гли	—	—	—	0,31	0,61	—	0,78	0,78	—	0,62
Л·Гис	—	—	—	0,31	—	—	0,95	—	—	—
Л·Л	—	—	—	0,54	0,89	—	0,87	0,84	—	0,85
Л·Трипт	—	—	—	—	0,95	—	—	0,83	—	0,83
Л·Вал	—	—	—	—	0,56	—	—	—	—	—
Лиз·Ала	—	—	—	—	—	—	—	—	0,57	—
Лиз·Арг	0,13	—	Глу	—	—	—	0,95	—	—	—
Лиз·Лиз	0,05	—	Глу	—	—	—	—	—	—	—
ФА·Арг	0,38	—	Ил	—	—	—	0,96	—	—	—
ФА·ЦиSO <sub>3</sub> H	—	1,10	—	—	—	1,60	—	—	—	—
Про·Арг	0,25	—	Сер	—	—	—	—	—	—	0,95
Про·Гли	—	—	—	—	0,49	—	—	0,68	—	0,55
Про·ФА	—	—	—	0,39	—	—	0,97	—	—	—
Сер·ЦиSO <sub>3</sub> H	—	0,35	—	—	—	—	—	—	—	—
Сер·Гли	0,33	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Сер·Гис	—	—	—	—	—	—	—	—	0,30	—
Сер·Сер	—	—	—	0,11	—	—	0,25	—	—	—
Сер·Тир	0,42	—	Про	—	—	—	—	—	—	—
Тр·ЦиSO <sub>3</sub> H	—	0,50	—	—	—	0,26	—	—	—	—
Тр·Про	—	—	—	—	—	—	—	0,81	—	—
Тир·Гли	—	—	—	—	0,95	—	—	0,59	—	0,33
Тир·Л	—	—	—	—	0,69	—	—	—	—	—
Вал·Асп	—	—	—	—	—	—	—	0,38	—	—
Вал·ЦиSO <sub>3</sub> H	—	1,10	—	—	—	1,00	—	0,32	—	—
Вал·Глу	—	—	—	—	—	—	—	0,47	—	—
Вал·Гли	—	—	—	—	0,53	—	—	0,73	—	0,48
Гли·Гли·Л·Гли	—	—	—	—	0,71	—	—	0,75	—	0,67
Гли·Ала·Гли·Тир	—	—	—	0,26	—	—	0,81	—	—	—
Гли·Тир·Гли	—	—	—	0,26	—	—	0,57	—	—	—
Ала·Гли·Гли	—	—	—	—	0,46	—	—	0,63	—	0,29
Л·Ала·Ала	—	—	—	0,34	—	—	0,94	—	—	—
Л·Ала·Гли	—	—	—	0,28	—	—	0,86	—	—	—
Л·Гли·Ала	—	—	—	0,29	—	—	0,87	—	—	—
Л·Гли·Асп	—	—	—	0,10	—	—	0,46	—	—	—
Л·Гли·Гли	—	—	—	—	0,55	—	—	0,75	—	0,60
Л·Гли·Л	—	—	—	0,51	—	—	0,96	—	—	—

а) Подвижность пептидов зависит от подвижности приведенных аминокислот.

Таблица составлена по данным следующих авторов: Найта, Гофмана и сотрудников, Уайта и Ландмана [2], Зангера и Туппи [2], Флавина и Амфинсена, Торо и Алэ, Вальдшмидт-Лейтца и Цейсса [2], Хейнса и Андерса.

Пиридин — вода (4 : 1)

*n*-Бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5)

*n*-Бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10)

2-Бутанол — муравьиная кислота — вода (76 : 8 : 24)

*n*-Бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин (15 : 3 : 12 : 10)

Метилэтилкетон — пиридин — вода (70 : 15 : 15)

Довольно широко используют смесь *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). В этой системе часто проводят повторное хроматографирование. Значения  $R_f$  для некоторых пептидов приведены в табл. 79.

### ВЫМЫВАНИЕ ПЕПТИДОВ ИЗ БУМАГИ

Из хроматограмм пептиды вымывают водой или водой, насыщенной хлороформом, чтобы предотвратить случайное влияние бактерий. С этой же целью сосуд, в котором осуществляют процесс элюции, помещают в склянки, содержащие фенол (см. рис. 92). При вымывании пептидов из хроматограмм всегда имеют место потери, которые для бумаги ватман 1 составляют около 20%. Известно, что при гидролизе метиониновых и тирозиновых элюатов в значительной степени разрушаются выделенные метионин и тирозин (Ашэ и сотрудники [31]). Этих потерь отчасти можно избежать, если бумагу перед хроматографированием промыть разбавленной муравьиной кислотой и водой (Уайт и Ландман [2]).

### КРИТЕРИЙ ЧИСТОТЫ ПЕПТИДОВ

Пептид считается индивидуальным соединением, если не менее чем в трех растворителях он ведет себя как отдельное вещество и при динитрофенилировании показывает наличие лишь одной концевой аминокислоты. Другим доказательством индивидуальности пептидов является специфическое поведение на хроматограмме соответствующего динитрофенилированного пептида.

### ОКИСЛЕНИЕ И ДЕСУЛЬФИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ

В процессе обработки пептидов часто имеет место неполное окисление пептидов, содержащих метионин и цистеин. При хроматографировании это обстоятельство проявляется в том, что пятна пептидов заметно удлиняются и один исходный пептид может давать несколько пятен, соответствующих различным степеням окисления. Поэтому целесообразно такую пептидную смесь предварительно полностью окислить. Для этой цели чаще всего применяют надмуравьиную кислоту, которая окисляет метионин до метионинсульфона и цистеин до цистеиновой кислоты (Теннис и Хомиллер [1]). Побочной реакцией является разложение триптофана и частичное разложение тирозина. При низкой температуре можно в значительной степени избежать этих побочных реакций. В качестве примера окисления надмуравьиной кислотой см. II 89.

Пептиды, содержащие цистин, проявляют после окисления совершенно другие свойства. Они имеют кислый характер и обладают обычно меньшей величиной  $R_f$  по сравнению с исходными пептидами. Точно так же метиониновые пептиды имеют после окисления меньшую величину  $R_f$ , но остаются нейтральными.

Другим способом стабилизации пептидов, содержащих S-аминокислоты, является удаление серы с помощью активного никеля W 6, который аналогично действует и на белки. В результате этой реакции цистин превращается в аланин, а метионин — в  $\alpha$ -аминомасляную кислоту (Вуд и сотрудники).

Пептиды, содержащие триптофан, можно в значительной степени стабилизировать гидрогенизацией, т. е. переводом в октагидротриптофан, который в отличие от триптофана обладает основными свойствами и устойчив к окислению (Мелоун и Шорм).

## Химическое исследование строения белков и пептидов

Современные представления о строении белков основаны на пептидной теории, согласно которой белок состоит из одной или нескольких пептидных цепочек. Эти цепочки включают большое число аминокислот, связанных между собой пептидными связями  $-\text{CO}-\text{NH}-$ .

Основное требование к анализу белков и пептидов состоит в том, чтобы испытуемое вещество не было загрязнено другими белками или пептидами, и в особенности свободными аминокислотами. Первые сведения о составе белков мы получаем при количественном и качественном анализе полного гидролизата белка. В химии белков состав белков и пептидов чаще всего выражают числом остатков аминокислот, содержащихся в одной молекуле белка или пептида. В зависимости от количества остатков выбирается метод, который необходимо применить, чтобы результаты количественных анализов были однозначными.

Связь между числом аминокислотных остатков и допустимой ошибкой метода приведена ниже (Тристам):

Число остатков	1	2	4	8	12	16	24	32	48	96
Допустимая ошибка метода, %	40	20	10	5	3,3	2,5	1,6	1,25	0,8	0,4

Для определения аминокислот было разработано несколько методов, основанных на хроматографии на бумаге (см. раздел, посвященный определению аминокислот, стр. 434).

Дальнейшим шагом на пути к определению структуры белков и пептидов является определение концевых групп. N-Концевой обозначают ту аминокислоту, которая имеет в пептидной цепочке свободную  $\alpha$ -аминогруппу, С-концевой обозначают ту, которая имеет свободную карбоксильную группу. Для определения концевых аминокислот служат различные методы; некоторые из них будут приведены далее. В последнее время было разработано несколько методов, основанных на принципе постепенного расщепления пептидов. Эти методы позволяют определить порядок чередования аминокислот в одной пробе исследуемого пептида.

Подробнее структура белков определяется анализом частичных гидролизатов, полученных либо кислотным, либо ферментативным гидролизом. При этом выделяют отдельные пептиды, образовавшиеся при расщеплении белков, и в них определяют последовательность аминокислот. Применяя различные виды гидролиза, мы тем самым стремимся обнаружить пептидные осколки, в которых аминокислоты взаимно перекрывали бы друг друга. Например, последовательность чередования аминокислот в пептидах, которые содержат аминокислоты *A*, *B*, *C*, *D*, *E* и *F*, можно установить, если мы обнаружим пептиды *A·B·C* и *D·E·F*, а также еще не менее одного пептида, например *C·D*, который обуславливает непрерывность в пептидной цепочке (см. стр. 492).

На основании результатов, полученных при определении структуры отдельных пептидов, возникает представление о соответствующих фрагментах белковой молекулы. Классическим примером применения метода хроматографии на бумаге при исследовании белков являются работы Зангера [1, 3, 4], которые завершились объяснением структуры инсулина (Райл и сотрудники).

Важнейшим шагом на пути к выяснению строения пептидов и белков, содержащих цистин, явилось окисление надмуравьиной кислотой, что

позволило выделить пептидные цепочки, соединенные дисульфидными мостиками; последующий частичный гидролиз дает удобные для анализа цистеиновые пептиды. Об этом методе см. подробнее на стр. 464.

После этого краткого введения приводится обзор некоторых видов гидролиза и методов применения хроматографии на бумаге для изучения строения белков и пептидов.

## ГИДРОЛИЗ

### Полный гидролиз

Самым обычным способом полного гидролиза белков или пептидов является нагревание пептидов с 30—100-кратным количеством 6 н. соляной кислоты при 105° в течение 16—20 час. Микроколичества вещества обрабатывают в запаянных капиллярах, большие пробы материала гидролизуют на бане с применением обратного холодильника. При действии кислот или оснований в процессе гидролиза белков или пептидов имеют место в некоторых случаях потери отдельных аминокислот, и, таким образом, содержание аминокислот в гидролизате не соответствует составу исходного белка или пептида. Поэтому для определения некоторых аминокислот применяют не соляную кислоту, а другие гидролизующие агенты. Брандт рекомендует для определения гистидина гидролиз 6 н. серной кислотой, для определения цистеина и метионина — гидролиз йодистоводородной кислотой и для определения тирозина и триптофана — гидролиз едким натром с добавкой  $\text{SnCl}_2$ . При определении цистина Блок использовал смесь равных объемов 6 н. соляной и муравьиной кислот.

К аминокислотам, разлагающимся при кислотном гидролизе, относятся прежде всего триптофан (главным образом в присутствии сахаров и следов тяжелых металлов). Тирозин, фенилаланин, цистеин и аргинин также до некоторой степени разлагаются. Аналогичной неустойчивостью обладают алифатические оксиаминокислоты, из которых серин разлагается приблизительно на 10%, треонин — на 5% (Рис). Цистин разлагается в такой степени, что при его определении необходимо проводить специальную подготовку.

Пример проведения кислотного гидролиза приведен в II 90.

### Щелочной гидролиз

Щелочной гидролиз применяют главным образом при определении триптофана, который в щелочной среде устойчивее, чем в кислой. Щелочи не только способствуют потерям при гидролизе оксиаминокислот, но они часто вызывают качественные изменения в составе гидролизата. При щелочном гидролизе серин разлагается на гликокол, аланин, аммиак и пировиноградную кислоту (Виланд и Вирт [3]), треонин расщепляется на гликокол и аминокислоту; цистин разлагается на тиомолочную кислоту, сероводород и аммиак. Аргинин в щелочной среде разлагается на орнитин и цитруллин. При щелочном гидролизе некоторых белков в их гидролизате была обнаружена новая аминокислота, лантанионин, которая образуется в виде артефакта из цистеина (Хорн и др.). Подобные качественные изменения имеют место также и при щелочном гидролизе пептидов, в частности при таких условиях, в которых свободные аминокислоты (треонин) не подвергаются превращениям (Зангер и Туппи [4]).

Необходимо также иметь в виду, что щелочной гидролиз вызывает рацемизацию аминокислот, а именно серина, треонина и цистеина, которая весьма нежелательна при количественном анализе аминокислот микробиологическими методами.

### Частичный химический гидролиз

При изучении состава длинной пептидной цепочки хорошо зарекомендовал себя частичный гидролиз, с помощью которого испытуемое вещество расщепляется на меньшие фрагменты, чаще всего на ди- и трипептиды. Эти фрагменты затем хорошо разделяются и идентифицируются обычными методами хроматографии на бумаге. Частичный кислотный гидролиз проводят обычно действием концентрированной соляной кислоты на белки или пептиды при температуре 37°. Продолжительность гидролиза для различных белков различна и должна, как правило, для каждого случая определяться индивидуально, если мы хотим расщепить белки до определенной степени. Концентрированная соляная кислота не расщепляет все связи одинаково быстро, легче и быстрее расщепляются связи треонина и серина. Хуже всего расщепляются пептидные связи, содержащие валин. В тех случаях, когда расщепляется преимущественно определенный вид связи, мы говорим о предпочтительном расщеплении. Большая специфичность расщепления, нежели при гидролизе концентрированными кислотами, достигается при гидролизе разбавленными кислотами. Так, например, Зангер при частичном гидролизе инсулина 0,1 *M* соляной кислотой при кипячении получил гораздо больший выход гликоколовых пептидов, нежели при гидролизе концентрированной соляной кислотой. Подобное действие оказывает гидролиз разбавленной щавелевой кислотой, которая преимущественно отщепляет от белков аспарагиновую кислоту, а затем в меньшей степени глутаминовую кислоту. Однако при частичном гидролизе разбавленными кислотами могут промежуточно образовываться дикетопиперазины, которые дают далее пептид, отличающийся от первоначально содержащегося в белке. При гидролизе глицил-валина 0,1 *n*. соляной кислотой при 110° часть пептида превращается, например, в валил-глицин (Зангер и Томпсон [2]). Исходя из этого, для частичного гидролиза применяют чаще всего концентрированную соляную кислоту.

Особым видом расщепления является предварительное отщепление амидных групп (перед гидролизом пептидных связей) при воздействии анионных смачивателей (Штейнгардт [1, 2]).

О проведении частичного гидролиза кислотами см. *П* 91.

### Ферментативный гидролиз

С развитием методов постепенного расщепления пептидов все большее значение приобретает ферментативный гидролиз белков, при котором образуются пептиды, содержащие большое число аминокислот. Ферментативный гидролиз имеет ряд преимуществ по сравнению с кислотным гидролизом; он, например, не вызывает разложения триптофана и разрыва амидных связей, кроме того, подходящим выбором ферментов можно ориентировочно определить места в пептидных цепочках, по которым преимущественно протекает расщепление. Из протеиназ для ферментативного гидролиза применяют прежде всего трипсин, который расщепляет пептидные связи на карбоксильных концах лизиновых и аргининовых остатков. Результаты гидролиза трипсином дополняются чаще всего гидроли-

зом с помощью химотрипсина, пепсина или папаина. Химотрипсин расщепляет в первую очередь тирозильные, фенилаланиновые, триптофанильные и метионильные связи. Ферментативный гидролиз подробно рассматривают Нейрат и Шверт.

Наши знания о специфическом расщеплении некоторых пептидных связей ферментами не являются достаточно полными. Кроме исследований с синтетическими пептидами, механизм ферментативного действия изучается на моделях белков, структура которых уже известна; например, связи, которые расщепляют бактериальные протеазы *Bac. subtilis*, были исследованы на примере инсулина (Туппи [1]).

Наконец, для определения структуры пептидов использовали экзопептидазы, из которых карбоксипептидаза служит для постепенного расщепления пептидов от карбоксильного конца, а аминопептидаза — для отщепления аминокислот от аминоконца пептидов (см. стр. 485).

При ферментативном гидролизе известны, однако, случаи, когда имела место транспептидация образующихся фрагментов. Поэтому ферментативный гидролиз часто дополняют кислотным гидролизом. Пример частичного ферментативного гидролиза приведен в II 92.

## МЕТОД ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

По сравнению со многими органическими соединениями белки обладают гораздо большим молекулярным весом, порядка нескольких десятков тысяч, поэтому при гидролизе белка образуется значительное количество пептидов со сходными свойствами; такие пептиды разделить очень трудно.

Первый шаг при изучении строения всегда направлен к упрощению состава гидролизата путем разделения пептидов на несколько групп, чаще всего на группы нейтральных, основных и кислых пептидов. С этой целью было разработано несколько методов, основанных на подвижности в электрическом поле, например на электрофоретическом разделении в приборе с четырьмя ячейками, а также электрофорез на силикагеле, на агар-агаре, на стеклянном порошке или на бумаге (Микеш). Последний способ особенно удобен ввиду быстроты разделения и высокой разделяющей способности, которая позволяет далее разделять щелочные и кислые группы на несколько фракций. Однако этот метод по сравнению с первыми упомянутыми методами ограничен необходимостью работать с малыми количествами. Другим типом разделения является адсорбционная хроматография на угле, задерживающем главным образом пептиды, содержащие ароматические аминокислоты. Весьма эффективным методом разделения является хроматография пептидов на ионообменных смолах, из которых лучше всего освоена элюционная хроматография на колонках дауэкс 50 (сульфированные полистирольные смолы) с применением мягких элюентов, которые можно сублимировать (уксуснокислый или муравьинокислый аммоний).

Группа пептидов, полученная некоторыми из приведенных методов, далее разделяется обычно методом распределительной хроматографии на бумаге (чаще всего ватман 1 или 4). Применяется, в частности, одномерная хроматография с последовательным использованием нескольких растворителей (см. раздел о пептидах, стр. 461) или двумерная хроматография.

Большое количество пептидов, до 5 мг, можно при двумерной хроматографии разделять на бумаге ватман 3. При таком методе разделения смесь пептидов обрабатывается на нескольких хроматограммах одновременно при соблюдении по возможности одинаковых условий. Одну хрома-

тограмму проявляют затем нингидрином до полной интенсивности окраски, а другие используют для элюирования пептидов, открытых на бумаге либо флуоресценцией в ультрафиолетовом свете (после нагревания бумаги в течение 10—15 мин, при 110°), либо обработкой 0,025 %-ным раствором нингидрина в бутаноле; в отдельных случаях положение пептидов на хроматограмме определяется из положения соседних пятен веществ, которые далее не подвергаются анализу. Из хроматограмм, которые не были полностью проявлены нингидрином, вырезают пятна. Чистый пептид элюируют водой и подвергают завершающему анализу. Большое количество пептидов выгоднее обрабатывать при помощи одномерной хроматографии, которая на одной хроматограмме позволяет использовать несколько специфических реактивов, дающих цветные реакции с пептидами, содержащими определенные аминокислоты.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕВЫХ ГРУПП В БЕЛКАХ И ПЕПТИДАХ

Характерные и аналитически хорошо исследованные места в белках образуют концы пептидных цепочек, аминокислоты которых либо имеют свободную аминогруппу, либо связаны таким образом, что имеется доступная карбоксильная группа. Число свободных  $\alpha$ -аминогрупп и число карбоксильных групп дает вместе с тем число свободных пептидных цепочек в белке, если предположить, что они не являются ни разветвленными, ни циклическими. Из большого числа методов определения концевых аминогрупп в пептидных цепочках наиболее широко распространен метод Зангера (метод динитрофенилпроизводных) и фенилизотиоцианатный метод Эдмана (фенилтиогидантоиновый метод) для определения N-концевых аминокислот и карбоксипептидазный метод для определения C-концевых аминокислот. Последние два метода основаны на постепенном расщеплении пептидных цепочек, т. е. позволяют определить несколько связанных друг с другом аминокислот из одного образца пептида, вес которого колеблется между несколькими десятками микрограмм и несколькими миллиграммами. Идеальное требование, состоящее в определении последовательности всех аминокислот в белке, было до сих пор выполнено лишь в нескольких случаях, в частности для инсулина, полученного из панкреатической железы различных видов животных.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ

В табл. 80 дан обзор методов, применяемых для определения концевых аминокислот. Однако многие из этих методов не нашли применения в практике.

#### МЕТОД ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ

Простейший метод определения N-концевых аминокислот предложили Консен и сотрудники:

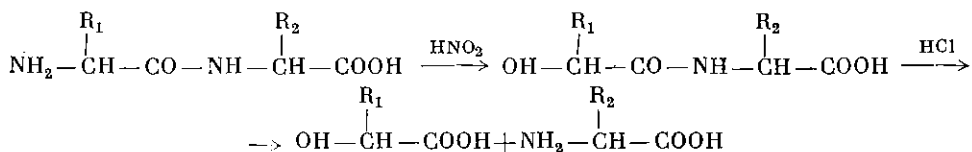


Таблица 80

## ОБЗОР МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ N-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ

Автор	Реагент	Продукт реакции с пептидом		Конечная идентификация концевой группы
		первая ступень	последующая ступень	
Шпакман и сотрудники	Аминопептидаза			Аминокислоты (количественно)
Консен и сотрудники	$\text{HNO}_2$	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{HOCHCO}-\text{NH}\dots\text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{HOCH}-\text{COOH} \\ \text{Оксикислота} \end{array}$	Аминокислота (по разности)
Инграм [1]	$\text{HCHO}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ R} \\   \quad   \\ \text{N}-\text{CHCO}-\text{NH}\dots\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ R} \\   \quad   \\ \text{N}-\text{HC}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_3 \\ \text{Диметиламинокислота} \end{array}$	Диметиламинокислота
Зангер [1]	$\text{NO}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)(\text{F})$	$\begin{array}{c} \text{NO}_2 \quad \text{R} \\   \quad   \\ \text{NO}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)(\text{F})-\text{NHCHCO}-\text{NH}\dots\text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{NO}_2 \quad \text{R} \\   \quad   \\ \text{NO}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)(\text{F})-\text{NHCH}-\text{COOH} \\ \text{2,4-Динитрофениламинокислота} \end{array}$	ДНФ-аминокислота или свободная аминокислота
Холли и Холли	$\text{CH}_3\text{OOC}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)(\text{F})$	$\begin{array}{c} \text{NO}_2 \quad \text{R} \\   \quad   \\ \text{CH}_3\text{OOC}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)(\text{F})-\text{NHCHCO}-\text{NH}\dots\text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{CH}_3\text{OOC}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)(\text{F})-\text{N}-\text{CH}-\text{R} \\   \quad   \\ \text{N}-\text{CH}=\text{O} \\ \text{H} \\ \text{7-Карбометокси-3,4-дигидро-2-хиноксалин} \end{array}$	—
Ютиш и Ричард [2]	$\text{NO}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)(\text{F})$	Вторая ступень $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{R} \\   \quad   \\ \text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)(\text{F})-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}\dots\text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)(\text{F})-\text{N}-\text{CH}-\text{R} \\   \quad   \\ \text{N}=\text{COH} \\ \text{7-Амино-2-оксидигидрохиноксалин} \end{array}$	Дигидрохиноксалины и аминокислоты

Юденфренд и Велик [1]	$J^{131}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{Cl}$ п-Иодфенилсульфохлорид	$J^{131}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NHCH}(\text{R})\text{CO}-\text{NH}\dots\text{COOH}$	$J^{131}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NHCH}(\text{R})\text{COOH}$ «Пипсил»-аминокислота	«Пипсил»-аминокислота
Кейл и сотрудники [1]	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{Cl}$	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NHCH}(\text{R})\text{CO}-\text{NH}\dots\text{COOH}$	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-\text{NHCH}(\text{R})\text{COOH}$	Аминокислота
Вессели и сотрудники	$\text{ClCOOC}_2\text{H}_5$	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OCONHC}(\text{R}_1)\text{CHCONHC}(\text{R}_2)\text{CO}-\text{NH}\dots\text{COOH}$	$\text{R}_1-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{N}-\text{CH}(\text{R}_2)\text{CH}_2\text{OH}$	Аминокислота $\text{R}_1$ (в отдельных случаях $\text{R}_2$ )
Бергман и сотрудники	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ Фенилизоцианат	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{NHC}(\text{O})\text{NHCH}(\text{R})\text{CONH}\dots\text{COOH}$	$\text{RCH}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{N}-\text{C}_6\text{H}_5$	Фенилгидантоин или аминокислота
Эванс и Рейт	$\text{CH}_3\text{NO}_2$ $\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ $\text{CH}_3\text{NO}_2$	$\text{CH}_3\text{NO}_2$ $\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{NHC}(\text{O})\text{NHCH}(\text{R})\text{CONH}\dots\text{COOH}$ $\text{CH}_3\text{NO}_2$	$\text{RCH}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{N}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Аминокислота
Турба [1]	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}=\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHC}(\text{O})\text{NHCH}(\text{R})\text{CO}-\text{NH}\dots\text{COOH}$	$\text{RCH}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_5$	Аминокислота
Кеннер и Кхорана	$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-\text{CSSCH}_3$ Метилэтилксантат	$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-\text{CSNHCH}(\text{R})\text{CONH}\dots\text{COOH}$	$\text{RCH}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ Тиазалил-2,5-дион	Аминокислота

Продолжение табл. 80

Автор	Реагент	Продукт реакции с пептидом		Конечная идентификация концевой группы
		первая ступень	последующая ступень	
Леви [1]	$\text{CS}_2$	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{CSNHCHCONH}\dots\text{COOH} \\   \\ \text{SH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{RCH} - \text{C=O} \\   \quad \quad   \\ \text{NH} - \text{C} - \text{S} \\    \\ \text{S} \end{array}$ <p>2-Тиотиазolid-5-он</p>	Аминокислота
Элмор и Товеланд	$\text{CH}_3\text{CONHCS}_2\text{CH}_3$	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{CH}_3\text{CONHCSNHCHCONH}\dots\text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{RCH} - \text{C=O} \\   \quad \quad   \\ \text{NH} - \text{C} - \text{NH} \\    \\ \text{S} \end{array}$ <p>2-Тиогидантоин</p>	2-Тиогидантоин
Эдман [1]	$\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{C}=\text{S}$	$\begin{array}{c} \text{S} \quad \text{R} \\    \quad   \\ \text{C}_6\text{H}_5\text{NHCNHCHCONH}\dots\text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{RCH} - \text{C=O} \\   \quad \quad   \\ \text{NH} - \text{C} - \text{N} - \text{C}_6\text{H}_5 \\    \\ \text{S} \end{array}$ <p>3-Фенил-2-тиогидантоин</p>	Фенилтиогидантоин или аминокислота
Рейт и Вальдрон	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ NO}_2 \\   \quad \quad   \\ \text{N} - \text{C}_6\text{H}_3 - \text{N}=\text{C}=\text{S} \\   \quad \quad   \\ \text{CH}_3 \text{ NO}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ NO}_2 \quad \text{S} \quad \text{R} \\   \quad \quad   \quad    \quad   \\ \text{N} - \text{C}_6\text{H}_3 - \text{NHCNHCHCONH}\dots\text{COOH} \\   \quad \quad   \\ \text{CH}_3 \text{ NO}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{RCH} - \text{C=O} \quad \text{NO}_2 \text{ CH}_3 \\   \quad \quad   \quad \quad   \quad \quad   \\ \text{NH} - \text{C} - \text{N} - \text{C}_6\text{H}_3 - \text{N} \\    \quad \quad \quad   \quad \quad   \\ \text{S} \quad \quad \quad \text{NO}_2 \text{ CH}_3 \end{array}$	Аминокислота

Сущность метода состоит в том, что раствор пептида делят на две части и в одной из них определяют содержание аминокислот после полного гидролиза. Другую часть раствора подвергают в закрытом сосуде действию нитрозных газов, образующихся при взаимодействии соляной кислоты с твердым нитритом натрия. Через 10 мин при 37° или через 30 мин при комнатной температуре нитрозирование прекращают и образец несколько раз выпаривают с водой досуха. Остаток вновь гидролизуют и хроматографируют. Аминокислота, которая исчезла, находилась на аминоконце пептида.

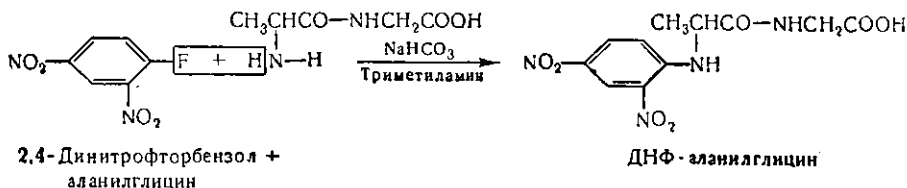
Метод дезаминирования иногда не дает четких результатов, главным образом в случае пептидов, содержащих тирозин, пролин, аргинин и глутаминовую кислоту.

Другую модификацию метода дезаминирования описал Турба (II 93).

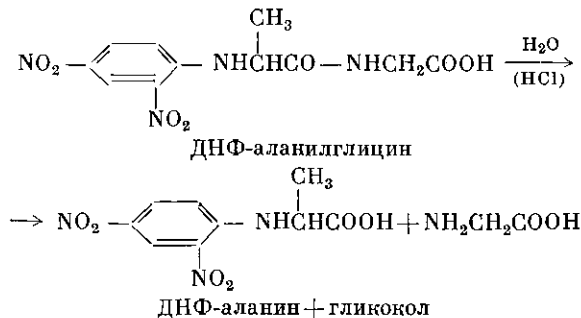
### МЕТОД ДИНИТРОФЕНИЛИРОВАНИЯ

Наиболее широко распространенный метод определения N-концевых аминокислот белков и пептидов был разработан Зангером [1]. Метод основан на реакции α-аминогруппы с 2,4-динитрофторбензолом (ДНФБ). Кроме α-аминогруппы аминокислот, с ДНФБ реагирует также ε-аминогруппа лизина, фенольная гидроксильная группа тирозина, имидазольная группа гистидина и тиоловая группа цистеина.

Эта реакция протекает на холоду в слабо щелочной среде (NaHCO<sub>3</sub> или триметиламин), причем образуется динитрофенилпроизводное (ДНФ-производное) концевой аминокислоты, которое является более стойким к гидролизу, нежели пептидные связи между аминокислотами. Реакцию динитрофенилирования пептида, например аланилглицина, можно изобразить схематически следующим образом:



При нагревании ДНФ-пептида с соляной кислотой (длительное время при высокой температуре) происходит гидролиз, отщепляется ДНФ-аминокислота и оставшаяся часть пептидной цепочки расщепляется на свободные аминокислоты. Гидролиз ДНФ-аланилглицина протекает по следующей схеме:



### Динитрофенилирование

Чаще всего применяется первоначальный способ, предложенный Зангером [1], т. е. динитрофенилирование в среде, содержащей  $\text{NaHCO}_3$  и 66%-ный этанол. С очень хорошим выходом ДНФ-аминокислоты и пептиды можно получить по методу Шрёдера и Ле Жетте (II 94).

Для динитрофенилирования микроколичеств пептидов, элюированных из хроматограммы, рекомендуется метод Зангера и Томпсона [2], которые при динитрофенилировании заменяли бикарбонат на триметиламин (II 95).

Получение не денатурированного ДНФ-белка описывают Шорм и сотрудники (II 93). Аналогичный метод для динитрофенилирования белков разработали Леви и Ли [5] (II 97). Можно также белки сначала осаждать трихлоруксусной кислотой, а затем динитрофенилировать.

### Гидролиз ДНФ-производных

Полный гидролиз ДНФ-соединений чаще всего проводят нагреванием с 5,7 н. (постоянно кипящей) перегнанной соляной кислотой в запаянном капилляре в течение 12 час при температуре  $105^\circ$ . Оптимальное время гидролиза определяется отсутствием в гидролизате ДНФ-пептидов; это время необходимо найти для каждого пептида в отдельности путем проведения специальных опытов.

При частичном гидролизе ДНФ-белков образуются ДНФ-пептиды. Ферментативным гидролизом можно от ДНФ-белков отщепить даже ДНФ-тетрапептид, тогда как кислотным гидролизом до сих пор удавалось отщепить только ДНФ-дипептиды. При частичном гидролизе ДНФ-пептидов было отмечено, что отщепление происходит в других местах цепочки, по сравнению с гидролизом незамещенного пептида.

Потери, которые имеют место при гидролизе свободных ДНФ-аминокислот, обнаружили Портер и Зангер, но практика показала, что для ДНФ-аминокислот, связанных в пептидную цепочку, эти потери еще больше. ДНФ-пролин, ДНФ-гликокол и ди-ДНФ-цистин при гидролизе 5,7 н. соляной кислотой разлагаются почти полностью с образованием динитрофенола и свободной аминокислоты. ДНФ-пролин дает два пятна артефактов, вероятнее всего  $\alpha$ -2,4-ДНФ-амино- $\delta$ -хлорвалериановой кислоты и  $\alpha'$ -хлор- $\delta$ -2,4-ДНФ-аминовалериановой кислоты (Скейнс и Тозер). Концевой ДНФ-серин при гидролизе (24 час,  $110^\circ$ , 6 н. соляная кислота) разрушается на 80—90%. Для определения этих нестойких ДНФ-аминокислот применяется следующий специальный метод.

ДНФ-пролиновый пептид (перед гидролизом) в 1%-ном растворе  $\text{NaHCO}_3$  имеет максимум поглощения при 375 м $\mu$  в отличие от остальных ДНФ-пептидов (максимум поглощения при 350—355 м $\mu$ ; Филлипс). Кроме того, пептид с N-концевым пролином при нагревании с изативом дает синее окрашивание (Ашэ и сотрудники [2]). ДНФ-гликокол и ДНФ-пролин являются более стойкими при гидролизе в смеси 90%-ная муравьиная кислота — уксусный ангидрид — 60%-ная хлорная кислота (10 : 5,5 : 1,5; Хейнс и сотрудники).

ДНФ-цистеиновая кислота в отличие от ДНФ-цистина устойчива к гидролизу, поэтому перед динитрофенилированием выгодно цистино-вые пептиды окислять надмуравьиной кислотой.

O-ДНФ-тирозин при нагревании с нейтральными или щелочными растворами претерпевает глубокое расщепление и реагирует с другими аминокислотами.

Сильное разложение ДНФ-аминокислот наблюдалось при гидролизе в присутствии триптофана, цистина или сахаров.

### Экстракция ДНФ-аминокислот

После гидролиза ДНФ-пептидов можно большую часть выделившихся ДНФ-аминокислот перевести в органический растворитель (эфир или этилацетат; *П* 98). В водном слое гидролизата, извлеченного органическим растворителем, останутся все свободные аминокислоты (которые определяют обычным методом хроматографии на бумаге), а также некоторые ДНФ-аминокислоты (ДНФ-аргинин,  $\epsilon$ -ДНФ-лизин, ДНФ-цистеиновая кислота, О-ДНФ-тирозин, имидазол-ДНФ-гистидин и большая часть ди-ДНФ-гистидина).

Согласно Браунитцеру [1], ДНФ-аргинин и ди-ДНФ-гистидин можно количественно экстрагировать из водного раствора 2-бутанолом. Новый способ отделения ДНФ-пептидов и ДНФ-аминокислот от незамещенных аминокислот на ионообменной смоле зеролит Н разработал Кейл [1] (*П* 99).

В гидролизатах ДНФ-пептидов всегда содержится динитрофенол. Перед хроматографированием ДНФ-аминокислот следует его удалить или сублимацией при 50° в вакууме (Миллз), или хроматографированием на анизотропном  $Al_2O_3$  (Турба [3]). На хроматограммах пятна динитрофенола идентифицируются благодаря тому, что в отличие от ДНФ-аминокислот они исчезают после обработки парами соляной кислоты.

### Обнаружение ДНФ-аминокислот

Проявляющие реактивы в большинстве случаев не требуются, поскольку динитрофенилпроизводные имеют интенсивную желтую окраску. Если они присутствуют лишь в ничтожных количествах, то рекомендуется просматривать хроматограмму в ультрафиолетовом свете. При фотографировании пятен ДНФ-аминокислот в ультрафиолетовом свете получаются весьма контрастные снимки.

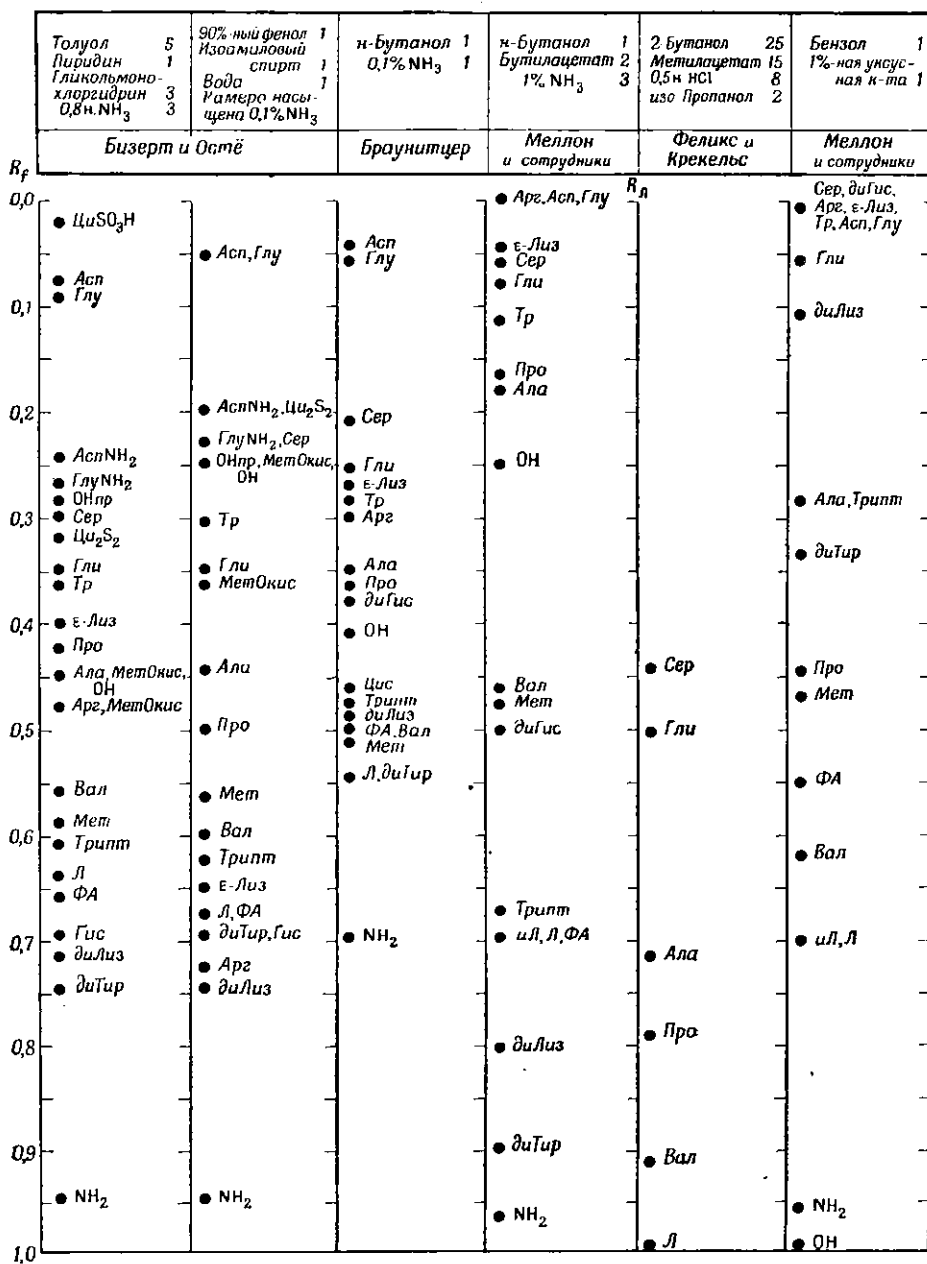
*Реакция водорастворимых ДНФ-аминокислот с нингидрином.* В отличие от большинства ДНФ-аминокислот пятна О-ДНФ-тирозина на хроматографической бумаге не видны (обнаруживаются в ультрафиолетовом свете), но при обработке нингидрином они окрашиваются в фиолетовый цвет. Очень слабое желтое пятно имидазол-ДНФ-гистидина при обработке нингидрином приобретает коричневый цвет; точно так же приобретает коричневый оттенок желтое пятно  $\epsilon$ -ДНФ-лизина. ДНФ-аргинин и ДНФ-цистеиновая кислота с нингидрином не реагируют. ДНФ-аргинин дает на хроматограмме положительную реакцию с реактивом Сакагути (*Д* 104).

### Влияние света на ДНФ-производные

Кратковременные операции с ДНФ-производными можно проводить при слабом освещении, но собственно хроматографирование должно происходить в полной темноте. Количественную сторону этого вопроса исследовал Кейл и сотрудники [3].

### Хроматографирование ДНФ-аминокислот

Значения  $R_f$  ДНФ-аминокислот полностью не воспроизводятся, поэтому гораздо точнее определять отдельные ДНФ-аминокислоты путем сравнения с контрольными образцами.

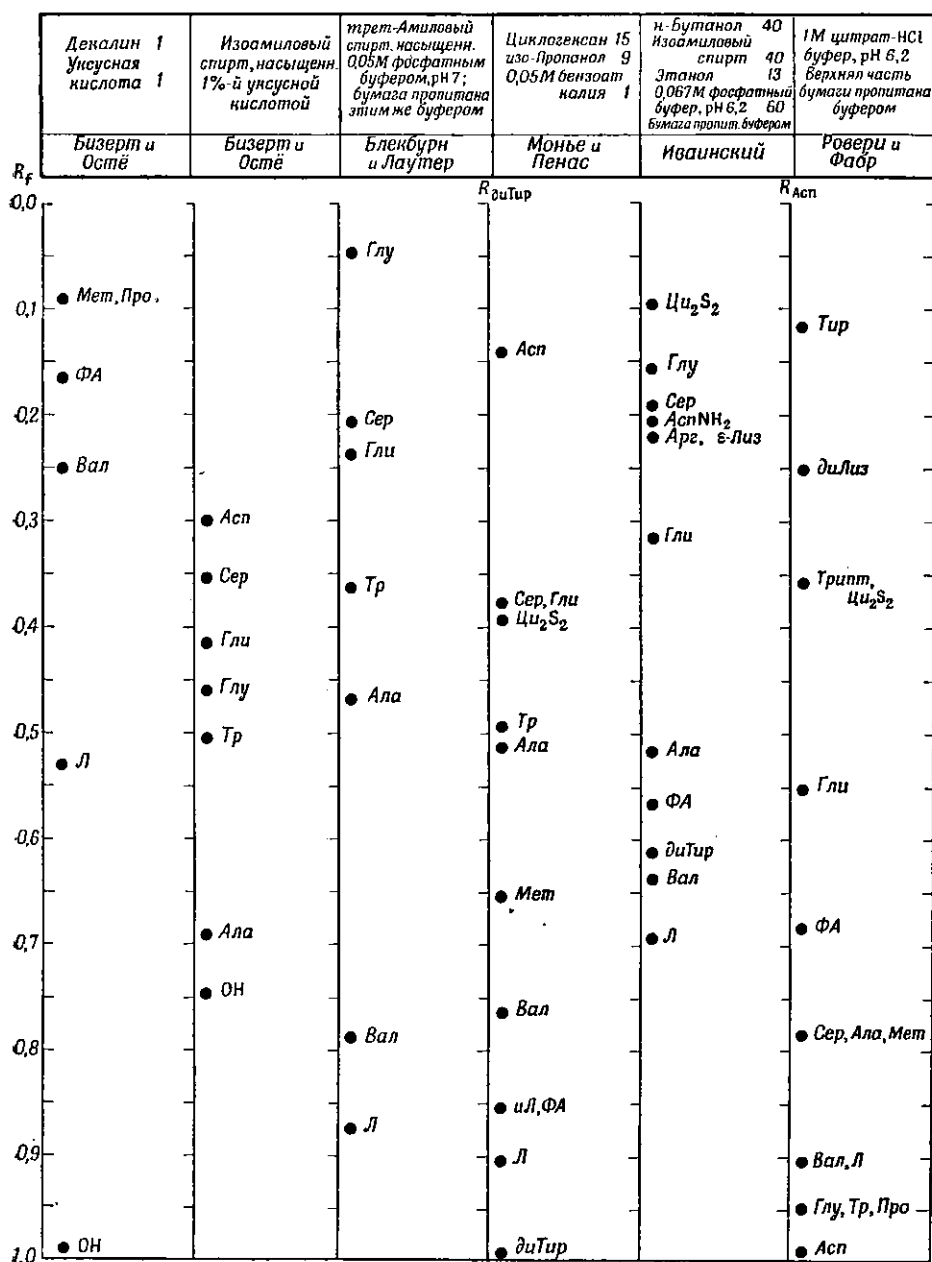
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$ 

Примечание. ОН — 2,4-динитрофенол;  $\text{NH}_2$  — 2,4-динитроанилин.

Чаще всего полный состав пептида, N-концевую аминокислоту которого определяют, бывает известен, и, следовательно, для идентификации ДНФ-аминокислоты достаточно одномерной хроматографии. Исключительно хорошо зарекомендовало себя хроматографирование в системе

Таблица 81

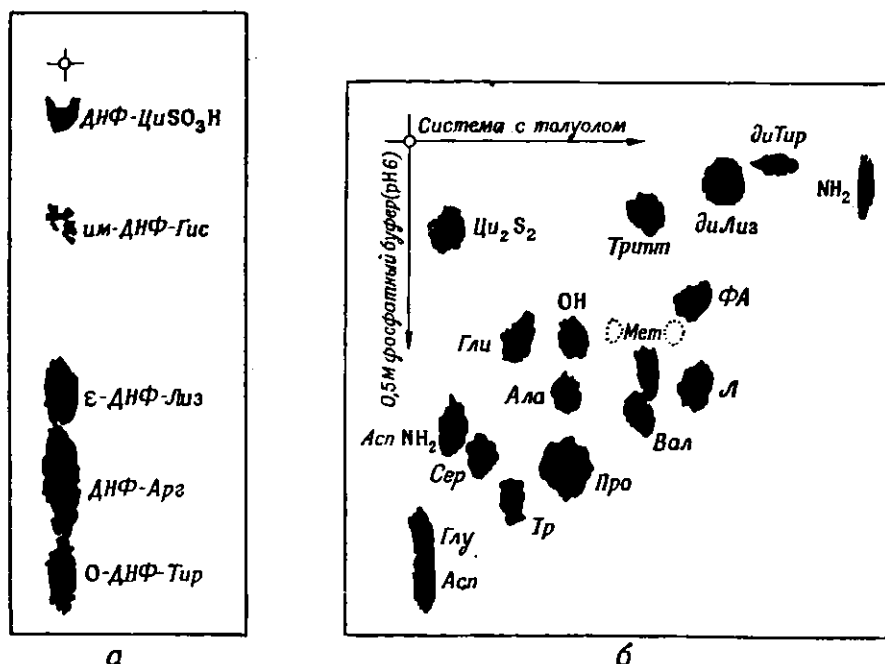
ДИНИТРОФЕНИЛАМИНОКИСЛОТ



трет-амиловый спирт — фталатный буфер (pH 6) на обработанной буферным раствором бумаге ватман 1 (Блекбурн и Лаутер;  $P_{100}$ ). Фталатный буфер в системе трет-амиловый спирт — буферный раствор можно заменить аммиаком (трет-амиловый спирт — 3%-ный аммиак, 1 : 1), кото-

рый после элюирования пятен не мешает определению ДНФ-аминокислот (Леви [1]). Обзор некоторых систем растворителей, применяемых для разделения ДНФ-аминокислот, приведен в табл. 81.

В том случае, когда ожидается большее число ДНФ-аминокислот, выгодно применять двумерное хроматографирование (Леви [1]). На рис. 189 приведена схема размещения ДНФ-аминокислот после хроматографирования в первом направлении восходящим способом в смеси толуол — пиридин — этиленхлоргидрин — 0,8 н. аммиак (5 : 1,5 : 3 : 3), во втором на-



Р и с. 189. а — динитрофениламинокислоты, оставшиеся в кислой водной фазе после экстракции эфиром (Леви [2]).

Система: *трет*-амиловый спирт — фталатный буфер, pH 6.

б — двумерная хроматограмма динитрофениламинокислот, перешедших из кислого водного раствора в эфир (Леви [2]).

Системы: I — толуол — этиленхлоргидрин — пиридин — 0,8 н.  $\text{NH}_3$  (5 : 3 : 1,5 : 3), II — 1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,5M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 2,4-динитроанилин, OH — 2,4-динитрофенол. Определение аминокислот см. II 83. ДНФ-аргинин и α-ДНФ-гистидин, оставшиеся в водной фазе, разделяют в первой системе при помощи одномерной хроматографии.

правлении — нисходящим способом в 1,5 M фосфате (pH 6) (138 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 71 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и вода до объема 1000 мл). То же место, что и ДНФ-триптофан, занимает ди-ДНФ-гистидин, основное количество которого находится, однако, в водной фазе. На хроматограмме обозначены также пятна артефактов, образующихся при гидролизе ДНФ-пролина.

Браунитцер заменил смесь толуол — пиридин — этиленхлоргидрин системой *n*-бутанол — 0,1%-ный аммиак (1 : 1) и достиг в комбинации с 1,5 M фосфатом при двумерном хроматографировании хорошего разделения всех ДНФ-аминокислот.

Растворимые в воде ДНФ-аминокислоты (которые при экстракции не переходят в эфир) разделяются хроматографированием в смеси *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5): ДНФ-цистеиновая кислота,

$R_f$  0,42; ДНФ-имидазол-гистидин,  $R_f$  0,57;  $\epsilon$ -ДНФ-лизин,  $R_f$  0,77; ДНФ-аргинин,  $R_f$  0,81; О-ДНФ-тирозин,  $R_f$  0,84. Хорошее разделение достигается в системе *трет*-амиловый спирт — фталатный буфер с рН 6 (рис. 188; Леви [1]). Растворители, которые применялись для хроматографирования ДНФ-аминокислот, можно использовать и для хроматографирования ДНФ-пептидов. Влияние буферных растворов на величину  $R_f$  ДНФ-аминокислот при разных значениях рН изучал Иваинский.

### Перевод ДНФ-аминокислот в свободные аминокислоты

В некоторых случаях для контроля желательно наряду с хроматографированием ДНФ-аминокислот проводить также хроматографирование свободных аминокислот. Например, ДНФ-лейцин и ДНФ-изолейцин разделить хроматографически нельзя, поэтому результаты определения необходимо проверять переводом в свободные аминокислоты путем гидролиза гидроокисью аммония (П 101) или гидратом окиси бария (П 102).

### Количественный анализ

Пятна ДНФ-аминокислот, вырезанные из хроматограммы, элюируют в пробирке 1 %-ным аммиаком или 1 %-ным  $\text{NaHCO}_3$  и экстинкцию растворов измеряют при длине волны 360 м $\mu$ , в случае ДНФ-пролина — при 385 м $\mu$  и для ДНФ-пептида — при 350 м $\mu$  (Леви [1]).

При гидролизе и хроматографировании ДНФ-аминокислот всегда имеют место потери, которые при количественном анализе необходимо учитывать, вводя соответствующие поправки. Наилучшие значения этих поправок получаются, если гидролизовать N-концевую ДНФ-аминокислоту с известным количеством ДНФ-белка; минимальный выход получается, когда ДНФ-аминокислоту гидролизуют с белком (Леви [1]).

Отношение ДНФ-остатков к числу пептидных связей можно определить измерением поглощения ДНФ-пептидов в инфракрасной области (Шид и Рестл).

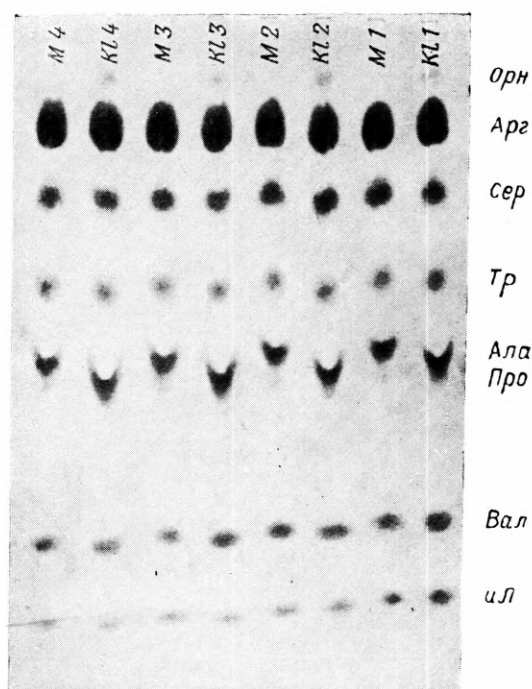
Количественный анализ ДНФ-аминокислот методом хроматографии на бумаге описывает также Вальдшмидт-Лейтц [1]. При количественном определении ДНФ-аминокислот по модифицированному методу, предусматривающему использование щелочного раствора ацетона, образуются окрашенные соединения, содержание которых можно измерить по поглощению в видимой части спектра (Циммерман).

Для получения ДНФ-аминокислот, необходимых в качестве стандартов, приводим основные ссылки на первоисточники: Абдерхальден и Блумберг, Зангер [1], Портер и Зангер. Очень хороший метод рекомендуют Леви и Чунг [3]: динитрофенилирование проводится в водном растворе. Синтез редко встречающихся ДНФ-аминокислот описали Рамачандран и Мак-Коннел [2], Рао и Собер.

### ФЕНИЛИЗОТИОЦИАНАТНЫЙ МЕТОД

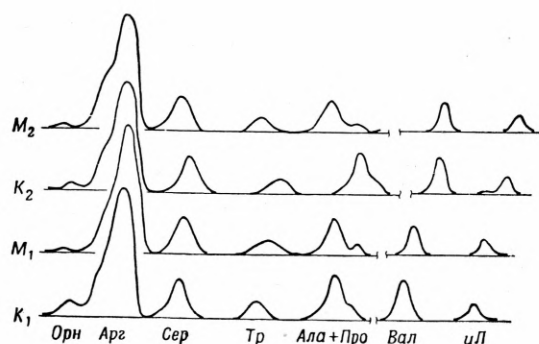
Этот метод определения N-концевых аминокислот в пептидах и белках был разработан Эдманом [1] еще до начала изучения химии белков и с тех пор неоднократно подвергался исследованиям и изменениям (Далеруп и сотрудники, Френкель-Конрат и Харрис [4], Ландман и сотрудники, Оттезен и Волленбергер).





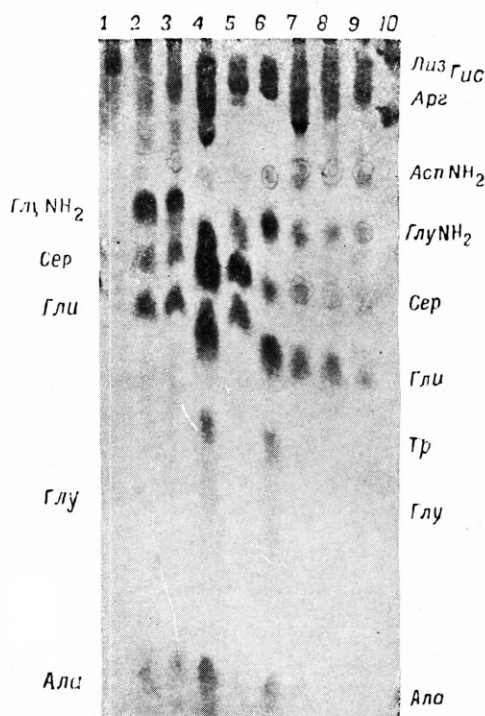
Р и с. 182. Хроматограмма полного гидролизата клеунина (Томашек).

Повторное хроматографирование в системе *n*-бутанол — уксусная кислота (11:1). *K1* 1, 2, 3, 4 — полный гидролизат клеунина; *M* 1, 2, 3, 4 — «гидролизат» модельной смеси аминокислот.



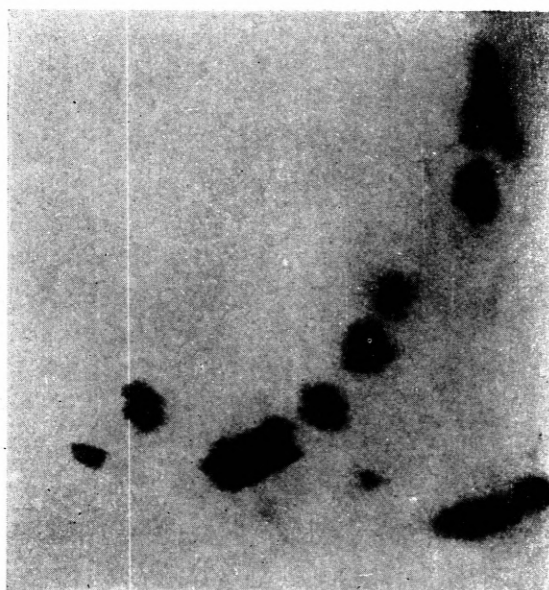
Р и с. 183. Фотометрическая оценка хроматограммы полного гидролизата клеунина (рис. 182) методом Кейла (11 81) (Томашек).

Кривые *K1* и *K2* — полный гидролизат клеунина; *M1* и *M2* — «гидролизат» модельной смеси.



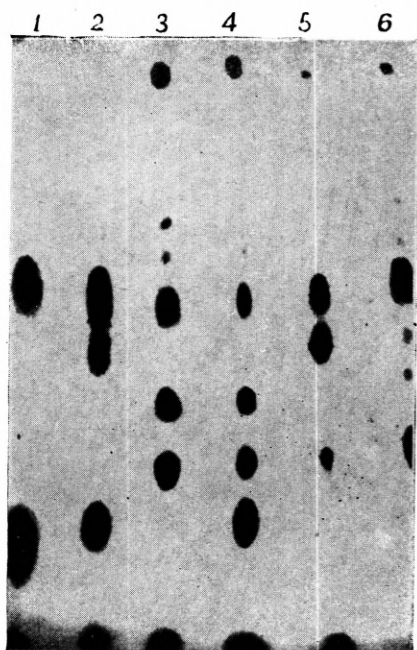
Р и с. 184. Свободные аминокислоты плазмы крови, пота и мочи (обессоленные образцы) (Крал и сотрудники).

Обнаружены только аминокислоты с низкими значениями  $R_f$  в системе *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10). 1 —  $\text{C}_6\text{H}_5\text{S}_2$ ; 2 — плазма крови после спортивной нагрузки; 3 — плазма крови перед спортивной нагрузкой (выделяется  $\text{Глун NH}_2$ , Сер и Гли); 4 — пот перед спортивной нагрузкой; 5 — пот после спортивной нагрузки (Лиз, Гис, Арг отличаются друг от друга тоном окраски, образующейся при действии нингидрина; пятно в месте  $\text{Асп NH}_2$ . Цит идентифицирован дополнительной реакцией с *n*-диметиламинобензальдегидом; Сер дает наиболее интенсивное пятно; 6 — стандарты Лиз, Гис,  $\text{Асп NH}_2$ ,  $\text{Глун NH}_2$ , Сер, Гли, Тр, Глу, Ала; 7 и 9 — моча после спортивной нагрузки; 8 — моча перед спортивной нагрузкой; 10 — стандарты  $\text{C}_6\text{H}_5\text{S}_2$  и  $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3\text{H}$ .



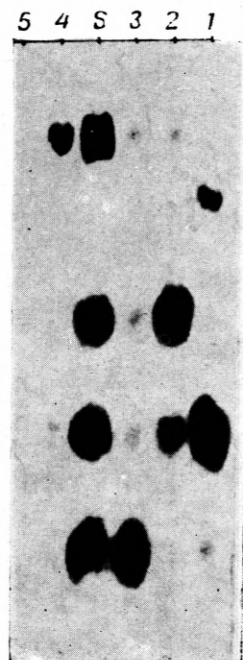
Р и с. 185. Свободные аминокислоты желудочного сока (Канский).

Система: I — *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (на рисунке снизу вверх); II — фенол, насыщенный водой, в атмосфере  $\text{NH}_3$  (на рисунке слева направо). Нанесен эквивалент 0,3 мл желудочного сока после депротенизации. Линия старта слева внизу, относительные положения пятен приблизительно такие же, как на «карте» рис. 174. Справа сверху вниз налево: Л+ИЛ, ФА, Вал+Мет, Про (слабо), Тир, Ала, Тр, Гли, Сер, Глу, Асп. Под Гли находился Тау, под Ала и Тр — Глу $\text{NH}_2$ , в правом углу — Лиз и Арг.



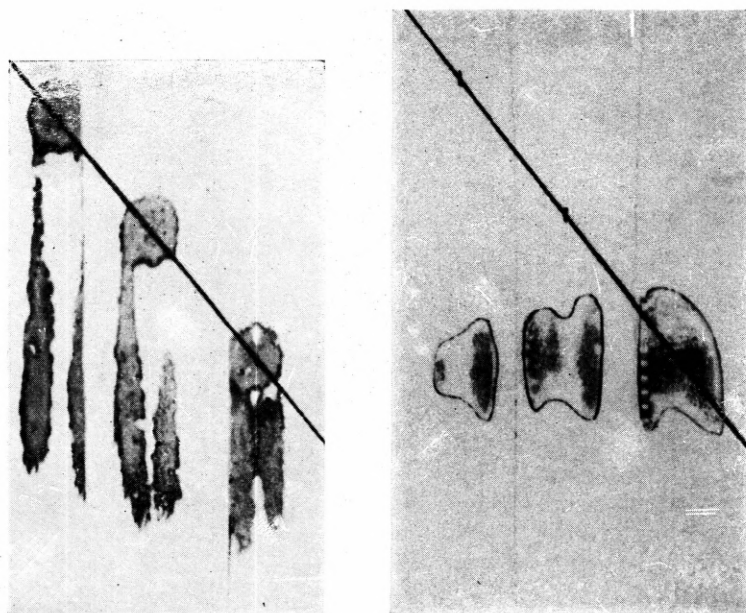
Р и с. 188. Динитрофениламинокислоты (Бизерт и Остё).

Растворитель: толуол — пиридин — гликомонохлоргидрин — 0,8 н.  $\text{NH}_3$  (5 : 1 : 3 : 3, необходимо тщательное приготовление). Проявление путем фотокопирования при длительной экспозиции. 1 — (сверху вниз) динитрофенол, ди-ДНФ-Тир; 2 — динитрофенол,  $\alpha$ -ДНФ-Арг, ди-ДНФ-Лиз; 3 — фракция из пептического гидролизата  $\gamma$ -глобулина; 4 — то же и ди-ДНФ-Лиз; 5 — фракция из пептического гидролизата кристалбумина и  $\alpha$ -ДНФ-Арг; 6 — фракция из пептического гидролизата кристалбумина.



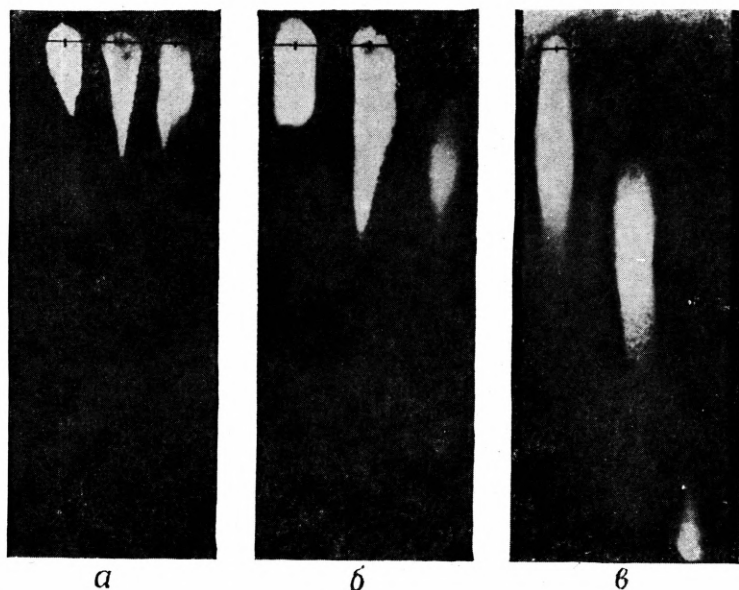
Р и с. 190. Определение строения пептида (фракция В, возникающая при образовании плакальбумина из овальбумина) последовательным отщеплением от аминоконца фенилтиогидантоионовым методом (Оттезен и Волленбергер).

Система: фенол, насыщенный водой. 1 — Глу и первая отщепленная аминокислота Ала; 2 — вторая отщепленная аминокислота Гли; 3 — третья отщепленная аминокислота Вал; 4 — стандарты Асп, Гли, Ала, Вал (сверху вниз); 5 — аминокислота от карбоксильного конца Асп; 6 — никакой другой аминокислоты. Результат свидетельствует о структуре Ала-Гли-Вал-Асп.



Р и с. 194. Влияние положения линии старта и присутствия хлористого натрия на хроматографическое поведение трипсина (Мацек).

Слева — хроматографирование в 40%-ном водном растворе этанола, камера насыщена этанолом; справа — хроматографирование в 40%-ном этаноле, содержащем 1,5% NaCl, камера насыщена этанолом. Хроматограмма проявлена с помощью киноплёнки (Д129).

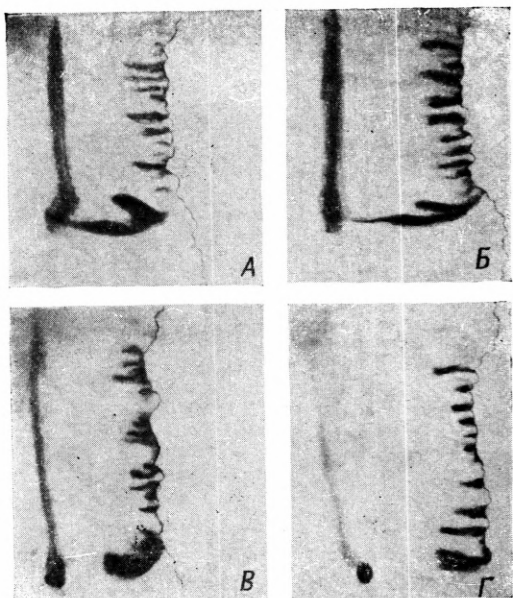
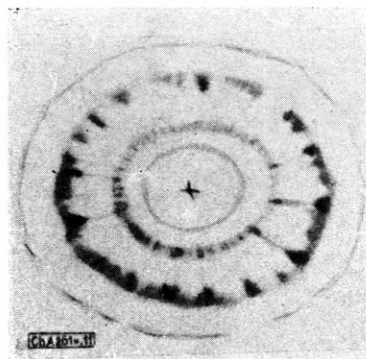


Р и с. 195. Влияние насыщения камеры на хроматографическое поведение амилаз (Мацек).

Хроматографирование в 50%-ном этаноле, хроматограмма проявлена крахмалом и йодом (Д127). На каждой хроматограмме слева направо: панкреатин, диастаз и такадиастаз. а — камера насыщена этанолом; б — камера насыщена 60%-ным этанолом; в — камера насыщена водой.

Р и с. 197. Круговая хроматограмма белков сыворотки крови (Циммерман и Клукас).

На хроматограмму нанесено 5—8 мл сыворотки крови. Отделение глобулинов (внутренний круг) от альбуминов (внешний круг) было достигнуто в системе растворителей: вода, насыщенная *n*-бутанолом — додекансульфат натрия, насыщенный водой — *n*-бутанол (20 : 10 : 0,8) при pH ~ 6,8.

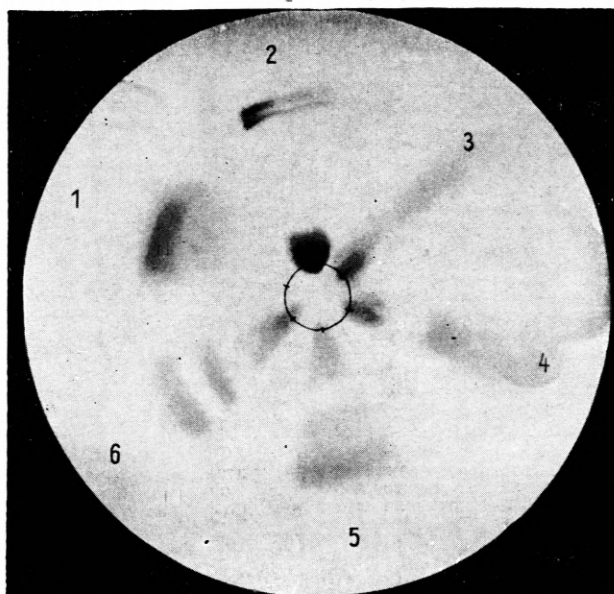


Р и с. 198. Двумерная хроматограмма белков крови (Калз и сотрудники).

Системы растворителей: в первом направлении — 0,1 М раствор сахарозы; во втором направлении 0,1 М раствор натрий-калийтартрата. А, Б — *Lupus erythematosus* — перед лечением, В, Г — после лечения. К 0,5 мл плазмы было добавлено в случае А и В 0,02 мл полиоксидилсорбитанмоноолеата, а в случае Б и Г — 0,01 мл полиоксидилсорбитантриолеата.

Р и с. 200. Круговая хроматограмма образцов инсулина (Падр и сотрудники).

Хроматографирование в системе: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода. Проявление бромфеноловым синим (Д 132). 1 — кристаллический инсулин; 2 — протамин-Zn-инсулин; 3, 4 — глобин-Zn-инсулин; 5 — инсулин, смешанный (15 единиц/мг); 6 — инсулин аморфный (15 единиц/мг).



### Экстракция фенилтиогидантоинов

Кислый раствор после превращения фенилтиокарбамилпептидов, содержащий фенилтиогидантоин соответствующей N-концевой аминокислоты исходного пептида, экстрагируют этилацетатом. Большинство ФТГ, кроме производных гистидина и аргинина, экстрагируют этилацетатом из кислого раствора (ФТГ аланина, валина и лейцина, кроме этилацетата, экстрагируются также эфиром). ФТГ-гистидин можно экстрагировать этилацетатом даже после нейтрализации водного раствора до pH 7—7,5. ФТГ-аргинин не удается экстрагировать из щелочного раствора; уже при pH 9 наступает разложение.

Чистота ФТГ определяется измерением поглощения щелочного раствора ФТГ (растворенного в 3—6 мл абсолютного этанола) в пределах от 260 до 275 м $\mu$  через каждые 2,5 м $\mu$ . Отношение оптической плотности при 260 м $\mu$  к оптической плотности при максимальном поглощении для чистого препарата равно 0,85 или меньше. Средние значения составляют 0,76—0,88; более высокие значения свидетельствуют о загрязненности нециклизованным ФТК-пептидом или другими побочными продуктами.

### Идентификация фенилтиогидантоинов

Органический растворитель, содержащий ФТГ, выпаривают досуха и остаток растворяют в небольшом количестве ацетона. Часть приготовленного раствора применяют для прямого определения ФТГ, а остаток используют для отщепления свободной аминокислоты.

Мы сошлемся на работы, касающиеся получения ФТГ аминокислот (Эдман [1]), ФТГ серина, треонина и цистина (Инграм [3], Леви и Чунг [3]), ФТГ йодпроизводных тирозина (Рош и сотрудники), а также на получение ФТГ аспарагина и глутамина и изучение их инфракрасных спектров (Рамачандран и сотрудники [1]).

*Хроматографирование ФТГ-производных.* До сих пор известно сравнительно небольшое число хроматографических систем растворителей, позволяющих разделить отдельные фенилтиогидантоины. Наиболее широко применяемый метод прямого хроматографирования фенилтиогидантоинов предложил Шёквист. Хроматографическую бумагу ватман 1 пропитывают 0,5%-ным водным раствором крахмала (растворимый крахмал экстрагируют 2,5%-ным этанольным раствором 8-оксихинолина и промывают несколько раз этанолом) и просушивают при 40—50°. Затем анализируемый образец вместе с контрольным образцом ФТГ наносят на бумагу и стабилизируют в атмосфере паров водного слоя применяемой системы растворителей. Состав систем и значения  $R_f$  приведены в табл. 82<sup>1)</sup>. После окончания хроматографирования бумагу сушат в течение 5—10 мин при 90—100°. ФТГ проявляют опрыскиванием йодазидным реактивом (Д 163), нанося последний тонким слоем. Анализируемое вещество проявляется на хроматограмме в виде светлого пятна на темно-зеленом фоне. Чувствительность составляет около 0,5 мкг. Йодазидный реактив весьма чувствителен к присутствию серы, поэтому в процессе работы ни в коем случае нельзя пользоваться резиновыми пробками.

Другой способ хроматографирования и проявления применяет Ландман и сотрудники [1]. Перед употреблением хроматографическую бумагу пропитывают 0,05M фталатным буферным раствором с pH 6 (Кларке и Люббс)

<sup>1)</sup> Значения  $R_f$ , которые Шёквист определил для ФТГ-треонина, отвечают скорее дегидратированному продукту ФТГ- $\Delta$ -треонину.

и после сушки наносят на нее испытуемый образец вместе с контрольным образцом ФТГ. После этого бумагу насыщают в течение 24 час парами

Таблица 82

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  И РЕАКЦИИ 3-ФЕНИЛ-2-ТИОГИДАНТОИНОВ АМИНОКИСЛОТ

3-Фенил-2-тиогидантоин	Френкель-Конрат [2]			Ландман и сотрудники		
	гептан 7 пиридин 3	гептан 4 н-бутанол 2 НСООН 4	гептан 4 н-бутанол 4 НСООН 2	ксилол 3 уксусная кислота 2 0,05 М фталат- ный буфер (рН 6) 1	2-бутанол 7 0,05 М фталат- ный буфер (рН 6) 1	Д11, реактив Гроте
Ала	0,38	0,14	0,80	0,08	0,78	син.
Арг	0,00	0,00	0,24	0,00	0,44	син. ф.
Асп	0,05	0,02	0,64	0,03	0,13	син.
АспNH <sub>2</sub>	0,04	0,04	0,45	—	—	—
Цис	а)	а)	0,81	0,00	0,00	син.
ФА	0,38	0,32	0,87	0,30; 0,83; 0,90 б)	0,92	син. ж.
Глу	0,08	0,02	0,66	0,00	0,29	син.
ГлуNH <sub>2</sub>	0,04	0,01	0,50	—	—	—
Гли	0,25	0,03	0,66	0,30	0,78	кр.
Гис	0,05	0,00	0,20	0,00	0,78	ж.
ОНпр	0,21	0,02	0,73	—	—	—
ил	0,60	0,65	0,90	0,47; 0,90	0,92	син.
Л	0,60	0,55	0,91	0,41; 0,90	0,92	син.
Лиз	0,12	0,06	0,76	0,49	0,92	син. ф.
Мет	0,44	0,47	0,85	0,23	0,92	син.
Про	0,44	0,50	0,85	0,45; 0,87	0,92	син. нурп.
Сер	0,17	0,00	0,52	0,81	0,92	кр.
Тр	0,22	0,04	0,70	0,77	0,92	син.
Тир	0,19	0,02	0,77	0,10	0,92	ж.
Трипт	0,22	0,06	0,78	0,50	0,92	ж.
Вал	0,47	0,58	0,88	0,30; 0,85	0,92	син

а) Соединение разлагается.

б) Наиболее яркое пятно выделено жирным шрифтом.

нижней фазы системы, содержащей ксилол (табл. 82), или в течение более короткого времени — парами нижней фазы системы, содержащей 2-бутанол. После разделения и сушки хроматограмму опрыскивают реактивом Гроте (Д 11). После нагревания бумаги появляются окрашенные пятна ФТГ, которые более интенсивны, пока бумага влажная. Ряд фенилтиогидантоинов (например, ФТГ лейцина, фенилаланина, пролина, валина) дают при хроматографировании несколько пятен, которые также приведены в табл. 82. Наиболее яркие пятна и их окраска указаны в таблице жирным шрифтом. Авторы предполагают, что значения  $R_f$ , приведенные для ФТГ-производных серина, треонина и цистеина, не отвечают соответствующим фенилтиогидантоинам, а являются значениями  $R_f$  веществ, которые образуются из истинных ФТГ-производных в процессе анализа. (См. также данные для ФТГ-треонина, приведенные на стр. 480). Некоторые ФТГ, имеющие одинаковое значение  $R_f$ , можно легко отличить по различной окраске, например ФТГ лизина и триптофана. ФТГ валина в присутствии ФТГ фенилаланина различается только после гидролиза.

**Косвенное определение *N*-концевой аминокислоты.** Кроме хроматографирования ФТГ концевую аминокислоту можно определить после кислотного или щелочного гидролиза в виде свободной аминокислоты.

**Щелочной гидролиз:** согласно Эдману [1], ФТГ гидролизуют в течение 48 час с 0,25 н. раствором  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  при  $140^\circ$ . Ионы бария удаляют с помощью двуокиси углерода. При щелочном гидролизе, однако, разрушаются фенилтиогидантоины серина, треонина, цистеина, а из ФТГ-аргинина образуется ФТГ-орнитин. Фенилтиогидантоин триптофана дает после гидролиза два пятна, из которых наиболее интенсивно окрашенное образует триптофан. Кроме того, ФТГ-глутамин и ФТГ-аспарагин разлагаются.

Кислотный гидролиз фенилтиогидантоинов проводят нагреванием с 5,7 н. соляной кислотой при  $150^\circ$  в течение 16—20 час. Гидролизационные трубки рекомендуют эвакуировать до 20—30 мм рт. ст. (Френкель-Конрат [2]). Этот метод более удобен, нежели щелочной гидролиз, но здесь также образуются артефакты (например, триптофан отщепляет серин, ФТГ треонина, серина и цистина также разлагаются). Аминокислоты, полученные кислотным или щелочным гидролизом соответствующих ФТГ, хроматографируют обычным способом (рис. 190).

#### **Количественное исследование превращения фенилтиокарбамильных производных в фенилтиогидантоиновые производные и примеры методик**

Определение минимального времени, необходимого для определения наибольшего количества фенилтиогидантоинового производного при данных условиях реакции проводят путем исследования максимума поглощения в ультрафиолетовой области. Исследуют главным образом поглощение двух типов веществ, из которых одно (фенилтиокарбамильное производное) имеет максимум поглощения при 240 мμ, а второе (фенилтиогидантоиновое производное) — в пределах 265—270 мμ. Превращение первого во второе длится от 1,5 до 24 час при  $24^\circ$  и 0,5—7 час при  $40^\circ$ . Хотя реакция пептида с фенилизотиоцианатом протекает почти количественно, выход после выделения фенилтиогидантоинового производного составляет лишь 70—95%. Количество фенилтиогидантоинового производного определяют следующим образом: измеряют оптическую плотность раствора при максимуме поглощения, предполагая, что среднее значение коэффициента молекулярной экстинкции составляет около 16 000.

$$Q = \frac{Vd}{16},$$

где  $V$  — объем в миллилитрах;  $d$  — оптическая плотность раствора;  $Q$  — количество фенилтиогидантоинового производного (в микромолях). Исключение составляют лизин, треонин и цистин, которые имеют другие молярные коэффициенты экстинкции.

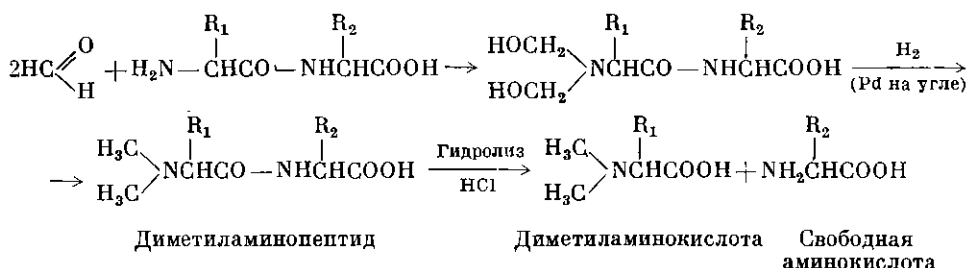
В качестве примера постепенного расщепления пептидов фенилтиоцианатным методом приводится модификация метода по Френкель-Конрату и Харрису [4] (*II 103*). Приведенным методом были, например, найдены следы первых 9 аминокислот в меланофорном пептиде (Харрис и Рус [2]) из одной навески, равной 2,8 мг. Эти методики, разработанные для определения последовательности аминокислот в пептидах, нельзя, однако, применять для белков, поскольку фенилтиокарбаматы белков не растворяются в кислой среде, которая необходима для отщепления фенилтиогидантоина.

Для постепенного расщепления белков, начиная с аминоконца, Френкель-Конратом [1] была разработана модификация метода, согласно которой все реакции протекают на полоске бумаги (II 104). Кроме двух приведенных модификаций, для постепенного расщепления N-концевых групп белков был разработан метод, согласно которому реакция белка с фенилизотиоцианатом протекает в растворе в присутствии солянокислого гуанидина (Френкель-Конрат [3]).

### МЕТОД ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ

Ингрэм [1, 3] разработал для определения N-концевых групп пептидов метод восстановительного метилирования, который является видоизменением весьма простого и широко применяемого метода определения микроколичеств пептидов.

Реакция протекает по следующей схеме:



Солянокислый пептид растворяют в метанольном растворе формальдегида и восстанавливают водородом, применяя в качестве катализатора палладий (II 105). При этом N-концевая аминокислота пептида превращается в соответствующую диметиламинокислоту. После гидролиза метилированного пептида идентифицируют диметилпроизводное N-концевой аминокислоты и неизмененную аминокислоту оставшейся части пептида.

Гидролиз метилированного пептида проводят нагреванием с 0,5 мл 6 н. соляной кислоты при 110° в течение 24 час. Диметилгликокол и монометилпролин являются по отношению к кислотному гидролизу гораздо более стойкими, нежели соответствующие ДНФ-производные.

Аминокислоты проявляют 0,1%-ным раствором нингидрина в *n*-бутаноле на холоду. Проявление диметиламинокислот проводят путем опрыскивания сухой хроматограммы раствором тимолового синего (II 125).

### Хроматографирование диметиламинокислот

Перед хроматографированием бумагу ватман 1 необходимо промыть 20%-ной уксусной кислотой. Для идентификации диметиламинокислот применяют двумерное хроматографирование; в первом направлении используют систему *n*-бутанол — пиридин — вода (5 : 2 : 3), во втором направлении — систему *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Удобно также хроматографировать в системе фенол — вода (4 : 1) в первом направлении и в системе бутанол — уксусная кислота — во втором. После разделения хроматограмму сушат при комнатной температуре. Диметиламинопроизводные фенилаланина, лейцина и изолейцина отделяют, используя *трет*-амиловый спирт, насыщенный водой, в атмосфере триметиламина.

Значения  $R_f$  диметиламинокислот приведены в табл. 83. Для хроматографирования необходимо брать приблизительно 2,2—1,0  $\mu$ М диметиламинокислоты.

Таблица 83

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ДИМЕТИЛАМИНОКИСЛОТ  
(по Ингрэму [3])

Диметиламинокислота	н-Бутанол 25	н-Бутанол 5	Фенол, насы- щенный водой
	Уксусная кислота 6 Вода 25	Пиридин 2 Вода 3	
Диметилгликокол . . . . .	0,27	0,13	0,86
Диметил- <i>l</i> -аланин . . . . .	0,35	0,20	0,88
Диметил- <i>l</i> -лейцин . . . . .	0,71	0,54	0,91
Диметил- <i>l</i> -изолейцин . . . . .	0,68	0,51	0,90
Диметил- <i>l</i> -тирозин . . . . .	0,53	0,48	0,88
Диметил- <i>l</i> -фенилаланин . . . . .	0,69	0,57	0,88
Диметил- <i>l</i> -глутаминовая кислота . . . . .	0,33	0,10	0,85
Тетраметил- <i>l</i> -орнитин . . . . .	0,16	0,09	0,86
Тетраметил- <i>l</i> -лизин . . . . .	0,14	0,07	0,79
Диметил- <i>l</i> -гистидин . . . . .	0,14	0,17	0,70
Тетраметил- <i>l</i> -цистин . . . . .	0,40	0,38	0,94
Монометил- <i>l</i> -пролин . . . . .	0,38	0,21	0,93
<i>l</i> -Аланин . . . . .	0,29	0,17	0,55

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ С-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ

В отличие от определения N-концевых групп в пептидных цепочках, для которого мы располагаем удобными и широко распространенными химическими методами идентификации, например динитрофенилирование или реакция с фенилизотиоцианатом, для работы с С-концевыми аминокислотами в пептидах и белках лучше всего зарекомендовал себя ферментативный (карбоксипептидазный) метод, который имеет, однако, некоторые ограничения. Этот метод нельзя, например, применять для нерастворимых белков (кератин и фиброин), и, кроме того, на течение реакции наряду с концевой аминокислотой оказывает влияние также предпоследняя аминокислота. Из химических методов для определения карбоксильных групп был разработан тиогидантоиновый метод, который дает относительно низкие выходы, и, кроме того, метод восстановления, сведения о котором, встречающиеся в литературе, весьма противоречивы. Нам кажется, что довольно хорошим методом, дополняющим результаты, полученные карбоксипептидазным методом, будет гидразинолиз, совместно с доказательством и определением С-концевой аминокислоты в виде динитрофенилпроизводного. Остальные методы, приведенные в табл. 84, применяются довольно редко.

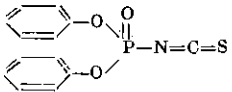
### КАРБОКСИПЕПТИДАЗНЫЙ МЕТОД

В последнее время приобретает важное значение постепенное расщепление белков и пептидов карбоксипептидазой из поджелудочной железы крупного рогатого скота (Ансон).

Сущность этого метода состоит в том, что раствор белка или пептида инкубируют с карбоксипептидазой, которая постепенно отщепляет аминокислоты от карбоксильного конца пептидной цепочки.

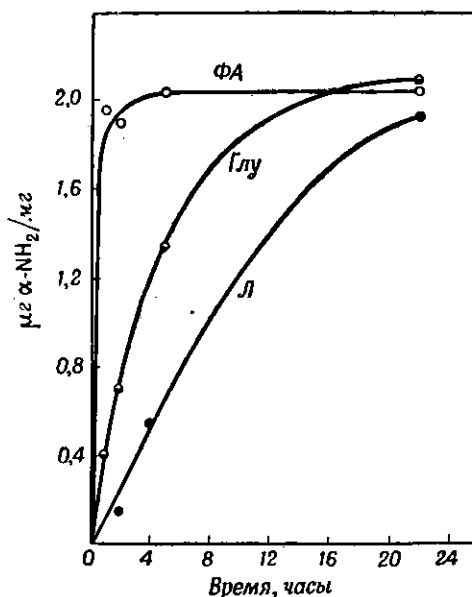
ОБЗОР МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ С-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ

Таблица 84

Автор	Реагент	Продукт реакции с пептидом		Конечная идентификация концевой группы
		первая ступень	последующая ступень	
Ленс	Карбоксипептидаза	—	—	Аминокислоты (количественно)
Буассона	$\text{CH}_3\text{OH}$ + анодное окисление	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_1 \\   \quad   \\ -\text{NHCHCO}-\text{NHCHOSCH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \\   \\ -\text{NHCHCOOH} + \text{R}_1\text{CHO} \\ \text{Альдегид} \end{array}$	Аминокислоты (по равенности)
Фроманго и сотрудники	$\text{LiAlH}_4$	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_1 \\   \quad   \\ -\text{NHCHCO}-\text{NHCHCH}_2\text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_1 \\   \quad   \\ -\text{NHCHCOOH} + \text{NH}_2\text{CHCH}_2\text{OH} \end{array}$	Аминоспирт
Акабори и сотрудники [1]	$\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_1 \\   \quad   \\ \text{NH}_2\text{CHCONHNH}_2 + \text{NH}_2\text{CHCOOH} \end{array}$	—	Аминокислота или ДНФ-аминокислота
Чамберс и Карпентер	$\text{NH}_3$	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_1 \\   \quad   \\ \text{NH}_2\text{CHCONH}_2 + \text{NH}_2\text{CHCOOH} \end{array}$	—	Аминокислота
Шлак и Кумпф	$\text{NH}_4\text{CNS}$	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_1\text{CH}-\text{C}=\text{O} \\   \quad   \quad   \\ -\text{NHCHCO}-\text{N}-\text{C}-\text{NH} \\   \\ \text{S} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{CH}-\text{C}=\text{O} \\   \quad   \\ \text{NH}-\text{C}-\text{NH} \\   \\ \text{S} \end{array}$	Тиогидантоин или аминокислота
Кеннер и сотрудники [1]		$\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_1 \\   \quad   \\ -\text{NHCHCO}-\text{NHCHCONCS} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_1\text{CH}-\text{CO} \\   \quad   \\ -\text{NHCHCO}-\text{N}-\text{C}-\text{NH} \\   \\ \text{S} \end{array}$	Аминокислота
Кхорана	$\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{CO}-\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ -\text{CONHCH}-\text{CO} \\   \\ \text{R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCO}-\text{NHCHCONH} \\   \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3 \end{array}$	Аминокислота

Обзор свойств этого фермента приводят Нейрат и Шверт, а также Смит. Вкратце данные о карбоксипептидазе можно свести к следующему: от пептидной цепочки быстрее всего отщепляются ароматические аминокислоты, затем алифатические кислоты с длинной цепочкой и труднее всего аминокислоты с короткой алифатической цепочкой. Если по соседству с расщепляемой связью находится кислая или основная аминокислота, то действие фермента заметно замедляется. Концевой пролин или оксипролин устойчив по отношению к ферментативному расщеплению карбоксипептидазой. Кроме того, известно, что этим ферментом не расщепляются ни амиды, ни *d*-аминокислоты.

Кристаллический фермент хранят на холоду в виде суспензии в воде, и перед применением кристаллики фермента ополаскивают водой для удаления свободных аминокислот. Фермент переводят в раствор по способу, описанному в II 106. Для собственно аналитической работы важно, чтобы фермент не был загрязнен свободными аминокислотами и особенно химотрипсином, поскольку последний легко отщепляет пептидные цепочки в месте присоединения ароматических аминокислот, которые карбоксипептидаза отщепляет особенно легко. Как пример постепенного отщепления аминокислот от С-конца пептидной цепочки мы приводим определение С-концевого ряда аминокислот в кортикотропине А (Уайт [1]).



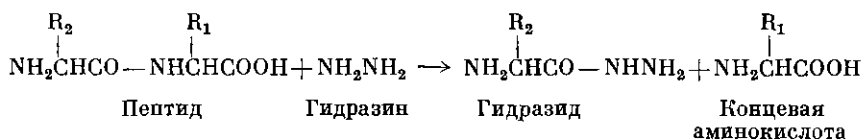
Р и с. 191. Скорость выделения аминокислот из кортикотропина А при действии карбоксипептидазы (Уайт [1]).

Образец кортикотропина инкубировали при 37° с 1%-ным раствором карбоксипептидазы в 0,1 *M* уксуснокислом аммонии при рН 7,5 в течение 24 час. С помощью добавления уксусной кислоты реакцию останавливали и буфер удаляли вымораживанием. Остаток делили на две части и хроматографировали как в 72%-ном феноле, так и в смеси 3%-ный аммиак—2-бутанол (1 : 3). Были найдены лишь фенилаланин, глутаминовая кислота и лейцин. Последовательность этих аминокислот в кортикотропине определяли, используя другой образец кортикотропина А, который инкубировали в аналогичных условиях, но с той разницей, что через соответствующие промежутки времени отбирали образцы, которые количественно промеряли фотометрическим методом на одномерной хроматограмме. По количеству выделившихся аминокислот (рис. 191) за известные промежутки времени была получена последовательность следующих трех аминокислот: лейцин, глутаминовая кислота, фенилаланин.

Действие карбоксипептидазы на ДФН-пептиды с идентификацией С-концевых аминокислот методом хроматографии на бумаге систематически изучали Вальдшмидт-Лейтц и Гаусс [1].

## ГИДРАЗИНОЛИЗ

Акабори и сотрудники [2] предложили метод определения С-концевых аминокислот, основанный на реакции пептидов или белков с безводным гидразином. При этом все пептидные связи расщепляются с образованием гидразидов, за исключением последней (С-концевой) аминокислоты, которая остается свободной. Схема реакции:



Реакцию проводят нагреванием пептида или белка с безводным гидразином в течение нескольких часов при 100° (о получении безводного гидразина см. у Браунитцера). После реакции избыток гидразина необходимо быстро удалить, так как некоторые из образовавшихся гидразидов неустойчивы (серина, гликокола, треонина) и легко разлагаются на свободные аминокислоты, которые ошибочно можно принять за концевые аминокислоты. Гидразиды удаляют обработкой бензальдегидом в виде труднорастворимого соединения или лучше всего реакцией с *n*-нитробензальдегидом (Браунитцер). Некоторые авторы, например Акабори и сотрудники [1], применяли изовалериановый альдегид, не содержащий перекиси. Отщепляющуюся С-концевую аминокислоту определяют затем двумерным хроматографированием. В первом направлении в качестве растворителя используют фенол, так как при этом удаляются вещества, которые движутся в феноле с фронтом растворителя и дают цветные реакции с нингидрином. Во втором направлении применяют бутанол с уксусной кислотой. Большинство аминокислот сравнительно устойчиво к гидразинолизу, и их можно получать с выходом 85%. Глутаминовую и аспарагиновую кислоты получают с 20—30%-ным выходом. Цистин при гидразинолизе полностью разлагается, а аргинин переходит в орнитин. Цистеиновая кислота, по-видимому, устойчива к гидразинолизу. В некоторых случаях было отмечено, что метионин при удалении гидразидов бензальдегидом превращается в метионинсульфоксид.

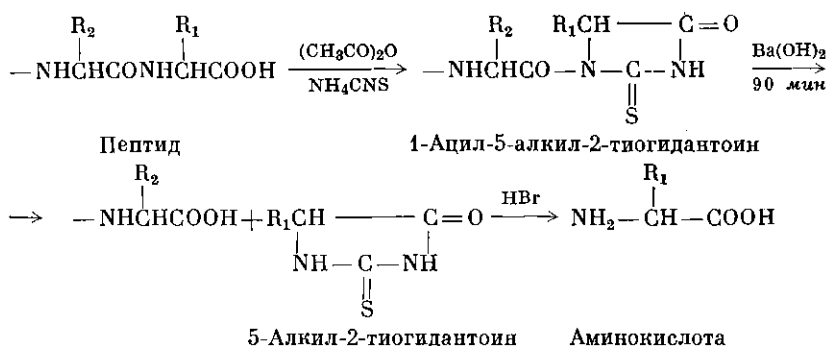
Затруднения при идентификации С-концевых аминокислот с помощью гидразинолиза имеют место в том случае, когда такими кислотами являются тирозин, цистин, гистидин и триптофан, поскольку при этом обнаруживается большое сходство между динитрофенилпроизводными (Акабори и сотрудники [1]). Если сократить время гидразинолиза, то можно отщепить концевые ди- и трипептиды (Браунитцер).

Пример определения С-концевой аминокислоты в белках см. в II 107.

## ТЮГИДАНТОИНОВЫЙ МЕТОД

В основе этого метода лежит реакция между С-концевой аминокислотой пептида или белка и роданидом аммония в среде уксусного ангидрида, приводящая к образованию ацилтиогидантоина. Это производное разлагается гидратом окиси бария на тиогидантоин С-концевой аминокислоты и оставшуюся часть пептидной цепочки.

Схема реакции:



Выделившийся тиогидантоин извлекают из нейтрального раствора двукратной экстракцией уксусноэтиловым эфиром. Двукратная экстракция необходима в том случае, когда мы хотим получить однозначные результаты при хроматографировании С-концевой аминокислоты. Определение второй от карбоксильного конца аминокислоты проводят следующим образом: водный раствор после экстракции тиогидантоина вымораживают и остаток обрабатывают таким же образом, как и при определении первой аминокислоты.

Последовательное расщепление С-концевой аминокислоты пептидов описано в II 108, а для белков в II 109.

### Идентификация тиогидантоинов

*Хроматографирование тиогидантоинов.* Концевую аминокислоту идентифицируют либо непосредственным хроматографированием тиогидантоинов, либо хроматографированием аминокислот после гидролиза тиогидантоинов. По прямому методу тиогидантоины проявляют на хроматограмме путем осторожного опрыскивания реактивом Фолина—Дениса; тиогидантоины проявляются в виде синих пятен. Другие цветные реакции описывает Эдвард и Нильсен. Значения  $R_f$  тиогидантоинов для некоторых систем приведены в табл. 85.

Таблица 85

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ТИОГИДАНТОИНОВ АМИНОКИСЛОТ  
(Эдвард и Нильсен)

Аминокислота	н-Бутанол, насыщенный водой	Бензин (т. кип. 100—120°) 1 Пропионовая кислота 1	Аминокислота	н-Бутанол, насыщенный водой	Бензин (т. кип. 100—120°) 1 Пропионовая кислота 1
Гликокол . . . . .	0,45	0,10	Аспарагин . . . . .	0,24	0,17
Аланин . . . . .	0,69	0,24	Глутаминовая . . . . .	0,10—0,37	0,10
Валин . . . . .	0,90	0,52	Триптофан . . . . .	0,85	0,22
Лейцин . . . . .	0,94	0,66	Ацетиллизин . . . . .	0,62	0,09
Изолейцин . . . . .	0,94	0,66	Цистеин . . . . .	0,71	0,48
Метионин . . . . .	0,80	0,37	Серин . . . . .	0,50, 0,70	0,15
Фенилаланин . . . . .	0,90	0,47	Треонин . . . . .	0,55, 0,76	0,10, 0,30
Тирозин . . . . .	0,81	0,10	Гистидин . . . . .	0,00, 0,35	0,00, 0,05
Аспарагиновая . . . . .	0,11	0,05	Аргинин . . . . .	0,00, 0,15	0,00

*Гидролиз тиогидантоинов.* Большинство тиогидантоинов превращается в свободные аминокислоты при гидролизе гидратом окиси бария (II 110) или бромистоводородной кислотой (II 111). При щелочном гидролизе имеют место некоторые изменения в составе аминокислот, например серин превращается в аланин, треонин разлагается на гликокол и  $\alpha$ -аминомасляную кислоту (Баптист и Булл).

#### ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

При анализе аланилметионина (Тернер и Шмерцлер) был получен однозначный результат только при гидролизе соответствующего тиогидантоина гидроокисью бария; при гидролизе бромистоводородной кислотой вместо одного пятна метионина получалось несколько пятен. У фталилаланилсерина не удавалось определить С-концевую аминокислоту. К подобному же результату приводил анализ лейцилпролилглицина, где в качестве концевой аминокислоты открывали лишь гликокол; пролин не дает тиогидантоина. Точно так же нельзя определить тиогидантоиновым методом концевую аминокислоту в случае аспарагиновой и глутаминовой кислот, лизина и аргинина. Из амидов можно выделить только аспарагин (если для гидролиза тиогидантоина применять гидроокись бария).

#### МЕТОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ

Этерифицированный пептид или белок восстанавливают в N-этилморфолине или в другом безводном растворителе с помощью  $\text{LiAlH}_4$  (Фромажо и сотрудники) или  $\text{LiBH}_4$  (Чибнелл и Рис [1]). При этом карбоксильная группа С-концевой аминокислоты восстанавливается в первичную спиртовую группу. После кислотного гидролиза образуется аминоспирт, который можно экстрагировать эфиром и определить хроматографией на бумаге или непосредственно, или после превращения в соответствующий ДНФ-аминоспирт. Аминоспирты реагируют с нингидрином так же, как аминокислоты, но чувствительность реакции приблизительно в десять раз меньше. Пролинol легче определить реакцией с изатином (Д 114); при этом возникает синее окрашивание. Значения  $R_f$  аминоспиртов в некоторых системах приведены в табл. 86.

Восстановление белков часто можно проводить без предварительной этерификации. В качестве примера может служить определение концевой группы пепсина (II 112).

Модифицированный метод восстановления с определением С-концевой аминокислоты в форме ДНФ-аминоспиртов приводит Ютиш [1]. В этой работе указаны также значения  $R_f$  ДНФ-аминоспиртов на бумаге, пропитанной силиконом. Другие системы растворителей, удобные для хроматографирования ДНФ-аминоспиртов на необработанной бумаге, приведены в табл. 87.

#### АНОДНОЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ

Пептид с защищенной аминогруппой (I) (ДНФ-пептид или N-карбобензоксипептид) подвергают анодному окислению в растворе метанола (Буассона). При этом образуется ариламиносэфир (II) с выходом 74—91 %.

Таблица 86

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АМИНОКИСЛОТ И АМИНОСПИРТОВ  
(Фромажо и сотрудники)

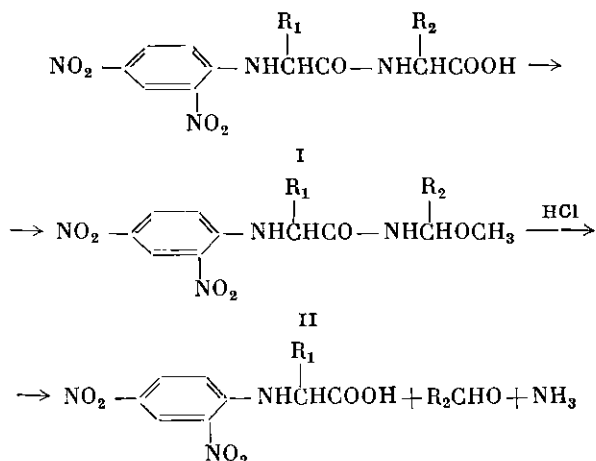
Аминокис- лота	Аминоспирт	н-Бутанол Уксусная кислота Вода	77 6 17	н-Бутанол, насыщенный 0,1%-ным NH <sub>3</sub>	Фенол, насыщенный 0,1%-ным NH <sub>3</sub>
Гли . . . . .		0,07		0,06	0,33
	Коламин . . . . .	0,18		0,15	0,74
Ала . . . . .		0,13		0,12	0,56
	Аланинол . . . . .	0,25		0,23	0,83
Сер . . . . .		0,06		0,06	0,32
	Серинол . . . . .	0,16		0,15	0,69
Тр . . . . .		0,10		0,09	0,48
	Треонинол . . . . .	0,17		0,31	—
Вал . . . . .		0,30		0,24	0,77
	Валинол . . . . .	0,40		0,49	1,00
Л . . . . .		0,46		0,44	0,82
	Лейцинол . . . . .	0,53		0,63	1,00
иЛ . . . . .		0,44		0,39	0,82
	Изолейцинол . . . . .	0,50		0,63	1,00
Про . . . . .		0,15		0,14	0,19
	Пролинол . . . . .	0,28		0,26	1,00
ФА . . . . .		0,39		0,44	0,82
	Фенилаланинол . . . . .	0,54		0,70	1,00
Тир . . . . .		0,21		0,24	0,59
	Тирозинол . . . . .	0,40		0,54	0,81
Асп . . . . .		0,05		0,01	0,17
	Аспардинол . . . . .	0,19		0,23	0,82
Глу . . . . .		0,09		0,01	0,23
	Глутатинол . . . . .	0,21		0,23	0,85
Лиз . . . . .		0,02		0,01	0,53
	Лизинол . . . . .	0,08		0,07	0,78
Арг . . . . .		0,04		0,03	0,68
	Аргининол . . . . .	0,08		0,07	—
Гис . . . . .		0,03		0,07	0,64
	Гистидинол . . . . .	0,08		0,12	—

Таблица 87

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ДИНИТРОФЕНИЛАМИНОСПИРТОВ

	Декалин Уксусная кислота Изоамило- вый спирт	15 10 2	Декалин 10%-ная ук- сусная кис- лота Изоамило- вый спирт	15 10 4	Изооктан изо-Пропанол Вода	60 15 3
	Грассман и сотрудники				Яценевич и Там	
ДНФ-лейцинол . . . . .	1,00		0,86		0,88	
ДНФ-валинол . . . . .	0,68		0,77		0,83	
ДНФ-фенилаланинол . . . . .	0,51		0,82		0,79	
ДНФ-пролинол . . . . .	0,31		0,65		—	
ДНФ-аланинол . . . . .	0,25		0,53		0,57	
ДНФ-коламин . . . . .	0,12		0,29		0,32	
ДНФ-серинол . . . . .	—		—		0,20	

Осторожным гидролизом отщепляют остаток С-концевой аминокислоты исходного пептида в виде соответствующего альдегида, в результате чего остается пептид, содержащий на одну аминокислоту меньше. Полным гидролизом этой части пептида находят, какая аминокислота отщепилась.

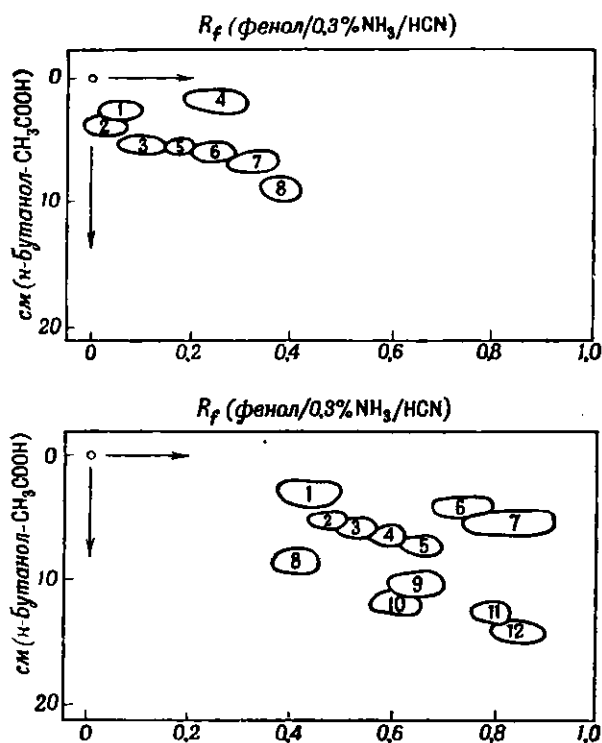


Декарбоксилирование можно повторить с оставшейся частью пептида. Томпсон обнаружила, что фенилаланин и тирозин в этих условиях исчезают полностью даже тогда, когда они не являются С-концевыми аминокислотами. Нежелательное разложение происходит лишь с этими ароматическими аминокислотами независимо от длины цепи. Метод был испытан на примерах постепенного расщепления ДНФ-ди-, ДНФ-три- и ДНФ-тетрапептидов. Для анализа пептид достаточно взять в количестве 1  $\mu\text{M}$  (II 113).

### ПРИМЕР ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ В ПЕПТИДАХ

В качестве примера приведем определение строения знеапептида, получающегося из цитохрома С (из сердца лошади) путем ферментативного гидролиза с последующей очисткой (Туппи и Бодо [27]). Мы опишем лишь ту часть, где для определения строения применялись методы, рассмотренные в данной главе.

*Частичный гидролиз и предварительное фракционирование.* Пептид, соответствующий 200 мг исходного цитохрома С, подвергался гидролизу в течение 4,5 дня с концентрированной соляной кислотой при 37°. После удаления избытка кислоты в вакууме и повторного удаления избытка с водой продукты частичного гидролиза были разделены электрофоретически в приборе с четырьмя ячейками (Зангер и Туппи [4]) на три фракции, содержащие нейтральные, кислые и основные компоненты. В основной фракции были найдены лишь свободные гистидин и лизин. Нейтральная и кислая фракции были далее разделены путем двумерного хроматографирования на бумаге ватман 4. Для первого направления в качестве растворителя был использован фенол (более длинная сторона хроматографической бумаги), а для второго направления — смесь *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5).



Р и с. 192. Хроматограммы частичного гидролизата энеапептида из цитохрома С (Туппи и Бодо [2]).  
Вверху — нейтральная фракция N, внизу — кислая фракция K.

Таблица 88

ПЕПТИДЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПРОДУКТА ЧАСТИЧНОГО ГИДРОЛИЗА ЭНЕАПЕПТИДА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ЦИТОХРОМА С (Туппи и Бодо [2])

Полный гидролизат динитрофенилированного энепептида	ДНФ-ЦиSO <sub>3</sub> H <sup>а</sup> ) Ала <sup>а</sup> ) Глу <sup>а</sup> ) ЦиSO <sub>3</sub> H <sup>а</sup> ) им-ДНФ-Гис <sup>а</sup> ) Тр <sup>а</sup> ) Вал <sup>а</sup> ) ε-ДНФ-Гис <sup>а</sup> )		
Пептиды, выделенные из продукта частичного гидролиза энепептида	<u>ЦиSO<sub>3</sub>H·Ала</u> K <sub>6</sub>	<u>Глу·ЦиSO<sub>3</sub>·H</u> K <sub>2</sub>	<u>Вал·Глу</u> N <sub>10</sub>
	<u>ЦиSO<sub>3</sub>H (Ала, Глу)</u> K <sub>3</sub>		<u>Тр (Вал, Глу)</u> N <sub>1</sub>
	<u>Ала·Глу</u> K <sub>8</sub>	<u>ЦиSO<sub>3</sub>H·Гис</u> N <sub>1</sub>	<u>Глу·Лиз</u> N <sub>6</sub>
		<u>Глу(ЦиSO<sub>3</sub>H·Гис)</u> K <sub>4</sub>	<u>Тр·(Вал, Глу, Лиз)</u> N <sub>7</sub>
Найденная структура	ЦиS·Ала· Глу·ЦиS·Гис·Тр·Вал·Глу·Лиз		

<sup>a</sup>) Визуальная оценка интенсивности пятен.

Пептиды обнаруживали, с одной стороны, путем нагревания бумаги до 105° с наблюдением флуоресценции в ультрафиолетовом свете, с другой стороны, опрыскиванием хроматограммы 0,025%-ным раствором нингидрина в этаноле. Положение на хроматограмме пептидов нейтральной (N) и кислой (K) фракций можно видеть на рис. 192. Отдельные пептиды были элюированы из хроматограммы, и методом Зангера (динитрофенилпроизводные) были определены N-концевые аминокислоты.

Анализом низших пептидов (табл. 88) была найдена группировка Цис·Ала·Глу·Цис·Гис и Тр·Вал·Глу·Лиз.

В гидролизате ДНФ-энеапептида была найдена ДНФ-цистеиновая кислота, чем было доказано, что N-концевой аминокислотой является цистеиновая кислота. Из приведенных выше результатов следует, что структуру энеапептида составляет ряд последовательно расположенных аминокислот Цис·Ала·Глу·Цис·Гис·Тр·Вал·Глу·Лиз. Среди продуктов расщепления не был обнаружен пептид, содержащий связь гистидин—треонин, очевидно потому, что пептидные связи, в которых участвует треонин своей аминокислотой, при кислотном гидролизе расщепляются очень легко.

Аналогичными методами и преимущественно методом хроматографии на бумаге Зангер установил строение инсулина (см. Райл с сотрудниками).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Abderhalden E., Blumberg P., Z. physiol. Chem., 65, 318 (1910).  
 Acher R., Crocker C., Biochim. biophys. Acta, 9, 704 (1952). [1]  
 Acher R., Fromageot C., Jutisz M., Biochim. biophys. Acta, 5, 81 (1950). [2]  
 Acher R., Laurila U. R., Fromageot C., Biochim. biophys. Acta, 19, 97 (1956). [3]  
 Akabori S., Ohno K., Ikenaka T., Okoda Y., Hanafusa H., Haruna I., Tsugita A., Sugae K., Matsushima T., Bull. chem. Soc. Japan, 29, 507 (1956). [1]  
 Akabori S., Ohno K., Narita K., Bull. chem. Soc. Japan, 22, 214 (1952). [2]  
 Anson M. L., J. gen. Physiol., 20, 663 (1937).  
 Baptist V. H., Bull. H., J. Am. Chem. Soc., 75, 1727 (1953).  
 Bergmann M., Miekeley A., Kann E., Ann., 458, 56 (1927).  
 Biserte G., Osteux R., Bull. Soc. Chim. biol., 33, 50 (1951).  
 Blackburn S., Lowther A. G., Biochem. J., 48, 126 (1951).  
 Block R. J., Anal. Chem., 22, 1327 (1946).  
 Boissonas R. A., Helv. chim. Acta, 35, 2226 (1952).  
 Brandt E., Ann. N. Y. Acad. Sci., 47, 186 (1946).  
 Braunitzer G., Chem. Ber., 88, 2025 (1955).  
 Conden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Biochem. J., 41, 590 (1947).  
 Cook A. H., Levy A. L., J. Chem. Soc., 1950, 646.  
 Dahlerup H., Petersen B., Linderström-Lang P., Ottesen M., Acta chem. Scand., 6, 1135 (1952).  
 Edman P., Acta chem. Scand., 4, 283 (1950). [1]  
 Edman P., Nature, 177, 667 (1956). [2]  
 Edward J. T., Nielsen S., Chem. and Ind., 1953, 197.  
 Elmore D. T., Toseland P. A., J. Chem. Soc., 1954, 4533.  
 Evans G. G., Reith W. S., Biochem. J., 56, 111 (1954).  
 Felix K., Kerkels A., Z. physiol. Chem., 290, 78 (1952).  
 Fraenkel-Conrat H., J. Am. Chem. Soc., 76, 3606 (1954). [1]  
 Fraenkel-Conrat H., в книге D. Glick (red.), Methods of Biochemical Analysis. Vol. II, Interscience Publ., New York, 1955, p. 383. [2]  
 Fraenkel-Conrat H., Fraenkel-Conrat J., Acta chem. Scand., 5, 1409 (1951). [3]  
 Fraenkel-Conrat H., Harris J. I., J. Am. Chem. Soc., 76, 6058 (1954). [4]  
 Fromageot C., Jutisz M., Meyer D., Pénasse J., Bioch. biophys. Acta, 6, 283 (1950).  
 Grassmann W., Hörmann H., Endres H., Chem. Ber., 86, 1477 (1953).

- Hanes C. S., Hird F. J. R., Isherwood F. A., *Biochem. J.*, **51**, 25 (1952).  
Harris J. I., Li C. H., *J. biol. Chem.*, **213**, 499 (1955). [1]  
Harris J. I., Roos P., *Nature*, **178**, 90 (1956). [2]  
Heyns K., Anders G., *Z. physiol. Chem.*, **287**, 8, 16 (1951).  
Hofmann K., Peckham W. D., Rheiner A., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 238 (1956).  
Holley R. W., Holley A. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1110 (1954).  
Horn M. J., Jones D. S., Ringel S. J., *J. biol. chem.*, **144**, 87, 93 (1942).  
Chambers R. W., Carpenter F. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1527 (1955).  
Chibnall A. C., Rees M. W., *Biochem. J.*, **48**, lvi (1951). [1]  
Chibnall A. C., Rees M. W., *Biochem. J.*, **52**, iii (1952). [2]  
Christensen H. N., *J. biol. Chem.*, **160**, 75 (1945).  
Ingram V. M., *Nature*, **166**, 1038 (1950). [1]  
Ingram V. M., *J. biol. Chem.*, **202**, 193 (1953). [2]  
Ingram V. M., *J. Chem. Soc.*, **1953**, 3717. [3]  
Iwainsky H., *Z. physiol. Chem.*, **297**, 194 (1954).  
Jatzkewitz H., Tam N. D., *Z. physiol. Chem.*, **296**, 188 (1954).  
Jepson J. B., Smith I., *Nature*, **172**, 1100 (1953).  
Jutisz M., Privat de Garilhe M. P., Suquet M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **36**, 117 (1954). [1]  
Jutisz M., Ritchard W., *Biochim. biophys. Acta*, **17**, 546 (1955). [2]  
Keil B., *Chem. Listy*, **51**, 1927 (1957). [1]  
Keil B., Knesslová V., Šorm F., *Chem. Listy*, **46**, 167 (1952). [2]  
Keil B., Tomášek V., Sedláčková J., *Chem. Listy*, **46**, 457 (1952). [3]  
Kenner G. W., Khorana H. G., *J. Chem. Soc.*, **1952**, 2076. [1]  
Kenner G. W., Khorana H. G., Stedman R. J., *J. Chem. Soc.*, **1954**, 673. [2]  
Kent P. W., Lawson G., Senior A., *Science*, **113**, 354 (1951).  
Khorana H. G., *J. Chem. Soc.*, **1952**, 2081.  
Knight C. A., *J. biol. Chem.*, **190**, 753 (1951).  
Landmann W. A., Drake M. P., Dillaha J., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3638 (1953).  
Lens J., *Biochim. biophys. Acta*, **3**, 367 (1949).  
Levy A. L., *J. Chem. Soc.*, **1950**, 404. [1]  
Levy A. L., в книге Glick D. (red.), *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. II, Interscience Publ., New York, 1955, p. 360. [2]  
Levy A. L., Chung D., *Biochim. biophys. Acta*, **17**, 457 (1955). [3]  
Levy A. L., Chung D., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2899 (1955). [4]  
Levy A. L., Li C. H., *J. biol. Chem.*, **213**, 487 (1955). [5]  
Mellon E. F., Korn A. H., Hoover S. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1675 (1953).  
Meloun B., Šorm F., *Chem. Listy*, **48**, 1670 (1954).  
Mikeš O., *Chem. Listy*, **51**, 138 (1957).  
Mills G. J., *Biochem. J.*, **50**, 707 (1952).  
Monier R., Jutisz M., *Biochim. biophys. Acta*, **14**, 551 (1954). [1]  
Monier R., Pénasse J., *Compt. rend.*, **230**, 1176 (1950). [2]  
Neurath H., Schwert G. W., *Chem. Rev.*, **46**, 69 (1950).  
Ottesen M., Wollenberger A., *Compt. rend. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **28**, 463 (1953).  
Pardee A. B., *J. biol. Chem.*, **190**, 757 (1951).  
Phillips D. M. P., *Biochem. J.*, **42**, 287 (1948).  
Ramachandran L. K., Epp A., McConnel W. B., *Anal. Chem.*, **27**, 1734 (1955). [1]  
Ramachandran L. K., McConnel G., *Nature*, **176**, 931 (1955). [2]  
Rao K. R., Sober H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1328 (1954).  
Rees M. W., *Biochem. J.*, **40**, 632 (1946).  
Reindel F., Hoppe W., *Chem. Ber.*, **87**, 1103 (1954).  
Reith W. S., Waldron N. M., *J. biol. Chem.*, **56**, 116 (1954).  
Roche J., Michel R., Nunez J., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 229 (1955).  
Roverly M., Fabre C., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **35**, 541 (1953).  
Ryle A. P., Sanger F., Smith L. F., Kitai R., *Biochem. J.*, **60**, 541 (1955).  
Sanger F., *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945). [1]  
Sanger F., Thompson E. O. P., *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 225 (1952). [2]  
Sanger F., Thompson E. O. P., *Biochem. J.*, **53**, 353 (1953). [3]  
Sanger F., Tuppy H., *Biochem. J.*, **49**, 463 (1951). [4]  
Scanes F. S., Tosser B. T., *Biochem. J.*, **63**, 282 (1956).  
Schaffer N. K., Harsman S., Engle R. R., *J. biol. Chem.*, **214**, 799 (1955).

- Schied U., Restle H., Z. Naturforsch., 9b, 182 (1954).  
 Schlack P., Kumpf W., Z. physiol. Chem., 154, 125 (1926).  
 Schroeder W. A., Le Gette J., J. Am. Chem. Soc., 75, 4612 (1953).  
 Sjöquist J., Acta chem. Scand., 7, 447 (1953).  
 Smith E. L., в книге Advances in Enzymology. Vol. XII. Interscience Publ., New York — London, 1951, p. 225.  
 Spackmann P. H., Smith E. L., Brown D. M., J. biol. Chem., 212, 255 (1955).  
 Steinhardt J., J. biol. Chem., 141, 990 (1944). [1]  
 Steinhardt J., Fugitt C. H., J. Research natl. Bur. Stand., 29, 315 (1942). [2]  
 Šorm F., Kőrbl J., Matoušek L., Coll. Czechoslov. chem. Commun., 15, 295 (1950).  
 Thompson A. R., Biochim. biophys. Acta, 15, 299 (1954).  
 Toennies G., Homiller R. R., J. Am. Chem. Soc., 64, 3054 (1942) [1]  
 Toennies G., Kolb J. J., Anal. Chem., 23, 823 (1951). [2]  
 Tristram G. R., Adv. Protein Chem., 5, 124 (1949).  
 Tuppy H., Monatsh. Chem., 84, 996 (1953). [1]  
 Tuppy H., Bodo G., Monatsh. Chem., 85, 1024 (1954). [2]  
 Turba F., в книге Wolstenholme E. W., Cameron M. P. (red.) The Chemical Structure of Proteins (CIBA Symposium), J. A. Churchill, London, 1953, p. 142. [1]  
 Turba F., Chromatographische Methoden in der Proteinchemie. Springer, Berlin, 1954, S. 205. [2]  
 Turba F., Gundlach G., Biochem. Z., 326, 322 (1955). [3]  
 Turner R. A., Schmerzler G., Biochem. biophys. Acta, 13, 553 (1954).  
 Udenfriend S., Velick S. F., J. biol. Chem., 191, 233 (1951).  
 Waldschmidt-Leitz E., Gauss K., Z. physiol. Chem., 293, 10 (1953). [1]  
 Waldschmidt-Leitz E., Zeiss O., Z. physiol. Chem., 300, 49 (1955). [2]  
 Walley S. G., Watson J., J. Chem. Soc., 1951, 2394.  
 Wessely F., Schlögl J., Korger G., Monatsh. Chem., 83, 1157 (1952).  
 White W. F., J. Am. Chem. Soc., 75, 4877 (1953). [1]  
 White W. F., Landmann W. A., J. Am. Chem. Soc., 77, 771, 1711 (1955). [2]  
 Wieland T., Ann., 564, 152 (1949). [1]  
 Wieland T., Kawerau E., Nature, 168, 77 (1951). [2]  
 Wieland T., Wirth L., Chem. Ber., 82, 468 (1949). [3]  
 Wood J. L., Kingsland M., Cooley G., Arch. Biochem. Biophys., 25, 141 (1950).  
 Zimmermann G., Chem. Technik, 6, 266 (1954).

# БЕЛКИ

---

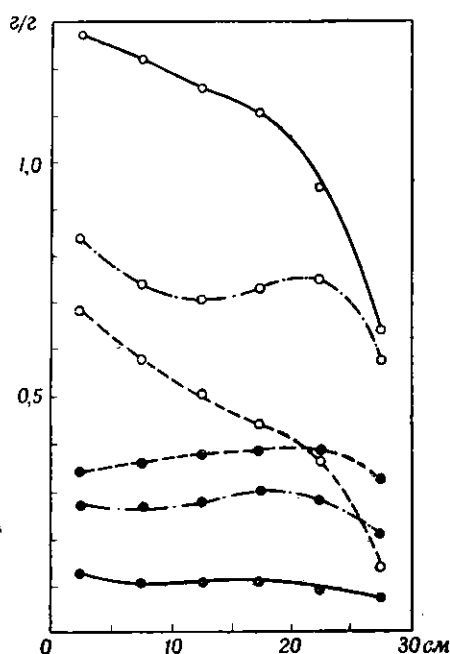
К. Мацек

Успешные результаты хроматографического разделения низкомолекулярных соединений на бумаге явились предпосылкой для применения этого метода с целью разделения высокомолекулярных соединений. Если не учитывать капиллярного анализа, то впервые применил метод хроматографии на бумаге для концентрирования вируса табачной мозаики и его обнаружения на бумаге Кокран. Несколько позже Тизелиус показал, что белки можно адсорбировать на фильтровальной бумаге из растворов различных солей, концентрация которых ниже, чем требуется для высаливания (см. также стр. 40). На этом принципе было основано большинство более поздних работ по идентификации ферментов или белков сыворотки крови. Только некоторые белки с низким молекулярным весом можно разделять хроматографированием в двухфазных системах растворителей. В последнее время удалось с большим успехом применить ионообменники на основе целлюлозы типа ECTEOA или DEAE по Петерсону и Соберу. Эти ионообменники имеют для случая белков много преимуществ по сравнению с существовавшими до сих пор методами хроматографии на бумаге и по сравнению с хроматографированием на ионообменных смолах.

При распределении белков на бумаге лишь в отдельных случаях можно говорить о разделяющем действии. Если исключить некоторые новые данные об ионообменниках целлюлозного типа, то тем самым мы получим возможность по отношению ко всей группе белков говорить о действии, которое Тизелиус назвал «высаливающей хроматографией». В качестве подвижной фазы используют системы, содержащие вещество, которое снижает растворимость отделенного белка и тем самым повышает его адсорбцию на бумаге. Для снижения растворимости белков можно применить растворы солей различной концентрации или добавки смешивающихся с водой органических растворителей (ацетон, этанол), а также использовать специальный метод Симона, основанный на снижении растворимости белков за счет уменьшения их сольватации путем удаления ионов, благодаря чему белок становится чувствительным к изменениям pH; такие условия можно получить, например, при использовании весьма разбавленных растворов соляной кислоты.

Поскольку речь идет о механизме разделения белков, прежде всего необходимо обратить внимание на первые работы, которые явились следствием многолетних исследований в области препаративной химии белковых соединений. В этих работах разделение двух белков достигалось подбором таких условий, при которых один белок полностью адсорбируется, тогда как другой в тех же условиях остается растворенным и перемещается вместе с фронтом системы растворителей. Из соображений, которые были приведены выше (стр. 118), нельзя, однако, при хроматографировании на бумаге идентифицировать белки на основе значений  $R_f$ , равных 0 или 1. Поэтому в последующих работах были выбраны такие условия, чтобы белки

находились между приведенными крайними значениями  $R_f$ , что в то же время позволяет проводить разделение смеси, содержащей более чем два белка. Перед обсуждением механизма такого разделения нужно сначала остановиться на интересной работе Рейда, который нашел, что при хроматографировании в растворах солей, например сульфата аммония, концентрация соли изменяется от линии старта к фронту. Подобное явление, однако, имеет место и при применении водных растворов спир-



Р и с. 193. Влияние этанола и воды при использовании в качестве подвижного растворителя 50%-ного водного раствора этанола (Мацек).

Количество воды (○) и этанола (●) в бумаге (г/г) в зависимости от удаленности отдельных полосок (в см) от поверхности растворителя, находящегося в лодочке. — камера насыщена водой; — — — камера насыщена 50%-ным этанолом; — — — — камера насыщена этанолом.

тов или ацетона, когда тоже приходят к такому положению, что градиент концентрации растворителя направлен вдоль полоски бумаги (Мацек). При хроматографировании методом фронтального анализа происходит отделение воды от подвижной фазы. Количество отделившейся воды зависит от расстояния от уровня растворителя, а также от насыщения атмосферы камеры, состав которой соответствующим образом приспособлен к приросту или убыли некоторых компонентов растворяющей системы. В качестве примера можно привести изменение в содержании этанола и воды при использовании в качестве растворителя 50%-ного водного раствора этанола (рис. 193). Из данных, приведенных на рисунке, следует, что количество этанола полностью поддерживается на постоянном уровне, тогда как количество воды постепенно падает от линии старта к фронту.

Изучая механизм разделения белков, Боман, а затем и другие авторы нашли, что при хроматографировании с использованием водного раствора этанола или при применении буферных растворов альбумин захватывается на бумаге каким-то другим невидимым фронтом. Когда Боман нанес белок

на линию старта, находящуюся под углом к направлению движения растворителя, то против ожидания белок продвигался в одной плоскости (см. рис. 24). Из проведенных нами опытов следует, что это явление обусловлено изменением продольного градиента состава растворителя (Мацек). Механизм разделения белков на бумаге, по-видимому, следующий: сначала происходит накопление адсорбированного белка на линии старта (поскольку фронт подвижной фазы имеет довольно высокую концентрацию органического растворителя, что способствует адсорбции белков), но как только фронт системы продвинется настолько, что в месте адсорбированного пятна концентрация органического растворителя станет ниже, чем критическая концентрация для адсорбции, то происходит десорбция белка. Следовательно, белок передвигается в пределах концентрации растворителя, которая способствует его адсорбции, и концентрации растворителя, которая способствует его десорбции. Поскольку градиент состава растворителя достаточно велик, могут возникать круглые пятна, как и при распределительном механизме, и не будут возникать удлиненные пятна адсорбционного типа. С этим вопросом связано также улучшение вида пятен за счет добавления к системе небольшого количества хлористого натрия: хлористый натрий в небольшом количестве повышает растворимость анализируемых белков и тем самым обеспечивает более полную десорбцию (рис. 194).

Тизелиус [2] позже назвал этот способ разделения принципом «все или ничего» (см. также стр. 60). Однако такая хроматография не дает возможности выражать подвижность белков с помощью величин  $R_f$ , так как движение пятен является функцией как состава системы растворителей и атмосферы камеры, так и расстояния линии старта и линии фронта подвижного растворителя от уровня растворителя, применяемого для хроматографирования. Значения  $R_f$  могут служить только как указатель относительной скорости продвижения белков.

Многие вопросы, касающиеся главным образом разделения белков крови, остаются, однако, до сих пор неясными и являются предметом целого ряда дискуссий (Хэлл и Вевалка; Франклин и сотрудники [2] и др.) Высказано даже мнение, что хроматограммы этих соединений являются только артефактами (Хэлл и Вевалка). Понятно, что следует четко представлять себе недостатки и опасности метода (особенно двумерной хроматографии белков крови), из которых следует упомянуть хотя бы о вероятности частичной денатурации белков на стадии после окончания первого пропускания растворителя, о влиянии на растворимость одного белка присутствия других белков, о влиянии белка на нелинейное течение (Хэлл и Вевалка) и т. п. С другой стороны, нельзя пренебрегать теми фактами, что с помощью этих методов во многих случаях были получены ценные результаты при лечебной диагностике, при производстве плазмы и т. п. Следует считать, что по сравнению с хроматографированием на бумаге анализ белков крови методом электрофореза на бумаге дает более точные сведения.

## Ферменты

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для обнаружения ферментов в биологическом материале чаще всего применяют экстракцию буферным раствором с соответствующим рН или экстракцию водой. После центрифугирования следует обычно по крайней

мере грубая очистка экстракта диализом против воды. В полученном растворе белковых веществ проводят их высаливание солью соответствующей концентрации или этанолом (Кабиб; Гиллеспи и сотрудники; Гири и сотрудники [2]). В некоторых случаях, однако, такая очистка не является необходимой и диализат достаточно лишь лиофилизировать. Все приведенные операции нужно проводить при низкой температуре.

## ОБНАРУЖЕНИЕ

Обычное проявление ферментов, как соединений белкового характера, окрашиванием различными красителями (см. стр. 503) проводят главным образом для того, чтобы знать, присутствуют ли в экстракте белки. Как установили Франклин и Квостел [1], ферменты в процессе хроматографирования сохраняют биологическую активность, которую можно использовать для их обнаружения и количественного анализа. Обнаружение проводят сначала таким образом: хроматограмму после окончания разделения помещают на тонкий слой агарового геля с соответствующим субстратом; по истечении определенного времени инкубации хроматограмму или агар опрыскивают реактивом, реагирующим с соединением, выделившимся из субстрата (Гири и Прасад [1]). Однако в настоящее время большинство авторов применяют непосредственное опрыскивание хроматограммы раствором субстрата и инкубацию бумаги во влажной камере. Некоторые авторы элюируют ферменты из бумаги и определяют их в элюате. Обнаружение лучше всего проводить в течение 30 мин после окончания хроматографирования, так как по истечении этого времени происходит быстрая потеря активности. Если возникает необходимость хранить хроматограмму перед проявлением в течение длительного времени, то необходимо поддерживать температуру  $-20^{\circ}$  (Джермин).

Для определения ферментов, главным образом после их элюирования из бумаги, можно применять обычные в ферментологии методы. Здесь мы упомянем только о некоторых методах, применяемых при хроматографировании на бумаге, и приведем подробное описание нескольких различных способов.

### Эстеразы

**Липаза.** Хроматограмму опрыскивают раствором *n*-нитрофенилстеарата по Валленфельсу и фон Пехману (Д 126). После инкубации присутствие липазы проявляется в образовании желтого пятна.

**Пектинэстераза.** Рейд открывает этот фермент наложением хроматограммы на поверхность агара, содержащего пектин и метиловый красный. Присутствие пектинэстеразы проявляется в образовании красного пятна на желтом фоне.

### Гликозидазы

**Амилаза.** Хроматограмму опрыскивают раствором крахмала, а после определенного периода инкубации — раствором йода (Д 127). Амилазы открывают в виде белого пятна на синем фоне (Валленфельс и фон Пехман).

**Инвертаза.** Кабиб рекомендует разрезать хроматограмму на узкие полоски и инкубировать последние с раствором сахарозы. После соответствующей экспозиции реакцию необходимо задержать добавкой

реактива Шомодьи, после чего в растворе можно определить восстанавливающий сахар. Непосредственно на бумаге определение можно провести путем опрыскивания хроматограммы раствором сахарозы и после инкубации проявить, например, выделившуюся глюкозу *n*-анизидином (Джермин).

***α-Гликозидаза.*** Нарезанную на полоски хроматограмму инкубируют с мальтозой или *α*-метилгликозидом. Выделившуюся глюкозу можно определить, например, реактивом Барфо (Кабиб).

***β-Гликозидаза.*** Гиллеспи и сотрудники определяют этот фермент опрыскиванием *β*-(*n*-нитрофенил)-гликозидом, который после гидролиза дает два четко выраженных пятна.

***Салициназа.*** Джермин определяет салициназу опрыскиванием раствором салицина и после инкубации обрабатывает хроматограмму *n*-анизидином.

***Полигалактуроназа.*** Хроматограмму помещают (по Рейду) на поверхность агара, содержащего пектат натрия; после инкубации поверхность агара опрыскивают разбавленной кислотой. При этом в местах ферментативной активности возникают отчетливые пятна на опалесцирующем фоне.

## Фосфатазы

Гири и сотрудники открывают кислую фосфатазу на поверхности агара, содержащего натриевую соль фосфорнокислого фенолфталеина (Д 128); после опрыскивания раствором едкого натра возникает красное пятно, указывающее на присутствие этого фермента.

## Протеазы

Трипсин и другие протеазы, согласно Валленфельсу и фон Пехману, можно обнаружить наложением хроматограммы на желатиновый слой непроявленной киноплёнки (Д 129). В месте, где находится фермент, возникает прозрачное пятно в непрозрачном желатиновом слое. Если увлажнить бумагу и отделить ее от пленки, то непосредственно на хроматограмме останется серый оттиск пятна (Мацек). Симонарт и Чау идентифицируют пепсин и реннин опрыскиванием хроматограммы раствором сухого молока и после инкубации проявляют хроматограмму раствором генцианового фиолетового с йодом (Д 130). Фермент проявляется в виде фиолетового пятна на розоватом фоне.

## Другие ферменты

***Уреаза.*** Определение уреазы Франклином и Квостелом относится к первым хроматографическим анализам ферментов на бумаге. Полоски бумаги после разрезания хроматограммы инкубировали с мочевиной. Количество выделявшейся  $\text{CO}_2$  определяли манометрически (Д 131).

***Фосфоорилаза.*** Гири и сотрудники обнаруживают фосфоорилазу на поверхности агара, содержащего глюкозо-1-фосфат, и после инкубации обрабатывают агар раствором йода.

***Каталаза.*** После опрыскивания хроматограммы раствором перекиси водорода и инкубации каталазу обнаруживают раствором хлорного железа и феррицианидом калия. На синем фоне возникает желтое пятно (Джермин).

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

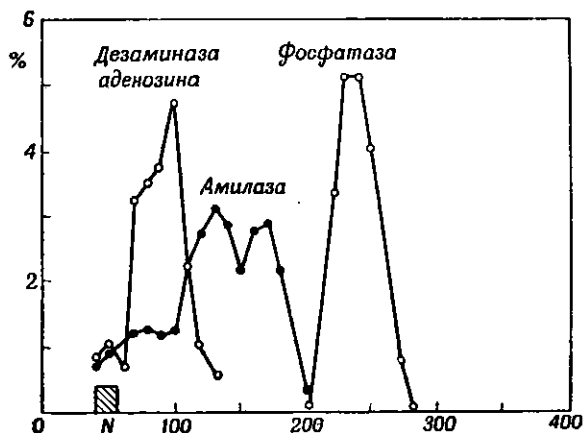
Для хроматографирования ферментов чаще всего применяют водные растворы различных солей, водные растворы этанола или ацетона и, наконец, смеси обоих типов растворителей. Согласно обстоятельной работе Джермина, качество хроматограммы зависит от выбора и концентрации буферного раствора или органического растворителя, а также от pH раствора. Джермин считает, что нецелесообразно выдерживать бумагу с нанесенным ферментом в камере перед собственно хроматографированием, так как может произойти инактивирование фермента.

Таблица 88а

Фактор	Влияние а)			
	скорость продвижения	четкость формы пятен	инактивация фермента	удлиненный вид пятен
Концентрация на единицу площади . . . . .	0	0	0	++
Характер ионов буфера . . . . .	Слабое	+	+	+
Концентрация ионов буфера . . . . .	0	++	0	0
Характер органического растворителя . . . . .	Слабое	+	++	+
Концентрация органического растворителя . . . . .	++	+	+	Слабое
pH . . . . .	++	0	+	0

а) Отсутствие влияния обозначено 0.

Влияние указанных факторов на хроматографическое поведение ферментов Джермин показал на примере *Aspergillus oryzae* (табл. 88а).



Р и с. 196. Хроматографирование ферментов с помощью метода хроматопайл с градиентной элюцией (Митчелл и сотрудники).

Ось абсцисс: порядковый номер бумажного диска. Анализируемая смесь помещена на заштрихованный участок.

Ось ординат: активность (в процентах), приходящаяся на пять дисков. Разделение было достигнуто градиентом концентрации сульфата аммония при pH 6,5. Концентрация соли, выраженная в процентах насыщения при 10°, по окончании опытов составляла: диск № 30—14%, № 120—20%, № 202—40%, № 208—50%.

Для всей этой группы нельзя рекомендовать какую-либо определенную систему растворителей, поскольку каждый фермент требует до некоторой степени различных условий хроматографирования. Чаще всего применяют 30—60%-ный раствор этанола или ацетона, 0,33 *M* раствор хлористого натрия или буферные растворы с рН 5,5—7,0. При проявлении спиртовыми системами необходимо, однако, помнить о большом влиянии насыщения атмосферы камеры на подвижность ферментов (рис. 195).

Из других методик необходимо отметить очень хороший способ разделения аденозиндезаминазы, амилазы и фосфатазы на столбиках из кружков хроматографической бумаги (хроматопайл) (Митчелл и сотрудники). В качестве растворителя был использован 60%-ный раствор сернокислого натрия с непрерывным падением градиента концентрации за счет добавления воды (рис. 196).

## Другие белки

### ОБНАРУЖЕНИЕ

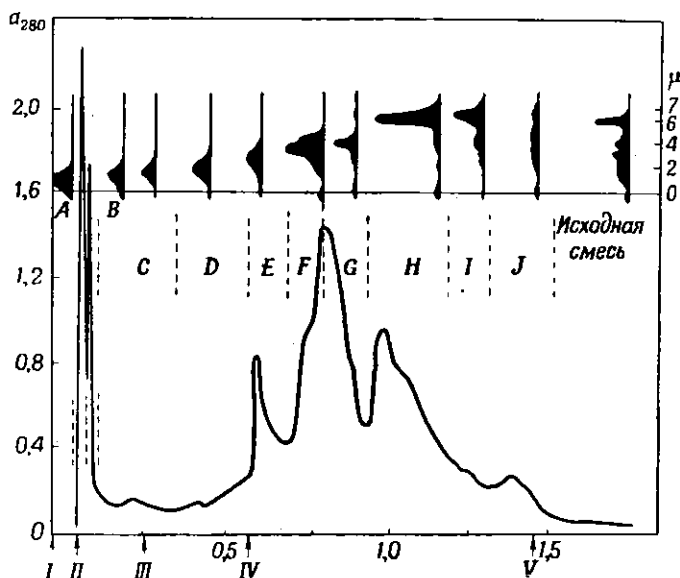
Реакции проявления белковых соединений в основном одинаковы, поэтому мы приведем их все вместе. Наиболее широко распространенным является определение белков, основанное на родстве к ним кислых красителей (последние не должны обладать родством к целлюлозе). Чаще всего применяют бромфеноловый синий (*Д 132*), который Кремер и Тизелиус, а также Деррум использовали для электрофореза на бумаге. Из других красителей Таубер и Пти применяют смесь эозина с метилоранжем (*Д 133*), а также и иные красители, обычные в практике электрофореза на бумаге, например азокармин В, кислую чернь 10 В (Amidoschwarz 10 В) и т. д. Райдон и Смит применили очень удобный способ проявления белков йодистым калием и крахмалом после хлорирования (*Д 7а*, см. также стр. 413). Часто применяют метод Франклина и Квостела, которые добавляли к раствору белков перед хроматографическим разделением гемин и проявляли белковогеминный комплекс после окончания хроматографирования бензидиновым реактивом (*Д 134*). Некоторые белки, не образующие такого комплекса, несмотря на это, обнаруживаются на хроматограмме через некоторое время в виде светлых пятен на синем фоне.

### ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

#### Белки плазмы крови

Для разделения белков плазмы крови было описано много приемов, из которых, однако, большинство дает благоприятные результаты только при хроматографировании изолированных фракций или приготовленных из них искусственных смесей, тогда как картина плазмы, непосредственно нанесенной на бумагу, не бывает достаточно ясной. Одномерное хроматографирование, нисходящее или восходящее, дает в большинстве случаев неблагоприятные результаты. Более благоприятные результаты были достигнуты только Циммерманом и Клудасом при круговом хроматографировании в системе вода, насыщенная *n*-бутанолом, — додекансульфат натрия, насыщенный водой, — *n*-бутанол (20 : 10 : 0,8) с рН 6,5—6,8 (рис. 197). Франклин и Квостел [1, 2] описали метод двумерного хроматографирова-

ния, когда геминный комплекс хроматографировали в первом направлении, используя в качестве растворителя раствор сахара (например, 0,1 М раствор сахарозы), а для хроматографирования во втором направлении применяли растворы солей органических кислот (например, 0,1 М раствор натриевокалиевого тартрата). К нанесенной плазме добавляли избыток гемина и 4% поверхностноактивных соединений, например спан или твин. Двумерное хроматографирование необходимо, так как избыточный



Р и с. 199. Пример разделения сыворотки крови лошади на ДЕАЕ-целлюлозе (Собер и сотрудники).

880 мг диализованной и лиофилизованной сыворотки в 6,1 мл раствора подавали в колонку с 24 г ДЕАЕ-целлюлозы. Фракции отбирали через каждые 6—7 мл (на ось ординат приведены значения в литрах). Для разделения применяли буферные растворы: I — 0,005 М фосфат натрия, pH 7; II — 0,02 М фосфат натрия, pH 6; III — 0,05 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; IV — 0,1 М  $\text{NaCl}$  — 0,05 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; V — 0,5 М  $\text{NaCl}$  — 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Отдельные фракции были исследованы методом электрофореза ( $\mu$  — подвижность).

гемин передвигается только в первом направлении, поэтому его избыток не оказывает неблагоприятного влияния. Типичные примеры двумерных хроматограмм приведены на рис. 198.

В большинстве применяемых в клинической практике методов хроматографии на бумаге белков плазмы отдельные белковые фракции не определяют; по общему виду на бумаге можно судить о плазме здорового или больного человека.

Наиболее обстоятельным методом разделения белков плазмы является, однако, метод Собера и сотрудников, проводивших хроматографирование на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (II 17). Пример разделения белков этим методом, имеющим значение главным образом для препаративных целей, приведен на рис. 199.

## Инсулин

Хроматографирование инсулина на бумаге за последнее время вызвало повышенный интерес, поскольку этот метод позволяет заменить продолжительные и дорогие биологические способы определения. Преимущество

инсулина перед остальными белками состоит в его относительно небольшой молекуле, что позволяет применять обычные двухфазные системы, как и при распределительной хроматографии. Все описанные до сих пор методы основаны на работе Робинсона и Фера, которые отделили инсулин ( $R_f$  0,43) от протамина, применив смесь *n*-бутанола с уксусной кислотой и водой (3 : 1 : 4). Протамин оставался при этом на линии старта. Падри и сотрудники применили эти методы в круговой хроматографии для определения глобин- $Zn$ -инсулина и для определения чистоты инсулина (рис. 200).

Большое значение имеет количественный анализ инсулина. Так, например, согласно Робинсону и Феру, протамин анализируют ретенционным методом, а инсулин после элюирования его комплексов с бромкрезоловым зеленым — колориметрическим методом. Результаты не отличаются больше чем на  $\pm 0,5$  единицы. Более точными, однако, являются полярографические методы Вольдана, где в отдельных случаях точность определения составляет  $\pm 0,2$  единицы.

### Антигены

Согласно Сполдингу и Меткафу, метод хроматографии на бумаге можно применять для определения антигенов. Окрашенный антиген наносят на линию старта и обрабатывают антителом. В том случае, когда происходит реакция, антиген с антителом остаются на линии старта. Подобный принцип был использован в различных работах в области капиллярного анализа. Условие успешного проведения анализа заключается в предотвращении денатурации белка на линии старта после нанесения и сушки. Сполдинг и Меткаф рекомендуют для этой цели наносить белки в присутствии сахарозы.

### Прочие белки

Из большого числа белков, которые были разделены хроматографией на бумаге, мы приведем только несколько интересных примеров. Метод хроматографирования этих соединений совершенно аналогичен методу разделения белков плазмы крови. Несколько работ было посвящено разделению гемоглобина. Одной из первых была работа Сансоне и Кузмано, которые путем хроматографирования в 90%-ном растворе пиридина разделили гемоглобин А и F. Броуде и сотрудники разделили в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) препарат АКГГ на три компонента, которые количественно определяли едким кали после элюирования комплекса с бромфеноловым синим. Далее несколько работ посвящено хроматографированию пчелиных и змеиных ядов и растительных вирусов; хроматография служит здесь главным образом для грубого разделения с препаративной целью.

Симон и сотрудники описали разделение эритроцитов и тромбоцитов путем хроматографирования на бумаге в разбавленных растворах соляной кислоты. Заслуживает упоминания и метод приготовления культур бактерий, содержащих бактерии одинаковой величины, для чего применяют хроматографию на бумаге (Марнияма и Ямагита). Суспензию бактерий, например *Escherichia coli*, наносят на бумагу и «хроматографируют» в соответствующей среде. В первых частях фильтрата находятся бактерии наименьшей величины, а по направлению к линии старта величина бактерий постепенно увеличивается.

## ЛИТЕРАТУРА

- Boman H. G., *Nature*, **170**, 703 (1952).  
 Брауде Л. М., Сахацкая Т. С., Серебренникова Н. С., *Биохимия*, **19**, 461 (1954).  
 Cabib E., *Biochim. biophys. Acta*, **8**, 607 (1952).  
 Cochran G. W., *Phytopathology*, **37**, 850 (1947).  
 Cremer H. D., Tiselius A., *Biochem. Z.*, **320**, 273 (1950).  
 Durrum E. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2943 (1950).  
 Franklin A. E., Quastel J. H., *Science*, **110**, 447 (1949). [1]  
 Franklin A. E., Quastel J. H., Van Straten S. F., *Nature*, **168**, 686 (1951). [2]  
 Gillespie J. M., Jermyn M. A., Woods E. F., *Nature*, **169**, 487 (1952).  
 Giri K. V., Prasad A. L. N., *Nature*, **167**, 859 (1951). [1]  
 Giri K. V., Prasad A. L. N., Devi S. G., Ram J. S., *Biochem. J.*, **51**, 123 (1952). [2]  
 Hall D. A., Wewalka F., *Nature*, **168**, 685 (1951).  
 Jermyn M. A., *Austral. J. biol. Sci.*, **6**, 77 (1953).  
 Kalz F., Telner P., Quastel J. H., Van Straten S. F., *Arch. Dermatol. Syphil.*, **68**, 167 (1953).  
 Macek K., *Chem. Listy*, **48**, 1181 (1954).  
 Marnyama Y., Yamagita T., *Bacteriol. Proc.*, **1955**, 37, ref. *Angew. Chem.*, **67**, 632 (1955).  
 Mitchell K. H., Gordon M., Haskins F. A., *J. biol. Chem.*, **180**, 1071 (1949).  
 Pádr Z., Urbánková J., Jehlička S., *Českoslov. Farmacie*, **4**, 311 (1955).  
 Peterson E. A., Sober H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 751 (1956).  
 Reid W. W., *Nature*, **166**, 569 (1955).  
 Robinson F. A., Fehr K. L. A., *Biochem. J.*, **51**, 298 (1952).  
 Rydon H. N., Smith P. W. G., *Nature*, **169**, 922 (1952).  
 Sansone G., Cusmano F., *Boll. Soc. Ital. biol. Sper.*, **26**, 1343, 1680 (1950); **C. A.**, **45**, 8628 (1951).  
 Simon K., *Mediz. Monatschr.*, **8**, 107 (1954).  
 Simonart P., Chow K. Y., *Nederl. Melk Zuiveltijdschr.*, **6**, 206 (1952).  
 Sober H. A., Gutter F. J., Wyckoff M. M., Peterson E. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 756 (1956).  
 Spalding D. H., Metcalf T. G., *J. Bacteriol.*, **68**, 160 (1954).  
 Tauber H., Petit E. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2865 (1952).  
 Tiselius A., *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, **26B**, No. 1 (1948). [1]  
 Tiselius A., *Angew. Chem.*, **67**, 245 (1955). [2]  
 Voldan M., *Českoslov. Farmacie*, **4**, 407 (1955).  
 Wallenfels K., von Pechmann E., *Angew. Chem.*, **63**, 44 (1951).  
 Zimmermann G., Kludas K. H., *Chem. Techn.*, **5**, 203 (1953).

# *ПУРИНЫ, ПИРИМИДИНЫ, АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ*

---

## *3. М а д р*

Методы хроматографирования на бумаге отдельных пуринов, пиримидинов, нуклеозидов и нуклеотидов явились новой предпосылкой для изучения нуклеиновых кислот. Вплоть до настоящего времени выделять и идентифицировать пуриновые и пиримидиновые основания, нуклеозиды и нуклеотиды в смесях гидролизатов нуклеиновых кислот можно было только химическими методами; для этого требовалось значительное количество вещества, часто 100 г и более. Химические методы требовали большой затраты времени, были ограниченными в применении и далеко не количественными. Хроматография на бумаге дала возможность разделять и определять незначительные количества продуктов расщепления нуклеиновых кислот. Лишь хроматографические методы позволяют анализировать нуклеиновые кислоты бактерий, плесеней и опухолей, поскольку в этих случаях доступные количества нуклеиновых кислот весьма невелики. С хроматографией на бумаге успешно конкурирует лишь хроматография на ионообменниках, которая применяется главным образом в микропрепаративных целях. Последний метод часто сочетают с анализом получаемых фракций методом хроматографии на бумаге. Кроме того, хроматография на бумаге в последнее время служит дополнением к методу электрофореза на бумаге.

## **ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ**

### **ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

Для выделения нуклеиновых кислот можно применять несколько методов (Шнайдер; Огур и Розен; Дейли и сотрудники). Огур и Розен разделяют уже при экстракции рибонуклеиновую (РНК) и дезоксирибонуклеиновую (ДНК) кислоты (*Л 114*). Для разделения нуклеиновых кислот в последнее время с успехом начинают применять ионообменники на основе целлю-

лозы (см. также стр. 212). В некоторых случаях нет необходимости проводить выделение нуклеиновых кислот; можно гидролизовать непосредственно исходный материал.

### РАСЩЕПЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Собственно хроматографическому анализу предшествует расщепление нуклеиновых кислот, которое можно проводить химическим или ферментативным путем. Продуктами расщепления являются: а) пуриновые и пиримидиновые основания, б) мононуклеотиды, в) нуклеозиды.

#### Расщепление на пуриновые и пиримидиновые основания

Умеренным кислотным гидролизом нуклеиновые кислоты расщепляются на пуриновые основания. Для расщепления на пиримидиновые основания необходимо применять более жесткие условия. Однако гидролиз путем нагревания до  $100^{\circ}$  в течение 1 час с 1 н. серной кислотой, при котором отщепляется гуанин и аденин, недостаточен для отщепления пиримидиновых оснований. При расщеплении нуклеиновой кислоты нагреванием с 1 н. соляной кислотой при  $100^{\circ}$  в течение 1 час выделяется аденин, гуанин, цитидиловая и уридиловая кислоты, а также незначительное количество цитидина и уридина (Эдстрём [1]). При таком гидролизе приблизительно 5% пиримидиновых нуклеотидов расщепляются на нуклеозиды.

Некоторые авторы применяют хлорную кислоту. Часто ее применяют для прямого гидролиза анализируемого материала без предварительного выделения нуклеиновых кислот. Расщепление хлорной кислотой выгоднее, чем расщепление муравьиной кислотой, поскольку одновременно уничтожается образующийся из сахаров материал, мешающий проведению анализа. Применяют 70—75%-ную хлорную кислоту. Гидролизат разбавляют и нейтрализуют 12 н. едким кали, причем перхлорат выпадает в осадок. Смесь центрифугируют для отделения сахаров и осажденного перхлората калия. Прозрачный раствор наносят непосредственно на бумагу.

Для расщепления нуклеиновых кислот на пурины можно рекомендовать методику *П 115*, а для расщепления на пиримидины — *П 116*.

#### Расщепление на мононуклеотиды

Расщепление на мононуклеотиды проводят в щелочной среде при низкой температуре. Чаргафф и сотрудники [1] расщепили рибонуклеиновую кислоту на мононуклеотиды в щелочной среде с рН 13—14 при  $30^{\circ}$  в течение 12 час. Затем гидролизат подкисляли до рН 5 и разбавляли. Едкое кали, применяемое для гидролиза, можно удалять в виде перхлората калия (Кросби). Смит и Аллен показали, что щелочной гидролиз 1 н. едким натром за 24 час при  $22^{\circ}$  протекает незначительно; наряду с мононуклеотидами можно также обнаружить полинуклеотиды. Для гидролиза лучше всего применять аммиак (Буланже и Монтрей).

Наряду со щелочным гидролизом можно применять кислотный гидролиз (Маркгам и Смит [1].) Однако при этом наряду с нуклеотидами образуется еще небольшое количество оснований. При кислотном гидролизе нельзя проводить сгущение гидролизата, поскольку при повышении концентрации кислоты может произойти расщепление на пуриновые и пиримидиновые основания.

### Расщепление на нуклеозиды

Нуклеиновые кислоты и нуклеотиды в слабощелочной среде расщепляются на нуклеозиды. Химическое расщепление протекает не полностью, поэтому рекомендуют ферментативное расщепление (Элмор). Сначала нуклеиновые кислоты деполимеризуют, а затем расщепляют нуклеотидазами на нуклеозиды (Керр, Литтл). Для расщепления на нуклеозиды применяли также кипячение с гидратом окиси свинца в течение 70 час. Для гидролиза на нуклеозиды с целью последующего хроматографирования на бумаге Уилер и Скиппер применяли 50%-ный водный раствор пиридина. Гидролиз проводили в течение 72 час при температуре 90—95°.

### Прямой гидролиз материала

В некоторых случаях можно проводить прямой гидролиз образца и уже из гидролизата выделять пурины и пиримидины в виде солей серебра или меди (Макдональд; Семпинская; *П 117*). При анализе пуринов в пиве после кислотного гидролиза были выделены в осадок основания в виде солей меди (Лауфер и сотрудники). Иногда проводили лишь частичную экстракцию или гидролиз без экстракции и применяли очистку на ионообменниках (Монтрей и Буланже [1]; *П 118*).

## ОБНАРУЖЕНИЕ

Для обнаружения пятен применяют химические или физические методы. Некоторые химические методы проявления являются общими, другие пригодны только для определенной группы соединений. Наиболее выгодным и в настоящее время наиболее широко применяемым способом является поглощение ультрафиолетового света определенной длины волны. В меньшей степени применяется микробиологическое проявление. Нуклеотиды с меченым  $P^{32}$  определяют на основе их радиоактивности.

## ХИМИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

### Пурины и пиримидины

Для проявления пуриновых и пиримидиновых оснований Чаргафф и сотрудники [2] предложили опрыскивание раствором азотнокислой ртути, а затем промывание азотной кислотой и водой. После этого при действии сульфида аммония возникает черное пятно сульфида ртути (*Д 135*). Аналогичным является способ определения пятен 1%-ным водным раствором азотнокислого серебра по Михлю. Однако более выгодно проявление азотнокислым серебром и бихроматом натрия по Регузэ и Азимову (*Д 136*). В месте, где находятся пуриновые производные, возникают красные пятна, так как комплексные соединения этих веществ с бихроматом серебра в разбавленной азотной кислоте нерастворимы. Более простым способом можно проявлять пурины в виде Hg-комплексов эозином (*Д 137*). Михль, а позже и Вуд проявляли пурины и пиримидины бромфеноловым синим. Для определения аденина был также использован реактив Фолина; аденозин и адениловая кислота с этим реактивом, однако, не взаимодействуют, остальные основания реагируют более слабо (Бесер).

Однако гораздо более чувствительным является определение пуринов на основе их флуоресценции после окисления хлором. Бумагу при 50—100%-ном насыщении водой оставляли в течение 3 мин в атмосфере хлора и после сушки при 80—90° несколько минут выдерживали в атмосфере, насыщенной аммиаком. Ксантиновые производные дают фиолетовое окрашивание, все остальные пурины флуоресцируют зеленым цветом. Другие флуоресцирующие вещества из растительного материала при действии хлора утрачивают флуоресценцию и поэтому не мешают обнаружению. Чувствительность проявления составляет 0,2 мкг (Михль.)

### Нуклеотиды и нуклеозиды

Магазаник и сотрудники проявляли нуклеотиды солями урана. Однако в большинстве случаев химическое проявление нуклеотидов основано на определении сахарного компонента или фосфорной кислоты. Некоторые авторы используют реакции Дие (Д 138) и Фойльгена или кислый фталат анилина (Д 34). Проявлению должен предшествовать гидролиз на бумаге. Нуклеотиды и нуклеозиды с  $\alpha$ -гликольными группами можно определять с помощью перйодата (Бьюкенен и сотрудники, см. также ст. 267).

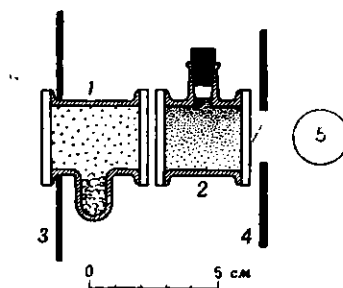
Фосфорную кислоту можно определять по Хейнсу и Ишервуду реакцией с молибденовокислым аммонием в растворе хлорной кислоты (Д 45).

### ОБНАРУЖЕНИЕ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ СВЕТЕ

Для простого и быстрого обнаружения можно применять ультрафиолетовый свет с длиной волны 250—260 мμ. Все пурины, пиримидины, нуклеозиды и нуклеотиды поглощают ультрафиолетовые лучи с такой длиной волны. Этот способ обнаружения особенно удобен тогда, когда проводят дальнейшее количественное спектрофотометрическое определение после элюирования из бумаги. Источником ультрафиолетового света служит вакуумная ртутная резонансная лампа (Холиди и Джонсон) или минералит (Картер). В качестве источника света был также использован монохроматический свет вращающихся кадмиевых электродов из УФ-микроскопа Кёлера с длиной волны 257 или 275 мμ (Эдстрём [1]). Фильтры должны пропускать световые лучи с длиной волны 254 мμ. Были использованы различные фильтры с водным раствором  $\text{CoSO}_4$  и  $\text{NiSO}_4$  и фильтры с хлором (Маркгам и Смит [2, 3]) (рис. 201), а также специальные фильтры, например фильтр Корнинга 9863 (Холиди и Джонсон), коротковолновый фильтр 2537 (Голлер), фильтр UG5 и кварцевые кюветы, наполненные хлором с каплей брома (Виланд и Бауэр). Сравнительно простое устройство предложила Семпинская [2]; в качестве фильтра применяются два кварцевых стакана, вложенных один в другой. Внутренний стакан содержит водный раствор  $\text{CoSO}_4$  и  $\text{NiSO}_4$ , а внешний — хлор, растворенный в  $\text{CCl}_4$ . Можно обойтись без специального фильтра при применении соответствующей фосфоресцирующей пластинки, возбужденной лишь узкой областью облучения (270 мμ; Брумберг, см. рис. 84).

Пятна изучаемых веществ обнаруживают в виде темных мест на флуоресцирующем фоне бумаги. Более контрастные пятна получаются, если под бумагу подложить пластинку, натертую флуоресцирующей эмульсией, применяемой в люминесцентных осветительных лампах. Там, где мы намереваемся проводить определение этим способом, нельзя применять системы с фенолом, коллидином и т. п. или же необходимо проводить их вымывание

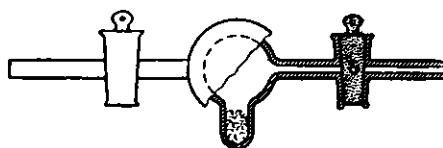
из бумаги хлороформом. Пятна очерчивают карандашом, после вырезания элюируют и элюат анализируют спектрофотометрически. При фотографическом обнаружении можно делать контактный оттиск на обычную фотографическую бумагу, причем в местах, где содержатся изучаемые вещества, выступают светлые пятна на темном фоне (Маркгам и Смит [2, 3], рис. 202); можно также непосредственно фотографировать на пленку (Эдстрём [1], Голлер). Время экспозиции определяется удаленностью и интенсивностью источника света. Освещение для фотографического обнаружения



Р и с. 201. Фильтры для обнаружения азотсодержащих компонентов нуклеиновых кислот методом фотокопирования (Маркгам и Смит).

1 — кювета удаленного источника облучения (толщина слоя 35 мм), заполненная газобразным хлором, высушенным над  $\text{CaCl}_2$ ; 2 — кювета, заполненная раствором 350 г  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и 100 г  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 1 л воды (толщина слоя 30 мм); 3 и 4 — диафрагмы; 5 — лампа.

Вместо специальных кювет можно применять круглодонные колбы из плавленного кварца.



может быть менее интенсивным, чем для флуоресцентного обнаружения, однако оно должно быть избирательно отфильтровано.

Виланд и Бауэр рекомендуют опрыскивание 0,005 %-ным раствором флуоресцеина. После облучения ультрафиолетовым светом с длиной волны 254 мμ вещество проявляется в виде темного пятна на желто-зеленом флуоресцирующем фоне.

## БИОАВТОГРАФИЯ

Фрис применил для аденина и гуанина микробиологическое проявление. Он обрабатывал хроматограмму конидиями соответствующих мутантов плесени *Ophiostoma* и *Neurospora* и помещал ее на агаровые пластинки. За 36 час в месте пятен образовывался мицелий, который содержал аденин и гуанин.

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

### Алифатические спирты

Для пуриновых и пиримидиновых оснований применяют *n*-бутанол, который имеет ряд преимуществ. В этом растворителе четко отделяются друг от друга основания, только гуанин дает небольшое отклонение, но

для него не наблюдается наложения при спектрофотометрии. Вишер и Чаргафф применяли различные системы растворителей, из которых лучше всего зарекомендовали себя для пиримидинов *n*-бутанол — морфолин — диэтиленгликоль — вода (9 : 3 : 2 : 4), а для пуринов *n*-бутанол — диэтиленгликоль — вода (4 : 1 : 1) в атмосфере аммиака. Разделе-

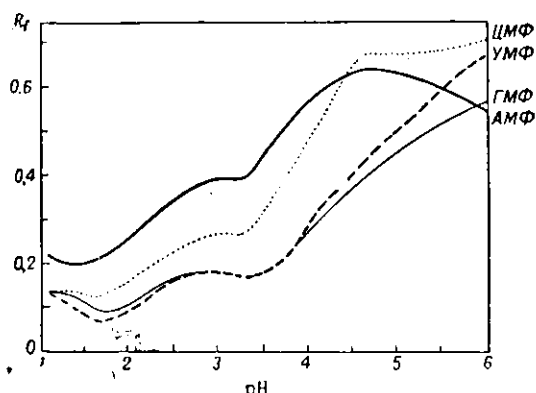


Рис. 203. Влияние pH на величину  $R_f$  рибонуклеотидов (Магазаник и сотрудники).

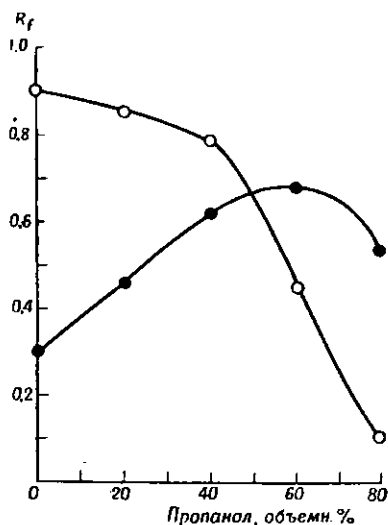


Рис. 204. Влияние концентрации воды в пропаноле на величину  $R_f$  аденина и адениловой кислоты (Маркгам и Смит).

—●— аденин; —○— адениловая кислота.

ние пиримидинов лучше всего осуществляется в *n*-бутаноле, насыщенном водой (Хочкис).

Различные системы, основой которых является *n*-бутанол, использовали также Маркгам и Смит (табл. 90). Для разделения цитидина и

Таблица 89

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НУКЛЕОТИДОВ

Нуклеотид	трет-Бу- танол 1 н. $H_2SO_4$ 8 2	Изопропанол 1 н. $HCl$ 8 2	Фенол трет-Бу- танол $HCOOH$ Вода 42 3 5 50	трет-Бу- танол $HCl$ Вода 70 13.2 16.8
	Буланже и Монтей			Маркгам и Смит [1]
Адениловая кислота (3 АМФ)	0,47	0,62	0,70	0,50
Гуаниловая кислота	0,41	0,55	0,46	0,46
Цитидиловая кислота	0,81	0,66	0,57	0,56
Уридиловая кислота	0,92	0,82	0,35	0,80
Адениловая кислота, мышечная (адено- зинмонофосфат) (5 АМФ)	—	—	—	0,45
Фосфорная кислота	0,92	0,90	0,22	0,90

уридина рекомендуют пользоваться смесью *трет*-бутанол — пиридин — вода (60 : 15 : 25 или 50 : 15 : 35) после предварительного промывания бумаги кислотой. Эту смесь считают наиболее подходящей для разделения нуклеозидов (Паркер). Для разделения изомеров адениловой кислоты «а», «b», аденозинмонофосфата и гуаниловых кислот «а» и «b» можно рекомендовать систему Маркгама и Смита — насыщенный водный раствор сульфата аммония — изопропанол — вода (79 : 2 : 19). В этой системе адениловая кислота «а» имеет  $R_f$  0,16, адениловая кислота «b» — 0,25; аденозин-5-монофосфат — 0,30; гуаниловая кислота «а» — 0,40, гуаниловая кислота «b» — 0,50, цитидиловая и уридиловая кислоты — 0,73.

### Кислые системы

Для разделения нуклеотидов можно рекомендовать как изомасляную кислоту, насыщенную водой при 15° в атмосфере аммиака, так и изомасляную кислоту, обработанную аммиаком при pH 3,6—3,7 (Магазаник и сотрудники). Монтрей и Буланже [1] разделяют рибонуклеотиды в смесях, содержащих фенол, изопропанол и муравьиную, уксусную, серную или соляную кислоты (табл. 89). Особое внимание эти авторы обращали на точное приготовление смеси.

### Двухфазные системы Картера

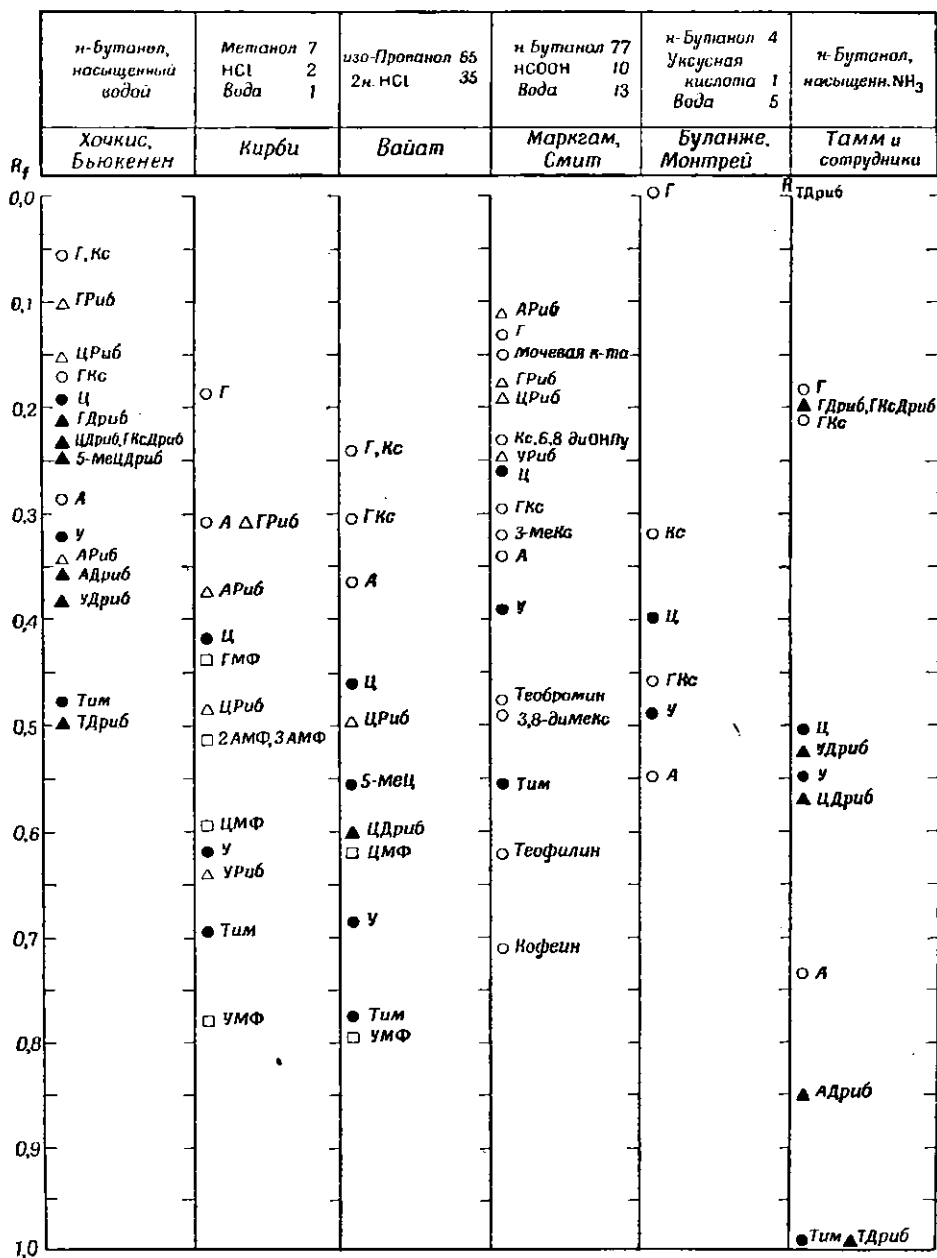
Интересные методы разделения применили Картер и Кон. Они анализировали сложные смеси производных пурина и пиримидина в двухфазной системе, когда оба слоя растворителя остаются в лодочке хроматографической камеры. Для разделения использовали бутанол в смеси с 10%-ным водным раствором мочевины, а также смеси изоамилового спирта с 5%-ным водным раствором первичного фосфата калия или с 5%-ным вторичным фосфатом натрия. В дальнейшем они применяли изоамиловый спирт в смеси с 5%-ным раствором лимонной кислоты, обработанной аммиаком до соответствующего значения pH. Изоамиловый спирт образует два слоя; бумагу погружают в оба слоя смеси. Этим способом можно разделять не только пуриновые и пиримидиновые основания, но также нуклеозиды и нуклеотиды. Снелман и Желотт применяли вместо изоамилового спирта 0,5%-ный раствор лаурилами́на в *n*-амиловом спирте.

Применение систем двух подвижных фаз, действующих одновременно, изучили Аллуф и Машбеф. Они пришли к другому выводу, нежели Картер, который считал, что передвигаются обе фазы. Аллуф и Машбеф изучили вопрос о том, какое влияние оказывают различные соотношения обеих фаз, меняли высоту верхнего слоя, изучали влияние предварительного пропитывания изоамиловым спиртом и дали объяснение этим явлениям.

### Системы для двумерного хроматографирования

При помощи двумерной хроматографии во многих случаях можно отделить вещества, весьма близкие друг другу по структуре (например, разделение различных метилированных пуринов).

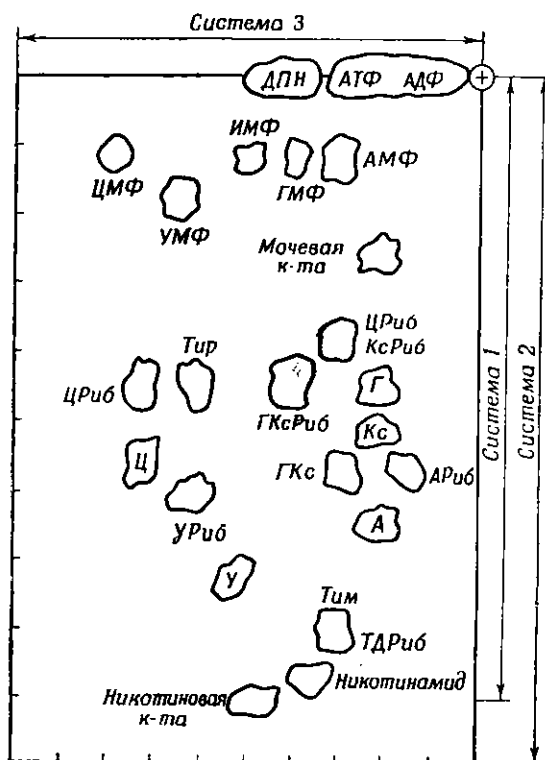
Согласно Картеру [3], можно разделять все основания, нуклеозиды и нуклеотиды при длине хроматограммы от 24 до 30 см в следующих

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ

двухфазных системах: I — *n*-бутанол с 10%-ным раствором мочевины и II — 5%-ный раствор вторичного фосфата натрия с изоамиловым спиртом.

Метилированные производные гуанина и ксантина в моче можно раз-





Р и с. 205. Разделение продуктов расщепления нуклеиновых кислот методом двумерной хроматографии (Дораф и Ситон).

Системы: 1 — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1); 2 — ацетон — *n*-бутанол — вода (8 : 1 : 1); 3 — насыщенный водный раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — изопропанол — вода (79 : 2 : 19). Обнаружение: минералыт V 41.

Для разделения дезоксирибозидов лучше всего использовать следующие системы: I — *n*-бутанол — 0,1 М  $\text{NH}_4\text{OH}$ , II — 0,01 М фосфатный буфер с pH 7. Значения  $R_f$  в этих системах на бумаге Шлейхер и Шульц 597 приведены в табл. 91 (Брауэрман и Чаргафф).

Таблица 91

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДОВ <sup>а)</sup>  
(Брауэрман и Чаргафф)

Дезоксинуклеозид	<i>n</i> -Бутанол, насыщенный 0,1 М $\text{NH}_3$	0,01 М фосфатный буфер, pH 7
	$R_{\text{тимидин}}$	$R_f$
Дезоксигуанозин . . . . .	0,33	0,67
Дезоксиинозин . . . . .	0,33	0,81
Дезоксицитидин . . . . .	0,49	0,85
Дезоксиадепозин . . . . .	0,83	0,42
Тимидин . . . . .	1,00	0,85

<sup>а)</sup> Для систем растворителей, пригодных для двумерного хроматографирования.

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Количественный анализ можно проводить после элюирования пятен из бумаги спектрофотометрически по поглощению ультрафиолетового света с подходящей длиной волны (табл. 92). Чаргафф и Вишер рекомендуют

Таблица 92

МОЛЯРНЫЕ КОЭФФИЦИЕНТЫ ЭКСТИНКЦИИ ДЛЯ ПУРИНОВ,  
ПИРИМИДИНОВ И РОДСТВЕННЫХ ИМ СОЕДИНЕНИЙ  
(Дораф и Ситон)

Соединение	$\lambda_{\text{макс.}}$	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$ (0.1 M HCl)	Соединение	$\lambda_{\text{макс.}}$	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$ (0.1 M HCl)
Аденин . . . . .	2600	13,6	Уридин . . . . .	2620	9,93
Гуанин . . . . .	2500	10,0	Ксантозин . . . .	2620	8,90
Гипоксантин . . .	2500	9,03	Адениловая кис-	2550	15,1
Мочевая кислота .	2850	11,7	лота . . . . .		
Ксантин . . . . .	2650	7,93	Гуаниловая кис-	2550	10,7
Цитозин . . . . .	2750	10,1	лота . . . . .		
Тимин . . . . .	2650	7,67	Инозиновая кис-	2470	9,89
Урацил . . . . .	2600	8,06	лота . . . . .		
Аденозин . . . . .	2600	14,2	Уридиловая кис-	2620	9,89
Цитидин . . . . .	2800	13,0	лота . . . . .		
Гуанозин . . . . .	2550	12,2	АТФ и АДФ . . . .	2550	
Инозин . . . . .	2470	11,8	ДПН . . . . .	2600	
Тимидин . . . . .	2650	10,1			

для случая пуринов элюирование 0,1 — 1 н. раствором соляной кислоты, а для пиримидинов — элюирование водой. Картер [2] элюировал урацил, тимин и цитозин 0,1 н. раствором соляной кислоты, элюирование гуанина и аденина проводил 1 н. раствором соляной кислоты, элюирование аденозина, гуанозина, уридина, цитидина, адениловой, гуаниловой, цитидиловой и уридиловой кислот 1 н. раствором аммиака. Пятна элюировались в течение 24 час в 5 мл растворителя.

Метод анализа для особенно малых количеств нуклеиновой кислоты разработал Эдстрём [2]. Для анализа достаточно от 1,5 до 5  $\mu\text{г}$  гидролизата, который наносят на полоску шириной 0,5—1 мм и после хроматографирования определяют контактным фотокопированием, измеряя степень почернения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучению нуклеиновых кислот было уделено большое внимание благодаря их биологическому значению. С помощью хроматографии на бумаге за последние годы были расширены знания о составе нуклеиновых кислот микроорганизмов. Были также изучены азотсодержащие компоненты как пентозных, так и дезокси-пентозных нуклеиновых кислот. Удалось также идентифицировать 5-метилцитозин, который был обнаружен в дезокси-пентозных нуклеиновых кислотах растительного и животного происхождения, однако не был найден в дезокси-пентозонуклеиновых кислотах бактериаль-

ного и вирусного происхождения. В бактериофаге был открыт оксиметилцитозин.

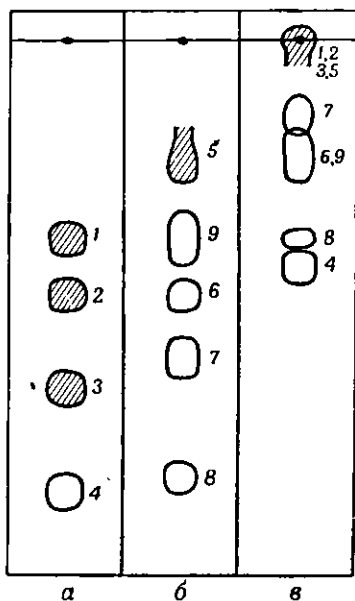
Методы хроматографии на бумаге были применены также для контроля химических синтезов пуринов, пиримидинов, нуклеозидов и нуклеотидов, а также при изучении предшественников пуринов, метаболизма пуринов и пиримидинов, для контроля полноты ферментативного расщепления пуриновых нуклеозидов, при разделении изомеров нуклеотидов.

Метод хроматографии на бумаге позволил получить новые данные по химии нуклеиновых кислот, и с его помощью было изучено строение последних. В этом смысле данный метод стал таким же ценным, как и электрофорез на бумаге и хроматография на ионообменных смолах. Полученные за последнее время данные свидетельствуют не в пользу «тетрануклеотидной» гипотезы. Из нуклеиновой кислоты ферментативным расщеплением были получены полинуклеотиды (от ди- до тетра-), которые после хроматографирования давали характерные пятна на бумаге и после элюирования могли быть подвергнуты более глубокому расщеплению вплоть до мононуклеотидов. Применение метода фракционирования в сочетании с методами хроматографии и электрофореза на бумаге позволило с помощью специфических ферментов объяснить, каким образом связаны в полинуклеотидах компоненты, составляющие их основу.

## Аденозинполифосфорные кислоты

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА

При приготовлении образца применяют экстракцию ткани животного организма трихлоруксусной кислотой при низкой температуре. Раствор нейтрализуют и наносят на бумагу (Эглстон и Хемс); в другом случае трихлоруксусную кислоту предварительно удаляют, извлекая вытяжку эфиром до тех пор, пока pH экстракта не повысится до 6,0. Водный раствор лиофилизируют. Избыток растворяют в 0,1 мл дистиллированной воды и аликвотную часть наносят на бумагу (Кушинский и сотр.).



Р и с. 206. Разделение аденозинфосфорных кислот и других фосфатов при помощи повторного хроматографирования (Эглстон и Хемс).

Система: а, б — первое хроматографирование: 3 час при 22° восходящим способом, растворитель — смесь пропилендилового эфира с 90%-ной муравьиной кислотой (3 : 2); второе хроматографирование — 27 час нисходящим способом с перетеканием в системе и-пропанол — аммиак — 0,002M комплексон III (6 : 3 : 1); в — хроматографирование восходящим способом в кислом растворителе. Обнаружение фотографией в ультрафиолетовом свете (адсорбирующие соединения заштрихованы), молибдатом проявлены фосфаты (Д45). 1 — АТФ; 2 — АДФ; 3 — АМФ; 4 — неорганический фосфат; 5 — ИТФ (?); 6 — неорганический пирофосфат; 7 — глюкозо-1-фосфат и глюкозо-6-фосфат; 8 — фосфоглицеровая кислота; 9 — фруктозо-1,6-дифосфат.

## ОБНАРУЖЕНИЕ

Для обнаружения пятен аденозинфосфатов, как правило, применяют ультрафиолетовое облучение с длиной волны 250—260 мμ. Для химического проявления можно использовать некоторые способы, описанные в предыдущей главе. Кёрёш рекомендует проявление азотнокислой ртутью (Д 135), а в нашей работе (Падр и Какач) с успехом использовано проявление АТФ азотнокислым серебром и бихроматом натрия по Регуэра и Азимову (Д 136). Хейнс и Ишервуд отдают предпочтение молибденовому реактиву (Д 45). Новый способ проявления перманганатом калия с последующим хлорированием (Д 139), дающий возможность проводить количественный анализ, рекомендуют Герлах и Дёринг [1].

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Аденозинтрифосфорную кислоту наряду с фосфорными эфирами сахаров можно разделять по Хейнсу и Ишервуду в системе *n*-пропанол — аммиак — вода (60 : 30 : 10). Для количественного определения (после вырезания пятен и озоления) хорошим методом является способ, предложенный Беренблумом и Чейном (см. стр. 291). Картер применял для разделения АТФ, АДФ и АМФ двухфазную систему растворителей, состоящую из смеси изоамилового спирта с 5%-ным водным раствором  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . После элюирования 0,01 н. соляной кислотой отдельные компоненты были идентифицированы спектрофотометрически при 260 мμ. Разделение можно также проводить в 50%-ном этаноле или 60%-ном пропаноле (Бреслер и Нидзян). Барроуз, а затем и другие исследователи применяли метод Хейнса для разделения фосфорных эфиров в экстрактах мышц. Барроуз предложил 7 систем растворителей, из которых наилучшей является ацетон — 15%-ная трихлоруксусная кислота (65 : 35). В системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (7 : 1 : 5) Джонсон и сотрудники разделили АТФ, АДФ, АМФ и аденозин, причем при хроматографировании в течение 50 час не произошло разложения ни одного из указанных веществ. Ф. Турба и Н. Турба применили для разделения этих соединений систему изомасляная кислота — вода — уксусная кислота (100 : 50 : 1). Кребс и Хемс отделили АТФ и АДФ от ИТФ и ИДФ в системе изопропиловый эфир — 90%-ная муравьиная кислота (90 : 60) и изомасляная кислота — 0,1 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  — 0,1 М комплексон III (100 : 60 : 1,6). В системе насыщенный водный раствор сернокислого аммония — вода — изопропанол (79 : 12 : 2) Бергквисту и Дейчу удалось отделить друг от друга АТФ, ГТФ и УТФ. Подробнее проблемой подбора подходящих систем для разделения фосфорных эфиров занимался Герлах и сотрудники [2] (табл. 93).

Флекенштейн, Янке и Эльке применили для разделения АТФ, АДФ и АМФ две системы растворителей: изопропиловый эфир — 85%-ная муравьиная кислота (90 : 60) для восходящего хроматографирования (4—5 час), *n*-пропанол — аммиак — вода (240 : 120 : 40 + 0,8 мл 0,1 М комплексона III) — для нисходящего хроматографирования (24 час).

## Двумерная хроматография

В случае, когда речь идет о соединениях с весьма близким строением, для разделения используют двумерную хроматографию. По Дейчу и Нильсону на бумаге ватман 1 были разделены следующие вещества: АМФ,



Беннет и Крюкель с помощью двумерного хроматографирования обнаружили в животной ткани АМФ, АДФ, АТФ, ДФН, ТФН, ГМФ, ГДФ, ГТФ и ИМФ.

## *Серусодержащие производные пуринов и пиримидинов*

### Обнаружение

Шабика и Солук рекомендуют тиюрацилы проявлять реактивом Гроте (Д 11): 2-тиоурацил дает синее пятно, 5-йодтиоурацил — сине-зеленое пятно. Обнаружение тиюрацилов можно проводить также, пользуясь гашением флуоресценции пятен в ультрафиолетовом свете (метод Холиди и Джонсона). Тиюрацил, 5-метилтиоурацил и пропилтиоурацил Ледерер и Зильберман обнаруживали, подвергая хроматограмму действию паров воды; при этом возникали темно-коричневые пятна на желтом фоне, которые не отличались стойкостью, однако проявление можно повторять. Рейнгардт применял реакции на тиокарбамиды с хлористым рутением (Д 140).

### Системы растворителей

Для разделения таких соединений можно рекомендовать *n*-бутанол или изоамиловый спирт, насыщенный водой. Рейнгардту удалось четко разделить 6-амино-2-тиоурацил ( $R_f$  0,08), 6-метил-2-тиоурацил ( $R_f$  0,22) тиомочевину ( $R_f$  0,39) и 6-пропил-2-тиоурацил ( $R_f$  0,75) в смеси бензол — этанол (16 : 6) в атмосфере аммиака. Фридкин, а также Стромингер и Фридкин применяли для контроля ферментативного синтеза дезоксирибозидов тиюрацила бутанол, насыщенный 3%-ной борнсей кислотой, а для 6-меркаптопуринов — восходящее хроматографирование в системе 5  $\epsilon$  сернокислого аммония, 5 мл изопропанола и вода до объема 100 мл.

### Количественный анализ

При определении 5-йодтиоурацила в плазме необходимо подкислить плазму соляной кислотой и экстрагировать бутилацетатом. При этом экстрагируются тиюрацил и 5-йодтиоурацил, которые затем переводят в 0,5 н. едкий натр и после подкисления до pH 7,0 хроматографируют в смеси *n*-бутанол — вода. После элюирования водой (в течение 4 час) раствор подвергают спектрофотометрированию (Плуммер; Уэйгл и Плуммер).

## *Производные ксантина*

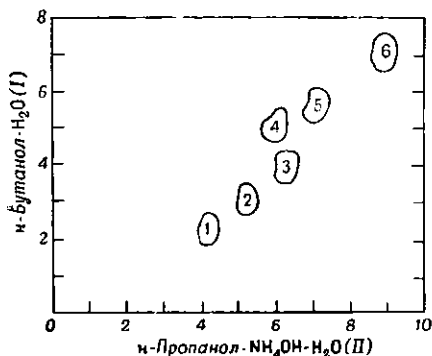
### Обнаружение

Производные ксантина, так же как и другие пурины, поглощают ультрафиолетовый свет при 280 м $\mu$ . В данном случае можно применять те же самые способы обнаружения с помощью ультрафиолетового света указанной длины волны, о которых говорилось на стр. 510. Виланд и Бауэр реко-

мендуют опрыскивать хроматограмму 0,005%-ным раствором флуоресцеина в 0,5 н. растворе  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; производные ксантина обнаруживаются в виде темных пятен на желто-зеленом флуоресцирующем фоне. Весьма чувствительным является проявление ксантиновых производных методом хлорирования по Михлю (Д 141). Для этой цели можно также применять реактив Драгендорфа (Д 144). Поскольку, однако, эти реакции требуют наличия третичного или четвертичного азота, то после сушки хроматограммы сначала проводят опрыскивание 10%-ным водным раствором  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , после чего хроматограмму погружают в диметилсульфат, отжимают между двумя полосками фильтровальной бумаги и нагревают при  $90^\circ$  в течение 10 мин. Только после этого проводят опрыскивание реактивом (Карионе и Хасимото, Д 145). Способ проявления ксантиновых производных в растительном материале приводит Коган и сотрудники.

### Системы растворителей

Разделение ксантиновых алкалоидов изучали Мюнне и Машбеф. Для этой цели они использовали несколько систем на основе *n*-бутанола. Особенным преимуществом обладает система *n*-бутанол — аммиак — вода (100 : 2 : 16), где кофеин имеет  $R_f$  0,72, теофиллин 0,36 и теобромин 0,25.



Р и с. 207. Двумерная хроматограмма метилированных производных ксантина (Виланд и Бауэр).

1 — 7-метилксантин; 2 — 3-метилксантин; 3 — 3,7-диметилксантин (теобромин); 4 — 1,7-диметилксантин (параксантин); 5 — 1,3-диметилксантин (теофиллин); 6 — 1,3,7-триметилксантин (кофеин).

Виланд и Бауэр рекомендуют для разделения метилированных ксантинов двумерное хроматографирование: в первом направлении *n*-бутанолом, насыщенным водой, во втором направлении смесью *n*-пропанол — аммиак, 6 : 4 (рис. 207). Системы с бутанолом и амиловым спиртом для разделения кофеина, теофилина и теобромина применяли также Маркгам и Смит [2].

## Барбитураты

Хроматографирование барбитуратов на бумаге применяют прежде всего в токсикологии, а также при исследовании метаболизма барбитуратов в организме и для аналитических целей в фармакологии.

### Приготовление образцов

Из биологического материала барбитураты экстрагируют хлороформом или эфиром после подкисления. Альген экстрагировал 50 мл мочи 100 мл перегнанного хлороформа. После фильтрования и упаривания досуха

остаток растворяли в 0,1—1 мл хлороформа и наносили на бумагу. Разделение может быть затруднено сопутствующими веществами из биологического материала. Дайнингер проводит очистку сырых экстрактов из 5 мл крови или 20 мл мочи на простом приборе в одну операцию и концентрирует их в 0,1 мл эфирного раствора, который затем наносит на бумагу.

### Обнаружение

Обнаружение лучше всего проводить с помощью вакуумной ртутной лампы с фильтром 254 мμ. Ледвина и сотрудники применяли йенский фильтр UG 5 вместо жидкостного фильтра в соединении с хлорным фильтром, состоящим из кварцевой кюветы, заполненной газообразным хлором. Хроматограмму обрабатывают парами аммиака или опрыскивают 0,5 н. едким натром и сушат. Затем хроматограмму фотокопируют (просвечиванием на чувствительную бумагу) или обнаруживают пятна с помощью флуоресцирующего экрана (Григ). Этим способом можно открыть 10 мкг барбитуратов. Химическими методами можно определить около 50 мкг, поэтому их используют реже. Из химических методов проявления мы приводим цветную реакцию с кобальтом (Хюбнер и Пфайль; Д 142), аммиачным раствором азотнокислого серебра или сернокислой ртутью с последующим промыванием водой и погружением в спиртовой раствор тиодифенилкарбазона (Алгери и Уокер; Викстрём и Сальвезен) или в реактив Гроте (Д 11). Чувствительным является обнаружение в ультрафиолетовом свете после опрыскивания реагентом, содержащим медь (Д 143). Барбитураты с двойной связью проявляли 0,1%-ным раствором  $\text{KMnO}_4$  в ацетоне (Романо); чувствительность составляет около 25 мкг. Таблицу проявляющих реактивов приводит Равентос.

### Системы растворителей

Для идентификации барбитуратов наиболее широко применяются щелочные системы с *n*-бутанолом или другими растворителями. Лучше всего использовать *n*-бутанол, насыщенный 5 н. аммиаком (Алгери и Уокер; Равентос). Дайнингер применял изопропанол с хлороформом и аммиаком (45 : 45 : 10), Викстрём с Сальвезеном применяли смесь хлороформа с 10%-ным аммиаком (100 : 50). Для разделения тиобарбитуратов (препараты трапанал, байтинал, инактин, тиогенал) Зоеринг и Дитц применили смесь *n*-бутанола с амиловым спиртом (1 : 1), насыщенную аммиаком.

Из кислых систем Викстрём и Сальвезен рекомендуют систему толуол — уксусная кислота — вода (100 : 50 : 40).

Значения  $R_f$  в некоторых системах растворителей приведены в табл. 94.

### Количественный анализ

Райт проводил количественные определения спектрофотометрически после обнаружения пятен ультрафиолетовым светом, их вырезания и элюции раствором едкого натра при pH 10. Элюцию можно проводить также боратым буфером при pH 10 (Альген). Пфайль и Гольдбах определяли 10—70 мкг люминала, веронала или фанодорма осаждением на фильтровальной бумаге солями двухвалентной ртути; после промывания и встряхивания колориметрически измеряли окрашивание, которое дает связанная ртуть с дитизоном. Ошибка этого метода составляет 7%.

Таблица 94

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  БАРБИТУРАТОВ

Положение заместителя в барбитуровой кислоте			Торговое название	Система								
5	5'	1		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И
Этил	Этил	Метил	Веронал, барбитал, гипнофер, dormirel	0,26	0,50	0,03	0,26	0,47	0,77	0,58	0,31	0,37
Этил	Этил											0,75
Этил	Бутил							0,69				
Этил	1-Метилбутил	Метил	Амитап	0,74	0,79	0,64		0,73				
Этил	Изоамил						0,75	0,73				
Этил	Аллил							0,55				
Этил	Фенил	Метил	Проминал	0,90	0,75	0,82			0,84	0,75	0,68	0,79
Этил	Фенил		Люминал, гистенс, фенобарбитал	0,50	0,61	0,06	0,31	0,50	0,70	0,56	0,39	0,44
Этил	Циклогексенил		Фанодорм, dormifen	0,69	0,69	0,18	0,49				0,49	0,56
Этил	Циклогептенил	Метил	Медомин							0,63	0,64	
Этил	Пиперидинил		Эльдорал								0,34	
Метил	Фенил		Рутонал				0,22					
Метил	Циклогексенил	Метил	Эвипал, эвипан, гексобарбитал	0,90	0,75	0,90	0,65	0,71	0,88	0,76	0,70	0,81
Изопропил	Аллил	Метил	Нумал	0,61	0,69	0,18	0,49				0,52	0,53
Изопропил	Аллил		Нарконумал									0,90
Изопропил	Бромаллил		Ноктал								0,56	0,60
Изопропил	Бромаллил	Метил	Эунаркон, наркамон				0,75					0,86
втор-Бутил	Бромаллил		Перноктон								0,55	0,70
Аллил	Аллил		Диал, аллобарбитал	0,52	0,64	0,07	0,38					0,48
Аллил	Фенил	Метил							0,69	0,61	0,50	
Этилметилбутил-тиобарбитуровая			Пентотал									0,78

Системы:

А — толуол — уксусная кислота — вода (10 : 4 : 5), Викстрём и Сальвезен;

Б — *n*-бутанол — 10%-ный аммиак (100 : 35), Викстрём и Сальвезен;

В — хлороформ — 10%-ный аммиак (10 : 5), Викстрём и Сальвезен;

Г — амиловый спирт — 20%-ный аммиак (2 : 1), Ледвина и сотрудники;

Д — *n*-бутанол, насыщенный 5 н. аммиаком, Равентос;

Е — этанол — аммиак (95 : 5), Хюбнер и Пфайль;

Ж — *n*-бутанол — аммиак (9 : 1), Хюбнер и Пфайль;З — амиловый спирт — *n*-бутанол (1 : 1); насыщение концентрированным аммиаком, Хюбнер и Пфайль;

И — изопропанол — хлороформ — аммиак (45 : 45 : 10), Дайнингер.

## Мочевая кислота

Мочевую кислоту можно лучше всего обнаружить в ультрафиолетовом свете (Холиди и Джонсон). Для этой цели использовали также аммиачный раствор азотнокислого серебра (Д 4) и мышьяковофосфовольфрамовую кислоту (Джонсон). Для хроматографирования рекомендуют однофазную систему *n*-бутанол — уксусная кислота — монометиловый эфир этиленгликоля — вода (7 : 7 : 2 : 4). Кравчинский испытал несколько растворителей; лучше всего использовать смесь глицерина с водой (10 : 40). Весьма хорошие результаты можно получить при определении мочевой кислоты в моче по Кирби: хроматографирование в 65 %-ном водном растворе лутидина; вместо лутидина можно также применять пиридиновые основания с т. кип. 148—155°. Особенно удобен этот метод для серийных анализов.

### ЛИТЕРАТУРА

- Algeri E. J., Walker J. T., *Am. J. clin. Pathol.*, **22**, 37 (1952).  
 Allgén L. G., *Svensk. farm. Tidskr.*, **57**, 188 (1953).  
 Allouf R., Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **34**, 215 (1952).  
 Bandurski R. S., Axelrod B. J., *biol. Chem.*, **193**, 405 (1951).  
 Bennett E. L., Krueckel B., *Biochim. biophys. Acta*, **17**, 515 (1955).  
 Bergkvist R., Deutsch A., *Acta chem. Scand.*, **8**, 1880 (1954).  
 Boser H., *Naturwiss.*, **40**, 462 (1953); *Z. physiol. Chem.*, **298**, 145 (1954).  
 Boulanger P., Montreuil J., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**, 784, 791 (1951).  
 Brawerman E., Chargaff E., *J. biol. Chem.*, **210**, 445 (1954).  
 Бреслер С. Э., Нидуцьян Э. Н., *ДАН СССР*, **75**, 79 (1950).  
 Брумберг Э. М., *ДАН СССР*, **72**, 885 (1950).  
 Buchanan J. G., Dekker C. A., Long A. G., *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3132.  
 Burrows S., Grylls F. S. M., Harrison J. S., *Nature*, **170**, 800 (1952).  
 Carpenter D. C., *Anal. Chem.*, **24**, 1203 (1952).  
 Carter C. E., Cohn W. E., *Feder. Proc.*, **8**, 190 (1949). [1]  
 Carter C. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1466, 1835 (1950). [2]  
 Cohn W. E., Carter C. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4273 (1950).  
 Crosbie G. W., Smellie R. M. S., Davidson J. N., *Biochem. J.*, **54**, 278 (1953).  
 Daly M. M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *J. gen. Physiol.*, **33**, 497 (1950).  
 Deininger R., *Arzneimittelforsch.*, **5**, 472 (1955).  
 Deutsch A., Nilsson R., *Acta chem. Scand.*, **8**, 1898 (1954); **7**, 858 (1953).  
 Dorough G. D., Seaton D. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2873 (1954).  
 Edström J. E., *Nature*, **168**, 877 (1951). [1]  
 Edström J. E., *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 528 (1952). [2]  
 Eggleston L. W., Hems R. I., *Biochem. J.*, **52**, 156 (1952).  
 Elmore D. T., *J. Chem. Soc.*, **1950**, 2084.  
 Fleckenstein A., Janke J., Eike M., *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, **221**, 404 (1954).  
 Friedkin M., *Biochim. biophys. Acta*, **18**, 447 (1955).  
 Fries N., *Ark. f. Bot.*, **1**, 271 (1949); *Physiol. Plant.*, **2**, 212 (1949); **4**, 410 (1951).  
 Gerlach E., Döring H. J., *Naturwiss.*, **42**, 344 (1955). [1]  
 Gerlach E., Weber E., Döring H. J., *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **226**, 9 (1955). [2]  
 Goeller J. P., Sherry S., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **74**, 381 (1950).  
 Grieg A., *Nature*, **170**, 845 (1952).  
 Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature*, **164**, 1107 (1949).  
 Holiday E. R., Johnson E. A., *Nature*, **163**, 216 (1949).  
 Hotchkiss R. D., *J. biol. Chem.*, **175**, 315 (1948).  
 Hübner G., Pfeil E., *Z. physiol. Chem.*, **296**, 225 (1954).  
 Chargaff E., Magasanik B., Vischer E., Green C., Doniger R., Elson D., *J. biol. Chem.*, **186**, 51 (1950). [1]  
 Chargaff E., Vischer E., Doniger G., Green G., Misani F., *J. biol. Chem.*, **177**, 405 (1949). [2]

- Johnson E. A., *Biochem. J.*, **51**, 133 (1952).  
 Johnson M., Kaye M. A. G., Hems R., Krebs H. A., *Biochem. J.*, **54**, 625 (1953).  
 Kariyone T., Hashimoto Y., *Nature*, **168**, 739 (1951).  
 Kerr S. E., Seraidarian K., Brown G. B., *J. biol. Chem.*, **188**, 207 (1951).  
 Kirby K. S., *Biochem. biophys. Acta*, **18**, 575 (1955).  
 Kirby Berry H., *Univ. Texas Pubs.*, **5109**, 84 (1951).  
 Kogan L., Dicarlo F. J., Maynard W. F., *Anal. Chem.*, **25**, 1118 (1953).  
 Körös Z., *Mag. Kém. Lapja*, **7**, 23 (1952).  
 Krawczyński J., *Polski tygodnik lek.*, **7**, 741 (1952).  
 Krebs H. A., Hems R., *Biochim. biophys. Acta*, **12**, 172 (1952).  
 Kuschinsky G., Lange G., Turba F., *Biochem. Z.*, **325**, 321 (1954).  
 Laufer L., Gutcho M., Stewart E., McCully R., *Proc. ann. Meet. Amer. Soc. Brew. Chem.*, **1952**, 68.  
 Lederer M., Silberman H., *Anal. chim. Acta*, **6**, 133 (1952).  
 Ledvina M., Chundela B., Večerek B., Kácl K., *Českoslov. Farmacie*, **4**, 386 (1955).  
 Little J. A., Buttler G. C., *J. biol. Chem.*, **188**, 695, 705 (1951).  
 Löfgren N., *Acta chem. Scand.*, **6**, 1030 (1952).  
 McDonald J. W., *Biochem. J.*, **57**, 566 (1954).  
 Magasanik B., Vischer E., Doniger R., Elson D., Chargaff E., *J. biol. Chem.*, **186**, 37 (1950).  
 Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **46**, 513 (1950); **49**, 401 (1951). [1]  
 Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **45**, 294 (1949); *Nature*, **163**, 250 (1949). [2]  
 Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **49**, 407 (1951). [3]  
 Michl H., *Naturwiss.*, **40**, 390 (1953).  
 Montreuil J., Boulanger P., *Compt. rend.*, **239**, 367 (1954). [1]  
 Montreuil J., Boulanger P., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**, 784 (1951). [2]  
 Munier R., Macheboeuf M., *Full. Soc. Chim. biol.*, **31**, 1144 (1949); **32**, 192 (1950). [1]  
 Munier R., *Bull. Soc. chim. France*, **1952**, 852. [2]  
 Ogur M., Rosen G., *Arch. Biochem.*, **25**, 262 (1949).  
 Pádr Z., Kakáč B., *Českoslov. Farm.*, **4**, 83 (1955).  
 Paladini A. C., Leloir L. F., *Biochem. J.*, **51**, 426 (1952).  
 Parker G., *Biochem. J.*, **51**, 389 (1952).  
 Pfeil E., Goldbach H. J., *Z. physiol. Chem.*, **302**, 263 (1955).  
 Plummer A. J., *Federation Proc.*, **9**, 309 (1950).  
 Raventos J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **6**, 217 (1954).  
 Reguera R. M., Asimov I., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5781 (1950).  
 Reinhardt F., *Mikrochim. Acta*, **1954**, 219.  
 Romano C., *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, **27**, 1697 (1951).  
 Sempíńska E., *Acta biochim. Polonica*, **2**, 21 (1955); *Postepy Biochemii*, **2**, 131 (1956).  
 Shabica A. C., Solook E., *Federation Proc.*, **9**, 314 (1950).  
 Schneider W. C., *J. biol. Chem.*, **161**, 293 (1945); **164**, 747 (1946).  
 Smith K. C., Allen F. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2131 (1953).  
 Snellman O., Gelotte B., *Nature*, **168**, 461, 462 (1951).  
 Soehring K., Dietz W., *Arzneimittel-Forsch.*, **5**, 495 (1955).  
 Strominger D. B., Friedkin M., *J. biol. Chem.*, **208**, 663 (1954).  
 Tamm C., Shapiro H. S., Lipshitz R., Chargaff E., *J. biol. Chem.*, **203**, 673 (1953).  
 Turba F., Turba N., *Naturwiss.*, **38**, 188 (1951).  
 Vischer E., Chargaff E., *J. biol. Chem.*, **176**, 703 (1948).  
 Wagle G. L., Plummer A. J., *Federation Proc.*, **10**, 342 (1951).  
 Weissmann B., Bromberg P. A., Gutman A. B., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **87**, 257 (1954); *Nature*, **176**, 1227 (1955).  
 Wheeler G. P., Skipper H. E., *J. biol. Chem.*, **205**, 749 (1953).  
 Wickström A., Salvesen B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **4**, 98 (1952).  
 Wieland T., Bauer L., *Ang. Chem.*, **63**, 511 (1951).  
 Wood T., *Nature*, **176**, 175 (1955).  
 Wright J. T., *J. clin. Path.*, **7**, 61 (1954).  
 Wyatt G. R., *Biochem. J.*, **48**, 584 (1951).

# АЛКАЛОИДЫ

---

К. Мацек

Впервые в области алкалоидов хроматографией на бумаге воспользовались Фостер и сотрудники для разделения алкалоидов спорыньи и одновременно Мюнье и Машбеф [3], которые заложили основы методики для алкалоидов всех типов. В вводной части этой главы будут рассмотрены общие закономерности, реактивы для проявления, системы растворителей, подготовка проб и количественное определение, являющиеся общими для алкалоидов различных групп. Конкретные условия опыта, пригодные для разделения химически сходных алкалоидов, будут рассматриваться далее, в специальных разделах. Метилированные ксантины рассмотрены выше в главе, посвященной пуриновым основаниям (см. стр. 521), благодаря их родственным химическим отношениям.

Даже для алкалоидов весьма сложного строения в последнее время появился ряд работ, посвященных связи между строением и хроматографическим поведением. Работы эти имели своей целью отыскание общих закономерностей, которыми можно было бы воспользоваться, с одной стороны, для подбора наиболее удобных систем растворителей, а с другой — для идентификации веществ или для изучения их строения. Работы Мюнье и Машбефа [4, 5], посвященные преимущественно связи между константами диссоциации алкалоидов и их хроматографическим поведением, рассматриваются в разделе о системах растворителей (стр. 530).

Соотношением между строением и хроматографическим поведением (см. также стр. 71) пользовались с целью ориентировки также в случае вератровых алкалоидов и алкалоидов спорыньи (Мацек и Вейделек [9]). Поскольку представляется вероятным, что подобное же соотношение справедливо и для алкалоидов других химических групп, приведем пример расчета значений  $R_M$  вератровых алкалоидов на основании их строения. Расчет был проведен по уравнению

$$R_M = Z + a_x G_1 + a_y G_2 + \dots,$$

где  $Z$  — основная константа,  $G_1, G_2, \dots$  — значения групповых констант и  $a_x, a_y, \dots$  — факторы положения. Значения для отдельных констант

приведены в табл. 95, где одновременно указаны значения  $R_f$  некоторых алкалоидов, полученные экспериментально и вычисленные.

Таблица 95

РАСЧЕТ ЗНАЧЕНИЙ  $R_f$  СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ВЕРАЦЕВИНА И ЦЕВИНА  
(Мадек и сотрудники [8, 9])

Система формамид/хлороформ		Основная константа (Z) для цевина равна 2,9, для верацевина — 3,2	
групповая константа		фактор положения a	
Ацетил	— 0,7	Положение 3	2
Изобутирил	— 1,05	Положение 16	1
Изовалерил	— 1,15	Положение 4	2,15 <sup>a)</sup>
dL- $\alpha$ -Метилбутирил	— 1,2		2,7 <sup>b)</sup>
Бензоил	— 1,2		
Вератроил	— 1,3		

Сравнение вычисленных и экспериментально определенных значений  $R_f$ :

Вещество	$R_f$		$R_M$		$R_M$ (вычисл.) — $R_M$ (найд.)
	вычислено	найдено	вычислено	найдено	
3,4,16-Триацетилцевин . . . . .	0,83	0,78	—0,7	—0,6	0,1
3,16-Дибензоилцевин . . . . .	0,83	0,82	—0,7	—0,68	0,02
3,4,16-Триацетилверацевин . . . . .	0,86	0,82	—0,8	—0,68	0,12
3 16-Дивератроилверацевин . . . . .	0,88	0,87	—0,85	—0,8	0,05

<sup>a)</sup> Это значение подтверждено только для ацетилированных производных цевина.

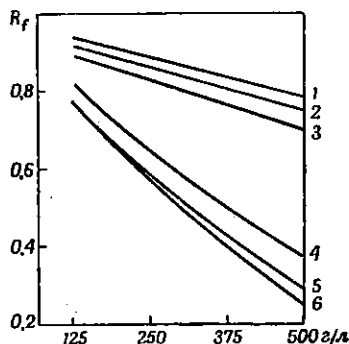
<sup>b)</sup> Это значение подтверждено только для ацетилированных производных верацевина.

Иного направления придерживался Респланди [1], который установил, что многие алкалоиды можно разделить на бумаге с помощью водных растворов электролитов различной концентрации. При таком хроматографировании получаются круглые пятна, как и при распределительном механизме. В последующей работе Респланди [2] показал, что, изображая графически зависимость  $R_f$  от концентрации электролита, применяемого для разделения, можно получить кривые, ход которых и особенно наклон зависят главным образом от несодержащей азота части молекулы. Так, например, замещенные или различным образом видоизмененные соединения, как атропин и т. п., движутся на хроматограмме медленнее, нежели исходные вещества (в данном случае тропин) (рис. 208). Эту связь подтвердили Респланди и Саннье [3] для ряда гомологических аминокислот, индоловых кислот, четвертичных оснований и т. д. Из их работы следует, что на наклон кривых преимущественное влияние оказывает несодержащая азота часть молекулы (бензольное ядро), тогда как азотистая часть влияет значительно слабее. Авторы предложили свой метод для быстрого суждения о строении фракций, получаемых при расщеплении алкалоидов.

Оба вышеописанных метода дают пути для изучения связи между строением и хроматографическим поведением алкалоидов. Эти методы, однако, требуют подтверждения для алкалоидов других групп. Далее, значительную помощь могут оказать применение реактивов, специфичных для определенных функциональных групп или для взаимного расположения этих групп, а также комбинации их с различными физико-химическими методами.

Р и с. 208. Изменение значений  $R_f$  алкалоидов в зависимости от концентрации соли в подвижной фазе (Респланди).

Ось абсцисс—концентрация  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (г/л).  
Алкамины: 1 — скополин; 2 — тропин; 3 — эггонин;  
эфирные алкалоиды: 4 — скополамин; 5 — гоматронин;  
6 — атропин.



#### ПОДГОТОВКА ПРОБ

Для извлечения алкалоидов из растительного материала можно использовать экстракцию водными кислотами, затем подщелочить экстракт и извлечь его эфиром или хлороформом или же высушенный и хорошо измельченный материал подщелочить и затем экстрагировать хлороформом. При исследовании небольших образцов сырья, например при анализе склеродий спорыньи, удобнее растереть образец с тонким кварцевым песком и подвергнуть экстракции в микроэкстракторе (Мацек и Ванечек [6]). Этим способом можно исследовать даже десятимиллиграммовые навески сырья. Иногда балластные вещества ухудшают хроматографическое разделение алкалоидов. При этом следует считаться преимущественно с неорганическими солями и липсидами. Электролиты можно удалить экстрагированием алкалоидов-оснований органическим растворителем, а липоиды — извлечением растительного сырья сначала петролейным эфиром и лишь затем, после подщелачивания, эфиром или хлороформом.

В отдельных случаях, когда имеется в распоряжении достаточное количество материала, перед собственно хроматографическим разделением следует рекомендовать грубое фракционирование. Менар и Буссмар разделяли смесь морфина, скополамина, стрихнина и спартеина при помощи осаждения 1 н. едким натром на две фракции и лишь затем хроматографировали.

В органическом материале алкалоиды иногда могут присутствовать в связанной форме, например в виде гликозидов. В таком случае пробу следует предварительно подвергнуть гидролизу соляной кислотой при повышенной температуре в автоклаве, затем подщелочить и извлечь органическим растворителем (Маннеринг и сотрудники).

#### ОБНАРУЖЕНИЕ

В этом разделе мы упоминаем лишь об универсальных реактивах на алкалоиды. Наиболее часто используется предложенный Мюнье и Машбефом [3] реактив Драгендорфа (*D 144a*), реагирующий практически со всеми веществами алкалоидного характера. Для реакции необходимо нали-

чие третичного или четвертичного атома азота, однако реактив также хорошо взаимодействует и с некоторыми не содержащими азота веществами сложного строения, например со стероидами.

Реакция с реактивом Драгендорфа зависит от величины pH бумаги; условием ее успешного проведения служит низкое значение pH. Поэтому на бумагах, обработанных буферным раствором, или при применении систем основного характера предварительно следует опрыскать бумагу уксусной кислотой и лишь затем реактивом Драгендорфа или повторно опрыскивать этим реактивом. Еще удобнее пользоваться модифицированным реактивом Драгендорфа, содержащим винную кислоту (Д 1446), согласно более поздней работе Мюнье [2]. Неудобство реактива Драгендорфа состоит в том, что приходится опрыскивать водным раствором. Поэтому Тис и Рейтер [1] предложили новую модификацию, в которой в качестве растворителя пользуются этилацетатом и уксусной кислотой. Такой реактив, однако, менее чувствителен и поэтому не получил распространения.

Некоторые алкалоиды, не содержащие третичного или четвертичного атома азота, не взаимодействуют с реактивом Драгендорфа (эфедрин, некоторые пиридиновые алкалоиды и метилированные ксантины). По Карионе и Хасимото эти вещества с помощью диметилсульфата можно превратить в четвертичные основания, которые будут вступать в реакцию с реактивом Драгендорфа (Д 145). Из прочих универсальных реактивов, наряду с парами йода, наиболее употребителен йодоплатинат калия (Д 84), удобство которого по Гольдбауму и Казьяку состоит в том, что алкалоиды не разлагаются. В случае необходимости проведения еще какой-либо реакции или спектрального изучения можно вырезать пятно алкалоида, разрушить комплекс сульфитом натрия и бурой, а затем свободное основание извлечь органическим растворителем (Н 119).

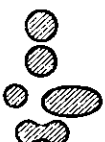
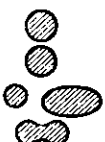
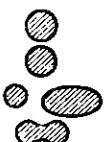
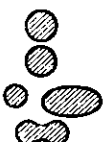


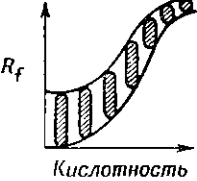



Вопросами проявления занимались Шульц и Штраус, а также Мацек и сотрудники [3]; некоторые обычные реакции см. в табл. 102—107 (стр. 554—557).

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

При хроматографии на бумаге большинства алкалоидов в нейтральных системах можно наблюдать образование пятен, форма которых отличается отклонениями от линейной изотермы распределения: алкалоиды образуют полосы или «хвосты», и их значение  $R_f$  становится зависимым от концентрации нанесенного вещества. Эти явления обусловлены способностью групп, содержащих азот, к диссоциации в водной среде и по Мюнье и Машбефу [4] определяются преимущественно величиной константы диссоциации. В нейтральных системах круглые пятна образуют только очень сильные основания, имеющие константу диссоциации выше  $10^{-3}$ , или основания, практически недиссоциированные, с константой диссоциации ниже  $10^{-12}$ . Значения констант диссоциации большинства алкалоидов находятся как раз между этими пределами, поэтому для них в процессе разделения происходит сдвиг равновесия диссоциации и возникновение указанных нарушений. Для предотвращения этих явлений (см. также стр. 150) необходимо пользоваться системами основного характера, подавляющими диссоциацию, или, напротив, системами кислого характера, способствующими диссоциации. Неудобство основных систем состоит, однако, в том, что свободные недиссоциированные основания лишь в ничтожной степени растворимы в водной фазе и поэтому передвигаются по хроматограмме вместе с фронтом растворителя. Поэтому кислые системы более

употребительны. Влияние рН на форму пятен схематически показано на рис. 209.

На основании изложенного все применяемые системы можно в зависимости от величины рН разделить на три группы: 1) кислые системы; подкислена подвижная фаза или бумага пропитана буферным раствором;

Константа диссоциации	Система	Форма пятен	Примечания
$K > 10^{-2}$	Нейтральная Кислая Щелочная	+  +  +  - 	Основание следует наносить в виде соли <sup>а)</sup>
$10^{-3} \geq K \geq 10^{-9}$	Нейтральная Щелочная Кислая	-  +   $R_f$ Кислотность	Форма правильная, но $R_f$ близко к 1. Следует определить влияние концентрации кислоты и выбрать кислоту с $K$ , близкой к $K$ основания <sup>б)</sup>
$K \leq 10^{-12}$	Нейтральная Щелочная Кислая	+  +  + 	Форма во всех случаях правильная. Условия следует выбирать так, чтобы $R_f$ достаточно отличались и не были близки к 1

Р и с. 209.

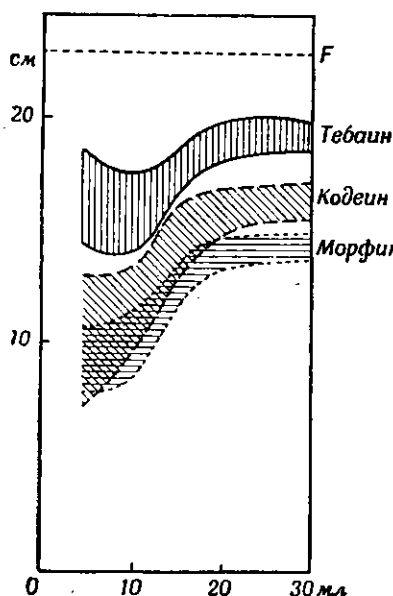
<sup>а)</sup> В некоторых щелочных системах пятна, содержащие гидраты окисей четвертичных оснований, растягиваются и раздваиваются; расплывание можно устранить, применяя менее полярную подвижную фазу. В редких случаях, когда присутствие вещества, принадлежащего к другой группе, требует применения щелочной системы, следует подвижную фазу выбирать так, чтобы деформация пятен гидратов окисей четвертичных оснований была минимальной.

<sup>б)</sup> Практически все органические кислоты обладают константами диссоциации в пределах от  $10^{-2}$  до  $10^{-6}$ . В случае неорганических кислот, константа диссоциации которых превышает  $10^{-2}$  (HCl, HBr, HF, HJ,  $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$ ...), повышение концентрации способствует устранению «хвостов». Эти кислоты можно, следовательно, употреблять, не учитывая константу диссоциации основания; иногда, однако, наблюдается расслаивание фазы (см. текст).

разделение проводят нейтральной системой; 2) бумагу пропитывают полярным органическим растворителем и хроматографируют свободное основание; 3) хроматографируют видоизмененные молекулы алкалоидов.

Применение кислых систем было основательно разработано в трудах Мюнье и Машбефа [3—5]. Наиболее употребительны спиртовые системы, смешивающиеся или не смешивающиеся с водой и подкисленные органической (уксусная) или минеральной (соляная) кислотой. В виде исключения проводилось также разделение алкалоидов в водном растворе с низкими значениями рН (Гохштейн и сотрудники). В системах, содержащих органические кислоты, образование круглых пятен, а тем самым и возможность разделения нескольких алкалоидов, определяется концентрацией кислоты в подвижной фазе. Лучше всего это можно видеть на примере анализа морфина, тебаина и кодеина (рис. 210). При применении минеральных кислот обычно имеет место образование второго фронта вследствие от-

слайвания воды и примененной кислоты от подвижной фазы. Если этот второй фронт не увлекает разделяемые вещества, то образование его не является помехой; хотя значения  $R_f$  и не всегда совершенно точно воспроизводимы, их соотношение сохраняется. Если же алкалоиды движутся в области второго фронта, следует изменить положение его, снижая содержание кислоты, или, что еще лучше, пользоваться пропитанными бумагами (Мюнье и сотрудники [7]).



При пропитке бумаги нейтральными солями, имеющими общий анион с кислотой, содержащейся в подвижной фазе, возникает до известной степени буферная система, устраняющая нарушения второго фронта и позволяющая, кроме того, пользоваться системами с более слабыми кислотами (рис. 211).

Для лучшего разделения некоторых мало полярных алкалоидов (например, алкалоидов спорыньи) пользовались обращенными фазами. Тайлер и Швартинг пропитывали бумагу силиконом, удерживавшим органическую фазу системы *н*-бутанол — уксусная кислота или соответственно *н*-бутанол — ацетатный буфер, и проводили разделение водной фазой.

Р и с. 210. Влияние содержания кислоты в подвижной фазе на разделение алкалоидов (Мюнье). По оси абсцисс указано количество уксусной кислоты в 100 мл *н*-бутанола.

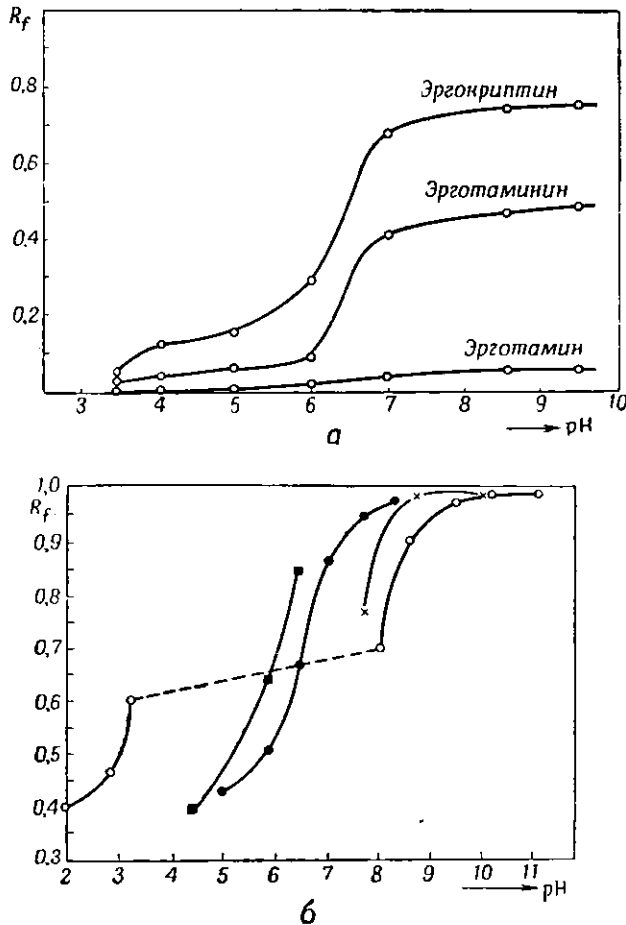
Штоль и Рюэггер также для разделения алкалоидов спорыньи пропитывали бумагу диметилфталатом и проводили разделение водным раствором формамида, рН которого устанавливался в пределах 4—5,2.

Из кислых систем наиболее часто применяется система *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5, или с большим содержанием уксусной кислоты); пользуются также пропиткой бумаги 0,5 *М* раствором хлористого натрия или калия и смесью *н*-бутанола с соляной кислотой (100 : 2—100 : 4), насыщаемой водой. Для систем, содержащих уксусную или муравьиную кислоты, необходимо принимать во внимание указание Гора и Адшида: основания движутся по бумаге быстрее, нежели алкалоиды, нанесенные в форме солей. Для некоторых солей, например для фосфата кодеина, в системе *н*-бутанол — муравьиная кислота наблюдалось образование трех пятен даже в случае чистого алкалоида.

Для систем второго типа, не отличающихся по значению рН от первых, рН устанавливают, пропитывая бумагу буферным раствором. Проще всего (по данным Мюнье и сотрудников [6]) пропитать бумагу кислой солью, например 0,5—1 *М* раствором кислого фосфата калия, и проводить разделение *н*-пропанолом или *н*-бутанолом с различным содержанием воды. В такой системе Мюнье [2] удалось, например, очень хорошо отделить алкалоиды от соответствующих им *N*-оксида.

Многие авторы пользовались бумагой, пропитанной буферными растворами, для установления оптимальных условий разделения алкалоидов,

изменяя pH бумаги от низких значений к высоким. При графическом изображении зависимости  $R_f$  от pH получают характерную S-образную кривую (рис. 212); при низких значениях pH алкалоиды движутся медленно, при высоких — быстро. Обычно наилучшего разделения удается достичь при тех значениях pH, при которых кривая образует резкий перегиб. Этим методом пользовались Карлесс и Вудхед [2], Бриндл и сотрудники



Р и с. 212. Зависимость значений  $R_f$  алкалоидов от pH системы и типа буферного раствора.

а — алкалоиды спорыньи (Мадек): бумага пропитана 50 %-ным этанольным раствором формамида, pH которого установлен с помощью муравьиной кислоты или аммиака. Для разделения применяли бензол.

б — алкалоиды табака (Крафт): ○ гликоколовый буфер; ■ цитратный буфер; ● фосфатный буфер; × боратный буфер.

для разделения алкалоидов *Solanacei*, Крафт — для алкалоидов табака и Вагнер — для алкалоидов опия. Крафт, помимо того, установил, что на подвижность алкалоидов оказывает влияние состав буферного раствора, что можно видеть из рис. 212, б. Наиболее удобные системы такого типа будут упомянуты в специальном разделе этой главы.

Другой способ разделения состоит в хроматографировании свободных оснований на бумаге, пропитанной органическим растворителем

с высокой температурой кипения, например формамидом. Этим методом пользовались Фучик и Тыхий для разделения алкалоидов лобелии; позже он был применен и для алкалоидов других групп. Для пропитки применяют исключительно формамид, а в качестве подвижной фазы — растворители от хлороформа до бензина и циклогексана.

Наконец, последний способ основывается на превращении молекулы алкалоидов перед нанесением на бумагу или во время самого хроматографического разделения. Брейнигер и Боргвардт с помощью бромистого метила превращают алкалоиды в соли четвертичных оснований, которые, будучи веществами с высокой константой диссоциации, образуют на бумаге хорошо очерченные компактные пятна. Милетти и Адембри разделяют алкалоиды водным раствором пиридина в форме их рейнекатов. Другие методы основаны на взаимодействии алкалоидов с составными частями пропитки бумаги в процессе хроматографирования. Так, Вагнеру удалось разделить смесь морфина и дилаудида, а также кодеина, дикодида и эйкодала, пропитывая бумагу бисульфитом калия; алкалоиды, содержащие кетогруппу, образуют на бумаге продукты присоединения с бисульфитом, которые, как вещества весьма гидрофильные, лишь медленно перемещаются по бумаге; прочие алкалоиды движутся нормально. Мацек и Вейделек [9] в случае вератровых алкалоидов воспользовались наличием  $\alpha$ -диольной группировки в молекуле для образования боратных комплексов. Вещества с неодинаковым числом свободных  $\alpha$ -диольных групп давали неодинаковые понижения значений  $R_f$ , чем обеспечивалось их лучшее разделение.

В заключение следует упомянуть о работе Шуте [1, 2], которому удалось, например, разделить пару атропин—скополамин 5%-ным водным аммиаком. Эти работы, имеющие преимущественно теоретическое значение, приведены на стр. 88.

#### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Из обычных методов упомянем метод Листа. Бумагу погружают в раствор фосфорномолибденовой кислоты в разбавленной соляной кислоте (или опрыскивают этим раствором) и образовавшийся осадок восстанавливают хлористым оловом в молибденовую синь. Сделав затем бумагу прозрачной при помощи смеси  $\alpha$ -бромнафталина и парафина, измеряют интенсивность пятен фотометрически ( $P$  120). Тис и Рейтер [3] применяли аналогичный метод, но окрашивали алкалоиды раствором йодовисмутита натрия в этилацетате (красное окрашивание).

### *Алкалоиды, не содержащие гетероциклического азота*

#### ЭФЕДРИН

Эфедрин дает с реактивом Драгендорфа лишь слабую реакцию. Для проявления можно использовать упомянутый способ превращения в четвертичную соль по Карионе и Хасимото ( $D$  145) или проявлять нитро-

пруссидом натрия в ацетальдегиде (Мацек и сотрудники [31] (Д 147). Чувствительнее, однако, проявление нингидрином (Д 112). Для разделения применяют обычные системы, например *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). См. также табл. 102.

### ГАЛЕГИН

Маркович и Диттерова проявляют галегин перманганатом калия (Д 36) или раствором бромфенолового синего (Д 6). Однако по данным Колоушека и сотрудников более специфична реакция с реактивом Сакагути (Д 104).

Из систем растворителей можно пользоваться системой *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5).

### ГРУППА КОЛХИЦИНА

Валашек и сотрудники для проявления этих веществ рекомендовали использовать фосфорновольфрамовую кислоту или наблюдать флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. Колхицин можно отличить от колхицеина, опрыскивая раствором хлорного железа, с которым на холоду реагирует только колхицин. Мачак и сотрудники видоизменили проявление хлорным железом, с которым при нагревании в присутствии соляной кислоты реагируют и некоторые другие алкалоиды. По данным Валашека и сотрудников для того, чтобы отличить колхицин от колхицеина, можно хроматографировать в смеси четыреххлористого углерода с метанолом и водой (1 : 1 : 1), в которой колхицин имеет  $R_f$  0,34, а колхицеин остается на линии старта.

Мачак с сотрудниками хроматографируют колхицин, колхицеин, изоколхицин, а также вещества В, E<sub>1</sub>, F, S и C в системе бензол — уксусная кислота — вода (10 : 3 : 7).

### ДАМАСЦЕНИН

Дамасценин по Тайлеру [1] можно обнаружить по его флуоресценции в ультрафиолетовом свете. Для разделения Тайлер [1] пользовался *n*-бутанолом, насыщенным водой, на бумаге, пропитанной фосфатным буфером с pH 8.

## Производные пиррола

### СТАХИДРИН

Лит и сотрудники отделяют стахидрин от холина, пользуясь смесью *n*-бутанола, соляной кислоты и воды. Оба вещества можно проявлять реактивом Драгендорфа или парами йода.

## Производные пиридина

### АЛКАЛОИДЫ ТАБАКА

#### Обнаружение

Алкалоиды табака, как и другие вещества, являющиеся производными пиридина, удобнее всего проявлять реакцией с бромцианом, при которой происходит раскрытие пиридинового цикла и образование глутаконового диальдегида. Затем можно пользоваться чувствительной реакцией с различными аминами, лучше всего ароматическими (Верле и Кох). Помимо анилина (Д 152а), Вегнер применяет для такого проявления 1-фенилметил-пиразолон, барбитуровую или тиобарбитуровую кислоты; последующее опрыскивание раствором соды позволяет отличить никотин от норникотина и анабазина. Однако наиболее часто применяется реакция с *n*-аминобензойной кислотой или ее этиловым эфиром (Джеффри и Эофф). Для полуколичественной оценки по интенсивности и размерам пятен лучше добавлять *n*-аминобензойную кислоту непосредственно в растворитель (Д 152б). Проявление при помощи бензидина по Тевари, по-видимому, менее чувствительно.

#### Системы растворителей

Поскольку некоторые вещества из этой группы соединений представляют собой жидкости, разделение рекомендуется проводить при пониженных температурах (0—5°). Особенно это необходимо при количественных определениях. Для разделения можно пользоваться кислыми системами без предварительной пропитки бумаги (Портер и сотрудники) или проводить разделение на пропитанной бумаге. Второй способ в настоящее время более распространен. Влияние буферных растворов на разделение никотина, анабазина и норникотина подробно изучал Крафт, который установил, что оптимальные значения рН при применении фосфатного буфера находятся в пределах 7—8. Для разделения он пользовался бутанолом, насыщенным водой. Лейзерсон и Уокер, а также Джеффри и Эофф применяли *трет*-амиловый спирт, насыщенный водой (Д 152б), на бумаге, пропитанной ацетатым буфером с рН 5,6. В этой системе значение  $R_f$  никотина составляло 0,60, анабазина 0,16 и норникотина 0,10. Значения  $R_f$  некоторых других алкалоидов приведены в табл. 96.

#### Количественное определение

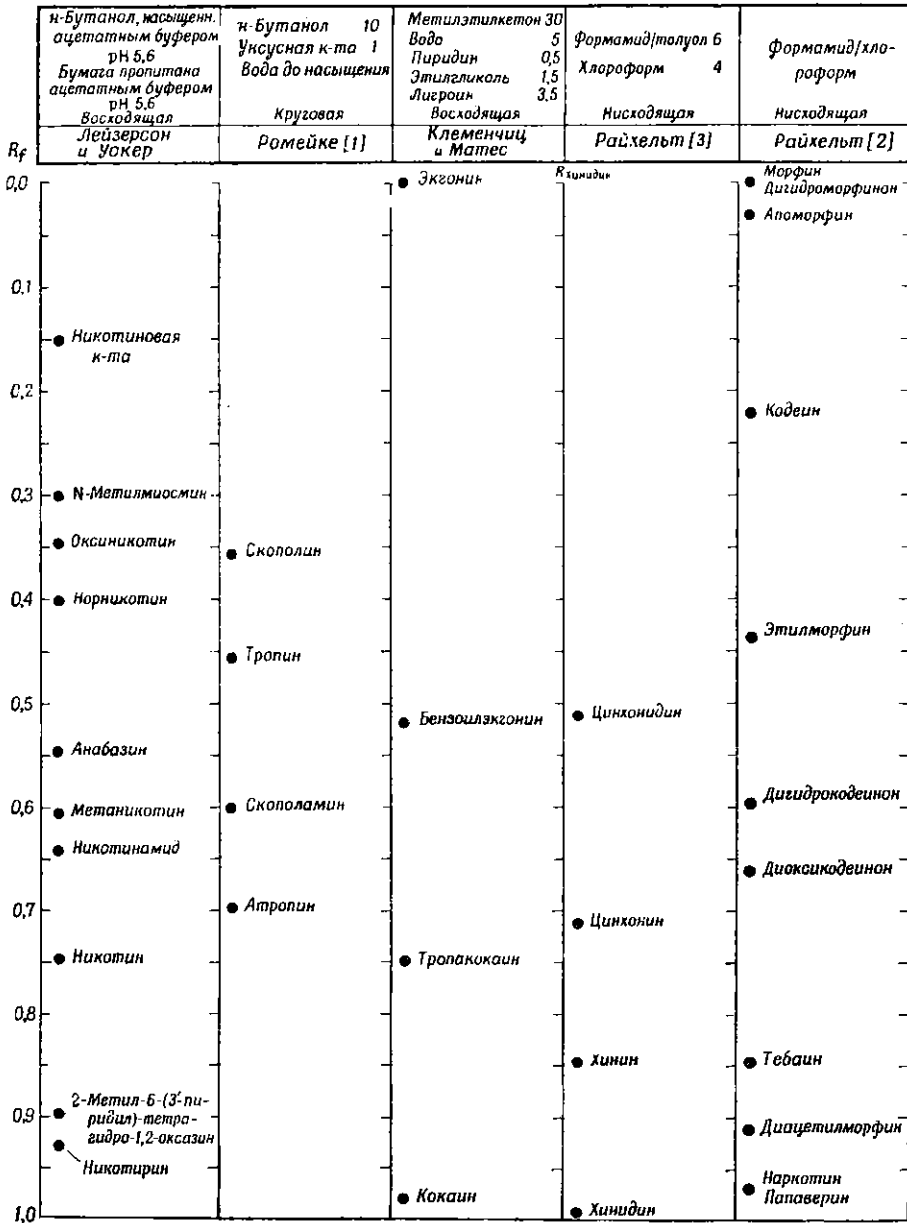
Цзо и Джеффри наносили алкалоиды на бумагу в виде полосок. По окончании разделения алкалоиды извлекали подкисленной водой и вытяжки исследовали спектрофотометрическим способом.

### АЛКАЛОИДЫ ЛОБЕЛИИ

Для проявления наряду с реактивом Драгендорфа по Фучику и Тыхому можно применять этиловый эфир *бис*-(3-хлор-2,4-дикетохроманил-3)-уксусной кислоты, который, однако, менее чувствителен. Для разделения наиболее удобна система с формамидом в качестве неподвижной фазы и

Таблица 96

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АЛКАЛОИДОВ ТАБАКА, АЛКАЛОИДОВ ТРОПИНОВОЙ И КОКАИНОВОЙ ГРУПП, АЛКАЛОИДОВ ХИННОЙ КОРЫ И АЛКАЛОИДОВ ОПИЯ



смесью бензола и хлороформа (1 : 1) в качестве подвижной. В этой системе значение  $R_f$  лобелина равно 0,43, лобеламина — 0,77 и лобеланидина — 0,22. Штайнеггер и Оксер пропитывают бумагу хлористым калием и хроматографируют в смеси октанола, воды, бутанола и соляной кислоты.

## КОНИИН, ПИПЕРИН

Хроматографическое поведение охарактеризовано в табл. 104 и 107.

*Алкалоиды с конденсированными  
пирролидиновыми и пиперидиновыми циклами*

## ГРУППА ТРОПИНА

## Проявление

Эти алкалоиды наиболее удобно проявлять реактивом Драгендорфа (Д 144). Матес и Клеменциц отдают предпочтение 0,5%-ному спиртовому раствору дифенилкарбазона, с которым тропиновые алкалоиды после высушивания дают красное окрашивание.

## Системы растворителей

Разделение атропина, скополамина, гоматропина, тропина и скополина не представляет затруднений. Для них большей частью применяют пропитанные бумаги и бутанольные системы; Мюнье и сотрудники [7] рекомендуют бумагу, пропитанную 0,5 *M* раствором хлористого калия, и смесь изобутанол — соляная кислота (100 : 2, с добавкой воды до насыщения); характер разделения и влияние пропитки показаны на рис. 211. Для серийных анализов удобен способ, предложенный Ромейке [1], с применением круговой хроматографии в системе *n*-бутанол — уксусная кислота (10 : 1), насыщенной водой (см. табл. 96). Для разделения скополамина, метелонидина и гиосциамин Ромейке [2] применяет бумагу, пропитанную фосфатным буфером с pH 6,9—7,1, и *n*-бутанол, насыщенный водой. Несколько менее удобна система формамид/бензол — хлороформ (3 : 2) по Райхельту [1], так как в ней тропин не отделяется от гоматропина. До настоящего времени ни в одной системе не удалось разделить гиосциамин и атропин.

## Количественное определение

Ромейке [1] предложила пользоваться колориметрическим методом по Ван Осу с применением раствора *n*-диметиламинобензальдегида в концентрированной серной кислоте.

Однако, поскольку при элюировании алкалоидов с бумаги этанолом полное вымывание не достигается и часть их остается адсорбированной на бумаге, Дрей и Фостер рекомендуют определять общее содержание алкалоидов классическими методами, а количественной хроматографией на бумаге с последующим элюированием определять лишь соотношение отдельных алкалоидов. Для такого определения пользуются фотометрическим способом и модифицированной реакцией Витали-Морино. Аналогичный способ применял Райхельт [1], который, однако, элюировал алкалоиды из бумаги смесью этанола, уксусной кислоты и воды (5 : 6 : 89; II 121).

## ГРУППА КОКАИНА

Для проявления наиболее удобен реактив Драгендорфа (Д 144). Менее чувствителен бромкрезолпурпур, который рекомендовали Клеменчиц и Матес. Эти авторы предложили для хроматографирования смеси этилгликоля (этилцеллозольв) с водой в различных соотношениях. Для отделения экгоина от бензилэкгоина, тропаккоина и кокаина наиболее пригодной оказалась смесь метилэтилкетона с водой, пиридином, этилгликолем и лигроином (т. кип.  $95-105^\circ$ ) в соотношениях  $30 : 5 : 0,5 : 1,5 : 3,5$ . Значения  $R_f$  приведены в табл. 96.

## АЛКАЛОИДЫ ГРАНАТОВОГО ДЕРЕВА

Для разделения псевдопельтьерина, изопельтьерина и метилизопельтьерина Вибаут и сотрудники рекомендовали *n*-бутанол с соляной кислотой ( $100 : 8$ , вода до насыщения). Алкалоиды проявляют реактивом Драгендорфа (Д 144).

*Алкалоиды, содержащие хинолиновый цикл*

## АЛКАЛОИДЫ ХИННОЙ КОРЫ

**Проявление**

Помимо обычных реактивов, для обнаружения можно пользоваться флуоресценцией некоторых из этих алкалоидов в ультрафиолетовом свете: хинин, хинидин и их дигидропроизводные обладают синей, хинотоксин — желто-зеленой флуоресценцией (Байер и Катона). Цинхонин и цинхонидин не флуоресцируют в ультрафиолетовом свете.

**Системы растворителей**

Для разделения этих алкалоидов бумаги, обработанные буфером, не пригодны. Луссман и сотрудники пользуются циклогексанолом, насыщенным водой, или разбавленной соляной кислотой (примерно 3,5 н.) и разделяют таким образом хинин, хинидин, цинхонин и цинхонидин. Де Мурлоозе и Кастильи применяют водные растворители, однако все четыре алкалоида не разделяются. Наиболее удобно, по-видимому, разделение на бумаге, пропитанной формамидом, с помощью смеси хлороформа и толуола ( $6 : 4$ ), по Райхельту [3]; значения  $R_f$  приведены в табл. 96. Для отделения хинотоксина от хинина Байер и Катона рекомендовали смесь *n*-бутанол — хлороформ — соляная кислота — вода ( $12,5 : 12,5 : 50 : 50$ ).

**Количественное определение**

Количества алкалоидов в пределах  $1-20$   $\mu\text{г}$  по Де Мурлоозе можно определять после элюирования флуоресцирующих алкалоидов с бумаги 10%-ной серной кислотой, измеряя интенсивность флуоресценции растворов.

## Алкалоиды, содержащие изохинолиновый цикл

### АЛКАЛОИДЫ ОПИЯ

Поскольку при хроматографии на бумаге большей частью приходится принимать во внимание разделение всех алкалоидов, встречающихся в опии, мы не будем строго придерживаться химической классификации и отнесем сюда алкалоиды группы папаверина и морфина. Кроме того, упомянем и о некоторых синтетических производных морфина.

#### Обнаружение

Помимо проявления с помощью реактива Драгендорфа (*Д 144*), можно воспользоваться и флуоресценцией некоторых алкалоидов в ультрафиолетовом свете (апоморфин, наркотин, папаверин). Для проявления морфина, апоморфина и некоторых производных морфина можно использовать их фенольную гидроксильную группу и опрыскивать хроматограмму реактивом Паули (*Д 51*). Свендсен [1] проявляет эти алкалоиды нитратным реактивом, а Сальвезен и Паульсен —  $\text{FeCl}_3$  с желтой кровавой солью.

#### Системы растворителей

Для разделения алкалоидов опия и анальгетиков ряда морфина наиболее удобна система с формамидом в качестве неподвижной фазы и хлороформом или смесью хлороформа и бензола (2 : 3) в качестве подвижной фазы (Райхельт [2]). Для отделения наркотина от папаверина следует применять смесь бензол — бензин (1 : 1) (Мацек и сотрудники [3]). Формамидные системы, однако, не позволяют разделить гидрофильную пару морфин — дигидроморфин (дилаудид), для которой, по Сальвезену и Паульсену, пригодна система хлороформ — уксусная кислота — вода (10 : 4 : 5) или, по Вагнеру, *n*-бутанол — хлороформ — вода (1 : 4 : 5) на бумаге, пропитанной цитратно-солянокислым буфером с pH 4. По Видицу, для разделения можно применять также систему дихлорэтан — уксусная кислота — вода (10 : 4 : 1); эта система удобна в качестве дополнительной к большинству бутанольных систем, так как многие алкалоиды передвигаются в ней по бумаге в обратном порядке, что очень удобно для более точной идентификации. Значения  $R_f$  некоторых алкалоидов приведены в табл. 96.

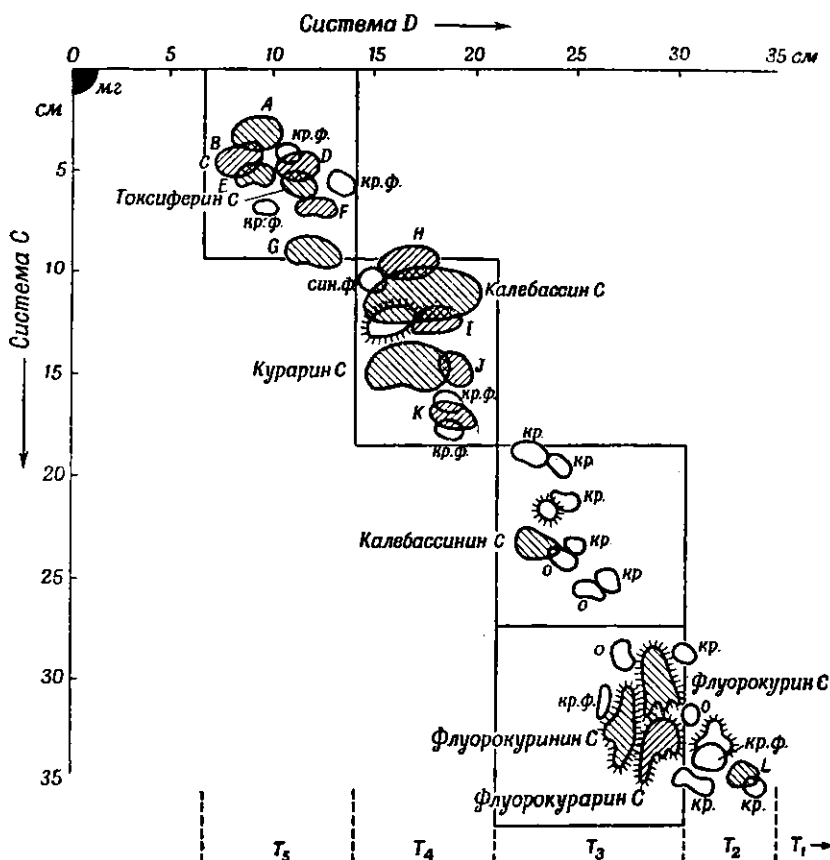
Помимо приведенных систем, обычные алкалоиды опия можно разделять на бумагах, пропитанных неорганическими солями (Мюнье и сотрудники [6, 7]). Для разделения некоторых других оксиморфинановых и метоксиморфинановых производных Бросси и сотрудники рекомендуют пропитывать бумагу фосфатным буфером с pH 6,32 и хроматографировать в системе амиленгидрат — ди-*n*-бутиловый эфир — вода (80 : 7 : 13).

#### Количественное определение

Количественно определяют главным образом морфин, наряду с прочими алкалоидами, пользуясь его фенольной гидроксильной группой для цветных реакций. Свендсен [1] для такого определения применял реакцию с азотистой кислотой; в более поздней работе Свендсен [2] отдал предпочтение реактиву Фолина — Чокальте. См. также рис. 103 на стр. 191.

## АЛКАЛОИДЫ КУРАРЕ

Хроматография на бумаге значительно содействовала развитию химии этой группы алкалоидов, так как их сложное строение, одновременное наличие 20—30 алкалоидов в природном материале и, наконец, трудная доступность сырья затрудняли анализ этих веществ классическими методами. Основы методики хроматографии этих веществ на бумаге можно



Р и с. 213. Хроматография предварительно очищенной фракции хлоридов из калевассового кураре (Шмид и сотрудники).

Система: в первом направлении (C) — метилэтилкетон, насыщенный водой с 1—3% метанола; во втором направлении (D) — этилацетат — пиридин — вода (7,5 : 2,3 : 1,65). Проявление сульфатом церия (D116); окраска отдельных пятен указана сокращенно (см. список сокращений). Флуоресценция в ультрафиолетовом свете обозначена штриховкой пятен по периметру. Целиком заштрихованные пятна обозначают алкалоиды, которые были выделены. Флюорокурин C в этом типе кураре не содержится и был добавлен к смеси перед хроматографией.

найти в работе Шмида и Каррера [1]. В настоящее время не только применяют хроматографию на бумаге для обычных количественных определений, но пользуются также колонками порошкообразной целлюлозы для препаративного разделения этих алкалоидов (Виланд и Мерц). Швейцарские исследователи широко пользуются спектрофотометрией хроматограмм (Асмис и сотрудники). Кебрле и сотрудники сделали очень интересное

наблюдение, обнаружив, что курареподобное действие отдельных веществ обратно пропорционально их величинам  $R_K$  (по отношению к кураину), следовательно, и растворимости в органическом растворителе.

### Обнаружение

Наиболее часто используется сульфат церия (*Д 146*), который с алкалоидами кураре дает достаточно характерное красное окрашивание (рис. 213). Виланд и Мерц пользовались, кроме того, коричневым альдегидом в атмосфере соляной кислоты (*Д 92*); при этом алкалоиды также дают красное окрашивание. Чувствительность этих реакций составляет около 1  $\mu$ г. Такое проявление можно затем для некоторых алкалоидов дополнить опрыскиванием азотной или соляной кислотой, хлорным железом или обнаруживать их по флуоресценции в ультрафиолетовом свете (Шмид и сотрудники [2], Аданк и сотрудники).

### Системы растворителей

Для идентификации обогащенных смесей из природного сырья наиболее приемлема двумерная хроматография по способу Шмида и сотрудников [2]; сначала проводят разделение метилэтилкетонем, насыщенным водой с 1—3% метанола, а в поперечном направлении — системой этилацетат — пиридин — вода (7,5 : 2,3 : 1,65). Одномерной хроматографией пользуются только для характеристики чистоты веществ или для контроля фракционирования на колонках. В этом случае наиболее удобна смесь метилэтилкетона с водой и 1—3% метанола (Каррер).

## АЛКАЛОИДЫ ЖЕЛТОКОРНЯ КАНАДСКОГО (*HYDRASTIS CANADENSIS*)

Для обнаружения берберина, гидрастинина и канадина, по Эрбрингу и Вульффу, можно использовать их интенсивную флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. Гидрастин сначала не флуоресцирует, но спустя некоторое время (24—48 час) проявляется в виде пятна с синей флуоресценцией. В коллидине, насыщенном водой, берберин и гидрастинин имеют одинаковое значение  $R_f$  (0,47), тогда как канадин и гидрастин перемещаются с фронтом растворителя. В 94%-ном этаноле можно отделить гидрастин ( $R_f$  0,87) от гидрастинина ( $R_f$  0,76) и берберина, дающего продолговатое пятно от линии старта; канадин перемещается между гидрастином и гидрастинином.

### ГРУППА ПРОТОБЕРБЕРИНА

По Славику и Славиковой [2], для обнаружения этих веществ наряду с реактивом Драгендорфа (*Д 144*) можно использовать их флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. В системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 3) эти алкалоиды имеют следующие значения  $R_f$ :

Берберин	0,62
Коптизин	0,46
Тетрагидроберберин	0,80
Тетрагидрокоптизин	0,79

АЛКАЛОИДЫ ЧИСТОТЕЛА (*CHELIDONIUM*) И ДРУГИХ МАКОВЫХ

Все эти вещества флуоресцируют в ультрафиолетовом свете (Славик, Славикова [1, 2]). В системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 3) были найдены следующие значения  $R_f$ :

Хелирубин	0,53
Сангвинарин	0,43
Макарпин	0,49
Хелеритрин	0,55
Хелилутин	0,65

ФЕАНТИН, *о,о'*-ДИМЕТИЛКУРИН, *о,о'*-ДИМЕТИЛИЗОХОНДРОДЕНДРИН

Для проявления этих алкалоидов Кидд и Уокер наряду с реактивом Драгендорфа (*D 144*) применяли также реактив Фолина — Дениса (*D 56*). Для разделения наиболее удобными оказались системы Мюнье при использовании бумаги, пропитанной кислым фосфатом калия, и щелочной подвижной фазы.

## Производные индола

## КАРБОЛИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

К группе карболиновых алкалоидов относятся обладающие гипотензивным действием вещества типа резерпина, некоторые алкалоиды, сопровождающие его в растении, и группа иохимбина.

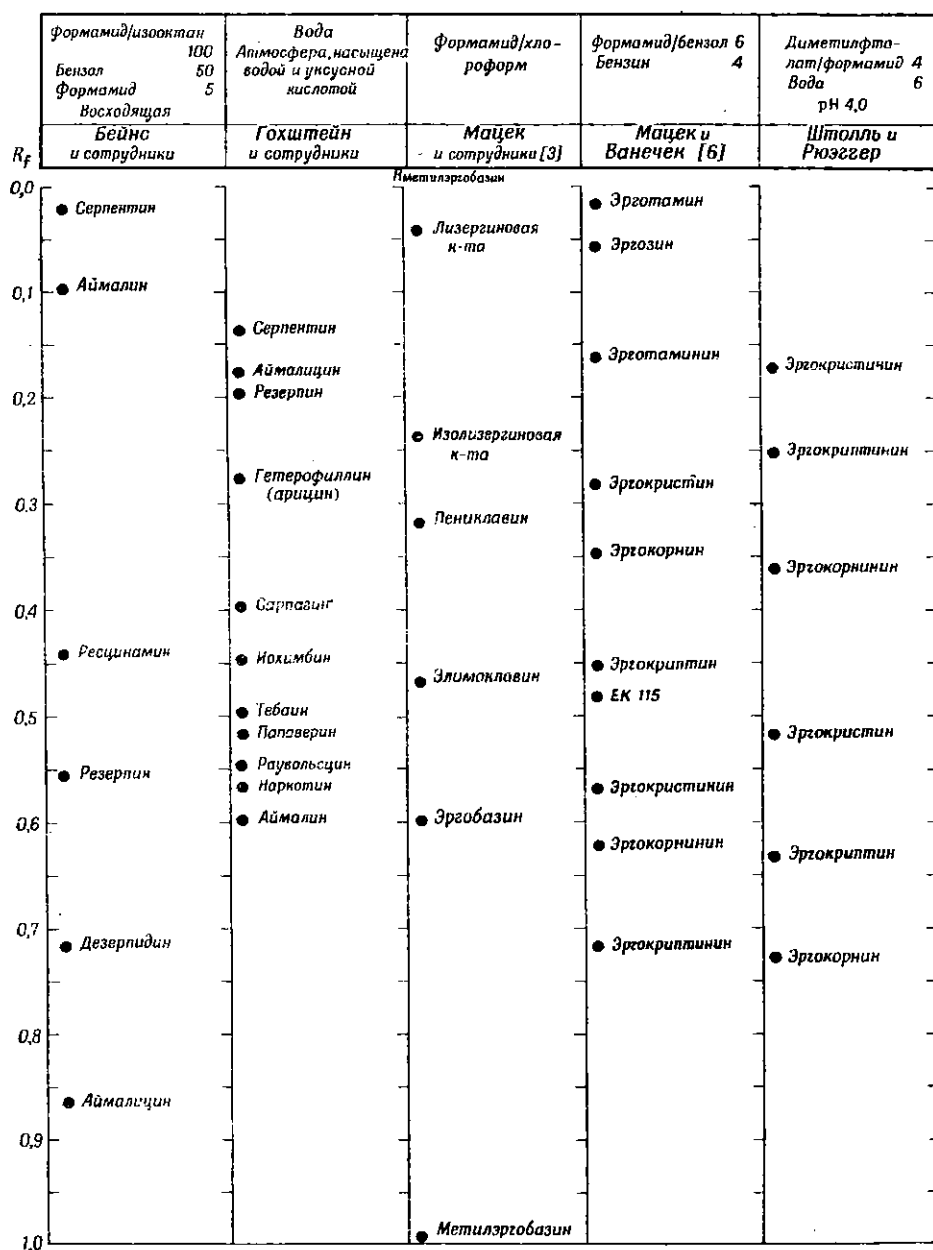
## Обнаружение

Для обнаружения пользуются преимущественно флуоресценцией этих веществ в ультрафиолетовом свете. Поскольку, однако, флуоресценция некоторых алкалоидов слаба, ее необходимо усиливать, лучше всего нагреванием до 90° в течение 1 час (Гохштейн и сотрудники). Резерпин, ресцип-амин и аймалицин флуоресцируют зеленым цветом, десерпидин — несколько более слабым сине-зеленым, серпентин дает интенсивно синее пятно и аймалин — синее пятно несколько меньшей интенсивности, которое нередко проявляется в ультрафиолетовом свете лишь на следующий день. Флуоресценцию десерпицина можно усилить действием паров HCl (Бейнс и сотрудники). Вопросами проявления этой группы алкалоидов особенно занимались Боскотт и Кар; эти авторы изучали флуоресценцию после опрыскивания нитропруссидом натрия (*D 147*) и после нанесения на хроматограмму серной кислоты (*D 148*). При такой модификации удастся открыть алкалоиды даже в количествах около 1  $\mu$ г.

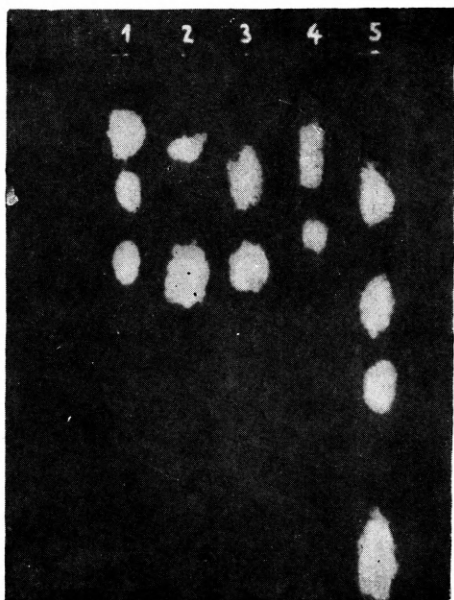
## Системы растворителей

Наиболее приемлемы системы растворителей с формамидом (Гохштейн и сотрудники; Бейнс и сотрудники) или пропиленгликолем (Мак-Муллен и сотрудники) в качестве неподвижной фазы. Для разделения на бумаге, пропитанной формамидом, можно пользоваться системами изоктан — бензол — формамид, (100 : 50 : 5) или бензол — хлороформ (1 : 1).

Таблица 97

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  КАРБОЛИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ И АЛКАЛОИДОВ СПОРЫНЬИ

Хорошего разделения некоторых алкалоидов удается, однако, добиться и с помощью водных растворов: Боскотт и Кар применяли для разделения 5%-ный раствор ацетата натрия, содержащий 10% уксусной кислоты и *n*-бутиловый эфир до насыщения водной фазы. Гохштейн и сотрудники получили очень хорошее разделение при использовании воды, создав

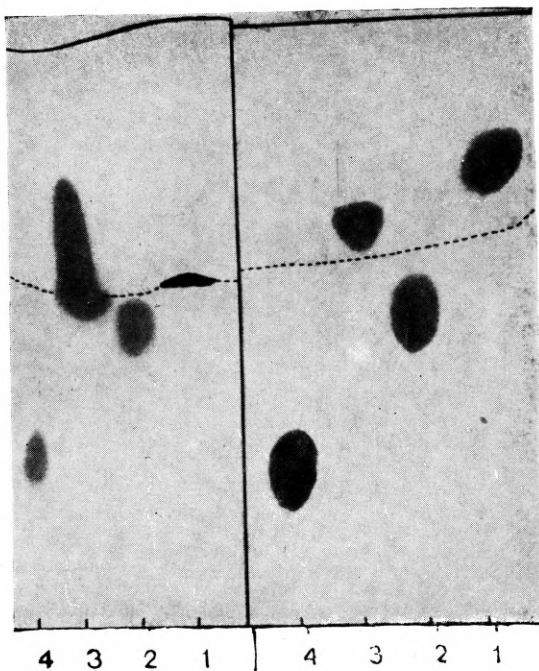


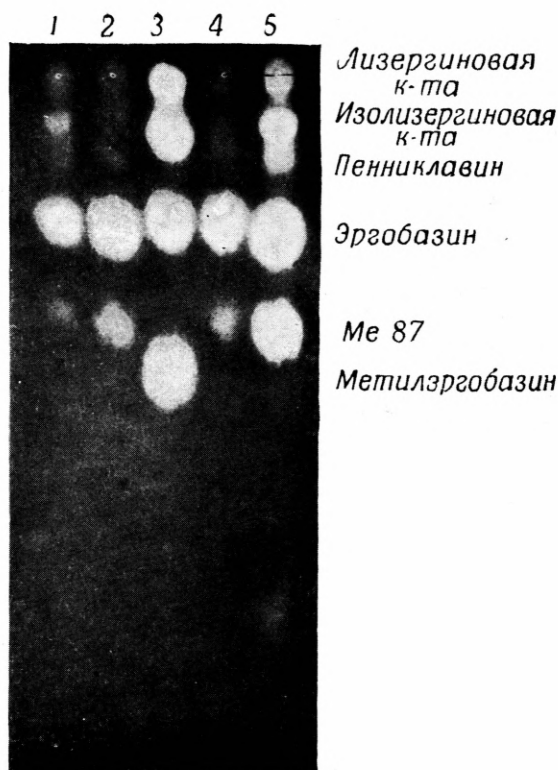
Р и с. 202. Обнаружение пиримидиновых и пиримидиновых производных фотокопированием в ультрафиолетовом свете (Маркгам и Смит).

Растворитель: *n*-бутанол, насыщенный водой — 10%-ная муравьиная кислота (9 : 1). Расположение пятен сверху вниз: 1 — мочевая кислота, 6,8-диоксипуриин, гипоксантин; 2 — гуанин, аденин; 3 — аденозин, аденин; 4 — цитидин, цитозин; 5 — ксантин, 3-метилксантин, 3,7-диметилксантин (теобромин), 1,3,7-триметилксантин (кофеин). Вместо специальных кювет можно применять круглодонные колбы из плавленого кварца.

Р и с. 211. Влияние пропитки бумаги на разделение алкалоидов (Мюнье и сотрудники).

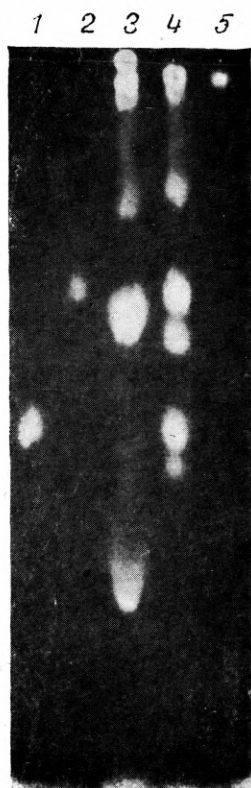
Система: *n*-бутанол — соляная кислота (100 : 2), насыщенная водой. Слева: без пропитки, справа — бумага пропитана 0,5 М раствором KCl. 1 — атропин; 2 — скополамин; 3 — гоматропин; 4 — тропин.





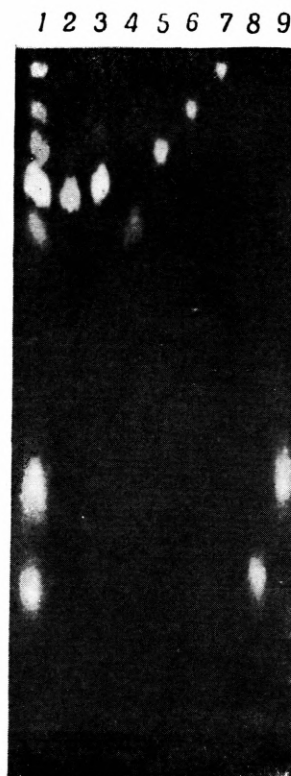
Р и с. 214. Хроматограмма алкалоидов спорыньи, растворимых в воде, из одного склеротия (Мацек и Ванечек).

Система: формамид/хлороформ, с перетеканием. Обнаружение в ультрафиолетовом свете. 1, 2, 4, 5 — склеротий спорыньи эрготоксинового типа; 3 — стандартная смесь лизергиновой и изолизергиновой кислот, эргобазина и метилэргобазина (сверху вниз). Ме 87 см. ME 87 в перечне сокращений.



Р и с. 215. Хроматограмма алкалоидов эрготаминовой и эрготоксиновой групп (Мацек и Ванечек).

Система: формамид/бензол — циклогексан (1 : 1). Обнаружение в ультрафиолетовом свете; 1 — эргокриптин; 2 — эргокрестин; 3 — алкалоиды из одного склеротия смешанного типа; 4 — смесь эрготаминина, эргозина, эрготаминина, эргокрестина, эргокорина, эргокриптина и алкалоида ЕК 115; 5 — эрготамин.

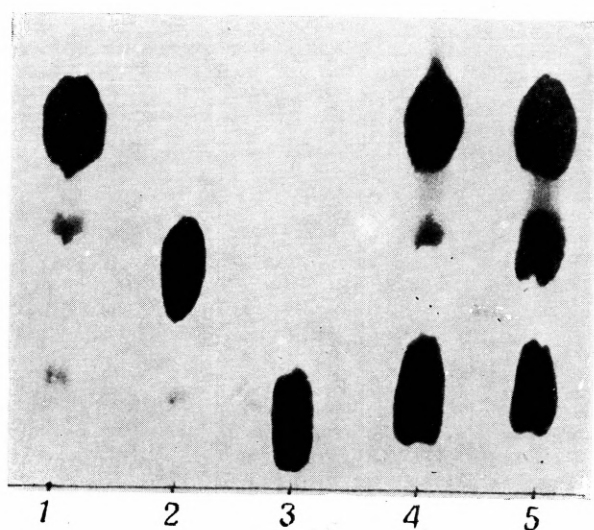


Р и с. 219. Хроматографическое разделение антрахинон-сульфокислот.

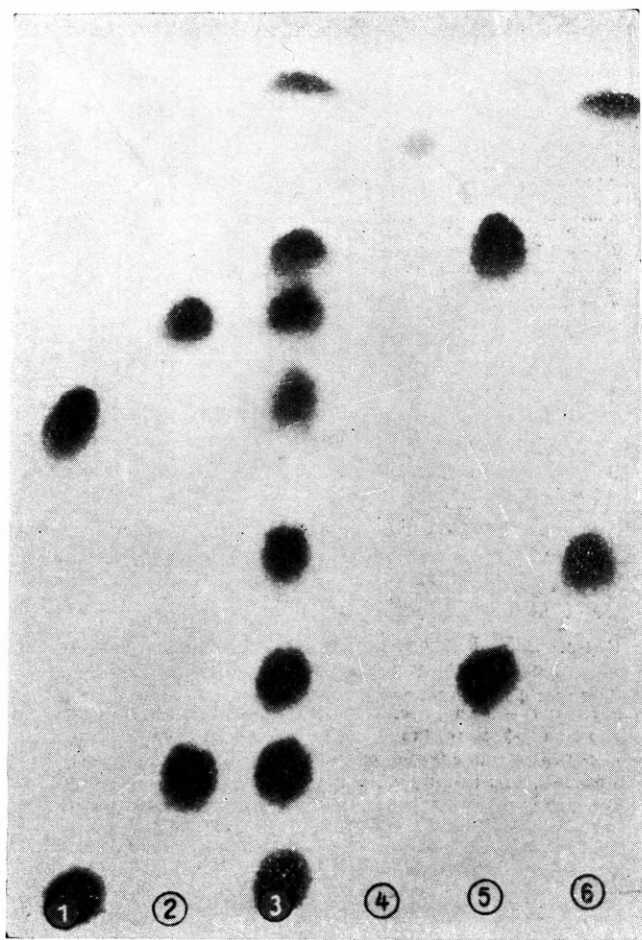
Система: *n*-бутанол — аммиак — вода (2 : 1 : 1). Обнаружение по флуоресценции в ультрафиолетовом свете. Натриевые соли антрахинонсульфокислот: 2 — 2,7-; 3 — 2,6-; 4 — 1,8-; 5 — 1,7- (калиевая соль); 6 — 1,6- (калиевая соль); 7 — 1,5-. Соли антрахинонсульфокислот: 8 — 2-; 9 — 1-. 1 — смесь кислот с 2 по 9.

### Поправка

В подписи к рис. 229 по техническому недосмотру напечатан лишний текст, начиная со слов: «Система: хлороформ...»  
Зак. 252

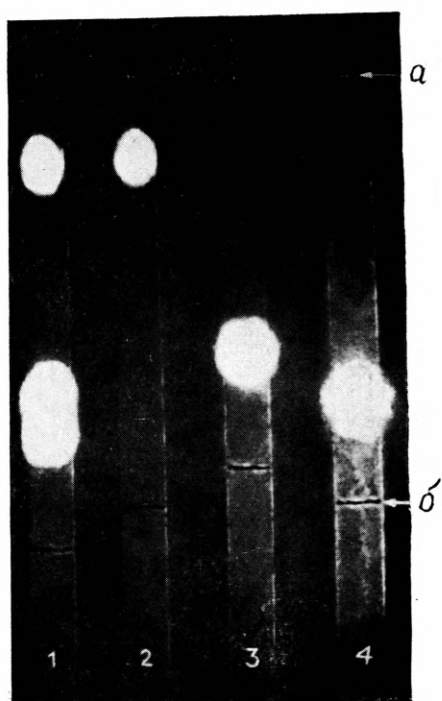


Р и с. 222. Проявление нафталин-сульфокислот путем нагревания хроматограммы до 200°. Система: *n*-пропанол — аммиак (2 : 1).



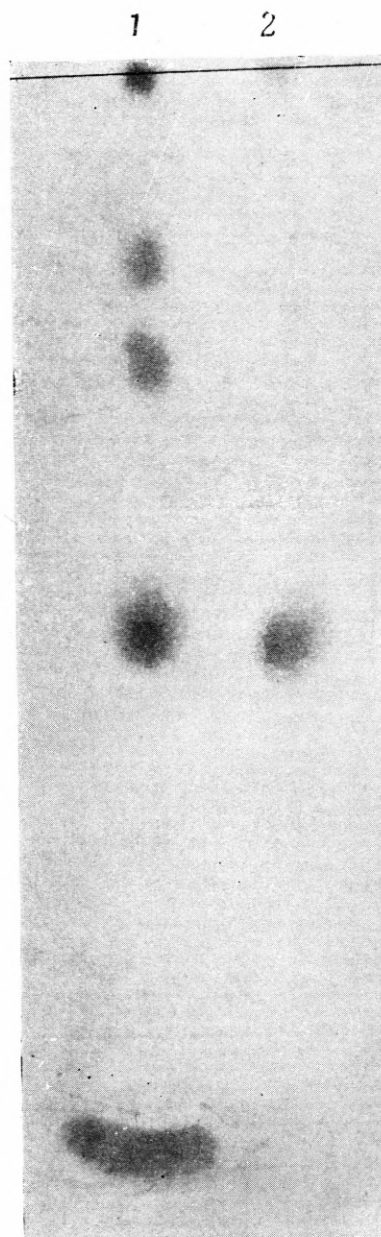
Р и с. 225. Разделение *N*-замещенных тиомочевины (Кьер и Рубинштейн).

Система: хлороформ—вода. Для проявления использовали реактив Гроте (Д11). 1—метил- и  $\beta$ -металлил-; 2—этил- и  $\alpha$ -металлил-; 3— смесь метил-, этил-, аллил-, изопропил-,  $\beta$ -металлил-,  $\alpha$ -металлил-, *n*-бутил-,  $\beta$ -фенилэтил-, 4—фенил-; 5—аллил- и *n*-бутил-; 6—изопропил- и  $\beta$ -фенилэтил-.



Р и с. 229. Хроматография и биотест-  
графия витаминов группы В<sub>6</sub> (Уинстен).

*a* — линия старта; *б* — линия фронта.  
Обнаружение с помощью *Saccharomyces carlsbergensis* 4228. 2 — пиридоксамин; 3 — пиридоксаль; 4 — пиридоксол; 1 — смесь этих соединений. Система: хлороформ — вода. Для проявления использовали реактив Гроте (Д11). 1 — метил-, и  $\beta$ -металлил-; 2 — этил- и  $\alpha$ -металлил-; 3 — смесь метил-, этил-, аллил-, изопропил-,  $\beta$ -металлил- $\alpha$ -металлил-, *n*-бутил-,  $\beta$ -фенилэтил-; 4 — фенил-; 5 — аллил- и *n*-бутил-; 6 — изопропил- и  $\beta$ -фенилэтил-.



Р и с. 235. Разделение продуктов термической  
изомеризации паратиона (Батора).

Система: формамид/петролейный эфир. 2 — S-этилпаратион. 1 — *n*-нитрофенол ( $R_f$  0,0); O-этилO, O-ди-(*n*-нитрофенил)-фосфат (дипараоксон) ( $R_f$  0,17); O, O-диэтил-O-(*n*-нитрофенил)-фосфат (параоксон) ( $R_f$  0,25); S-этил-O, O-ди-(*n*-нитрофенил)-тиофосфат ( $R_f$  0,36); O, S-диэтил-O-(*n*-нитрофенил)-тиофосфат (S-этилпаратион) ( $R_f$  0,50); неидентифицированное вещество с  $R_f$  0,68; O-этил-O, O-ди-(*n*-нитрофенил)-тиофосфат (дипаратион) ( $R_f$  0,85); O, O-диэтил-O-(*n*-нитрофенил)-тиофосфат (паратион) ( $R_f$  0,95).

атмосферу, насыщенную парами уксусной кислоты и воды. Значения  $R_f$  в некоторых из этих систем приведены в табл. 97.

Для разделения коринантина, коринантеина, коринантеидина, коринантидина и иохимбина Мюнье [1] применял смесь *n*-бутанола с 4%-ной соляной кислотой, насыщенную водой. Однако в этой системе иохимбин и коринантидин не разделяются, а отделение коринантеина от коринантеидина протекает неполностью.

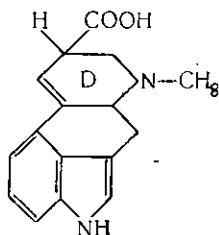
### Количественное определение

По данным Мак Муллена и сотрудников карболиновые алкалоиды можно экстрагировать из бумаги, пропитанной формамидом или пропиленгликолем, непосредственно на холоду с помощью хлороформа и вытяжку анализировать спектрофотометрически. В таком случае алкалоиды удобнее наносить на бумагу в токе азота.

### АЛКАЛОИДЫ СПОРЫНЬИ

#### Проявление

Алкалоиды спорыньи удобнее всего открывать по их интенсивно синей флуоресценции в ультрафиолетовом свете. Для этого необходимо сохранение основного скелета лизергиновой кислоты



Карбоксил может быть заменен карбамидной или оксиметильной группой. По-видимому, для возникновения интенсивно синей флуоресценции необходимо наличие кислорода в углеродсодержащем заместителе, так как, например, агроклавин, в котором карбоксил заменен метилом, не флуоресцирует (в сравнении с лизергиновой кислотой в его молекуле смещена двойная связь в цикле *D*). Далее, на флуоресценцию существенное влияние оказывает наличие двойной связи в цикле *D*: в случае ее смещения от  $C_{(9-10)}$  к  $C_{(8-9)}$  (элимоклавин) интенсивность флуоресценции существенно понижается, а при гидрировании двойной связи исчезает полностью. Чувствительность флуоресцентного способа для алкалоидов спорыньи составляет около 0,5 мкг. При применении бумаги, пропитанной формамидом, чувствительность повышается, так что становится возможным обнаруживать до 0,1 мкг алкалоидов.

Алкалоиды спорыньи можно также проявлять *n*-диметиламинобензальдегидом в сильно кислой среде (*D 1026*), по Штоллу и Рюэггеру, Мацеку [1], Паулю и сотрудникам или Тужону и Ваштагу [1]. Этой реакцией пользуются преимущественно для проявления нефлуоресцирующих алкалоидов и в качестве вспомогательного средства для идентификации алкалоидов спорыньи. Синее окрашивание специфично для группы алкалоидов спорыньи, которые можно обнаружить в количествах от 2 мкг. Из прочих

реактивов Берг [1] применял нингидрин, Пауль и сотрудники — коричневый альдегид в солянокислой среде; можно также применять реактив Драгендорфа. Однако чувствительность всех этих реактивов значительно ниже чувствительности флуоресцентного метода.

### Системы растворителей

Хроматографическое разделение обычных растворимых в воде алкалоидов не представляет затруднений. Для разделения эргобазина и эргобазинина Фостер и сотрудники применяли систему *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5), а для разделения лизергиновой и изолизергиновой кислот Джонс пользовался системой *n*-бутанол — пиридин — вода (4 : 1 : 5). В этих же системах Танака и Сугава [1], а также Абэ и сотрудники разделяли некоторые из вновь открытых алкалоидов (агроклавин, элимоклавин, алкалоиды «X» и «Y»). Однако для этих алкалоидов значительно удобнее системы с формамидом в качестве неподвижной и хлороформом в качестве подвижной фазы (Мацек и сотрудники [5]). С помощью этих систем удалось разделить не только все природные растворимые в воде алкалоиды, но и ряд изомерных оксибутиламидов лизергиновых и изолизергиновых кислот. Однако добиться разделения их оптических антиподов не удалось даже при применении оптически активных систем растворителей.

Несколько сложнее разделение нерастворимых в воде алкалоидов, особенно алкалоидов группы эрготоксина, отличающихся особым сходством строения. Бриндл и сотрудники исследовали их разделение на бумагах, пропитанных буферными растворами с различными значениями  $pH$ ; при этом, однако, алкалоиды давали растянутые пятна и плохо отделялись друг от друга. В других типах систем с водой в качестве неподвижной фазы алкалоиды группы эрготоксина также не удавалось разделить. Тужон и Ваштаг [2] пользовались, например, системой толуол — петролейный эфир — метанол, в которой отделялись лизергиновая кислота, эргобазин, эрготамин и эргозин, но алкалоиды группы эрготоксина (правовращающие) перемещались в виде одного пятна. Несколько более успешным оказался метод с бумагами, обработанными буферным раствором, в модификации Берга [2, 3], который круговой хроматографией впервые разделил алкалоиды группы эрготоксина.

Тайлер и Швартинг [2] для разделения пользовались обращенными фазами: бумагу пропитывали силиконом и проводили разделение в атмосфере бутапола нижним слоем системы *n*-бутанол — водная уксусная кислота или буфер с  $pH$  3,5. Однако им не удалось добиться разделения алкалоидов группы эрготоксина. Штолль и Рюэггер пропитывали бумагу диметилфталатом и хроматографировали в смеси формамида и воды, устанавливая  $pH$  при помощи муравьиной кислоты ( $pH$  122). Этим способом они разделили алкалоиды группы эрготоксина, эрготамин и гидрированные алкалоиды.

Наибольшее распространение, однако, получил третий тип систем — с формамидом в качестве неподвижной полярной органической фазы. На этот метод указали Тайлер и Швартинг [2]. Однако условия для разделения всех алкалоидов групп эрготоксина и эрготамин были разработаны только Мацеком и сотрудниками [2], а также Пемом и Фуксом [3]. В предложенных ими системах не разделялась только пара эргокорин — эргокринин. Для их разделения по Мацеку и Ванечек [6] наиболее пригодна смесь бензол — циклогексан (1 : 1) с использованием бумаги, пропитанной формамидом. Значения  $R_f$  приведены в табл. 97 (рис. 214 и 215).

### Идентификация после гидролиза

Алкалоиды спорыньи при кислотном гидролизе (II 90) дают аминокислоты, а при щелочном (II 123) — кетокислоты. Хроматографией на бумаге этих продуктов гидролиза долгое время приходилось пользоваться для идентификации алкалоидов групп эрготоксина или эрготамина (Фостер и сотрудники), поскольку прямое определение было невозможным. Кош-тирж и сотрудники, а также Танака и Сугава [2] относили алкалоиды к определенной группе (эрготоксина или эрготамина) по характеру выделенных кетокислот.

В настоящее время эти методы для анализа известных алкалоидов уже не применяются. Они, однако, сохраняют определенное значение для характеристики и идентификации новых алкалоидов. В качестве примера можно упомянуть обнаружение пептидных алкалоидов эргогексина и эргогептина Пемом [1] или алкалоида ЕК 115 Мацеком и сотрудниками [4].

### Количественное определение

Для полуколичественного определения, особенно в случае незначительных количеств алкалоидов, наиболее удобна оценка на основании размеров и интенсивности пятен. При использовании систем растворителей с водой в качестве неподвижной фазы применение этого метода ограничено сравнительно большой погрешностью ( $\pm 20\%$ ) (Фостер и сотрудники). При применении формамидных систем, когда образуются четкие пятна, точность метода при оценке количеств от 2 до 20  $\mu\text{г}$  составила примерно  $\pm 10\%$ .

Пем и Фукс [2] для количественного определения разработали весьма остроумный способ, при котором флуоресцирующие пятна вырезают из хроматограммы и обрабатывают в пробирке раствором *n*-диметиламинобензальдегида в серной кислоте, разбавленной таким количеством воды, чтобы бумага распадалась на отдельные волокна, но еще не подвергалась обугливанию (II 124). Одновременно происходят и цветная реакция, и элюирование красителя из волокон целлюлозы. Раствор, окрашенный в синий цвет, фильтруют и фотометрируют. Точность определения равна точности фотометрического метода ( $\pm 4\%$ ).

Попытка Карлесса [1] определять алкалоиды после разделения на забуференной целлюлозной колонке оказалась менее успешной, так как алкалоиды частично необратимо адсорбируются на бумаге. Максимально адсорбируется эрготамин (до 20%).

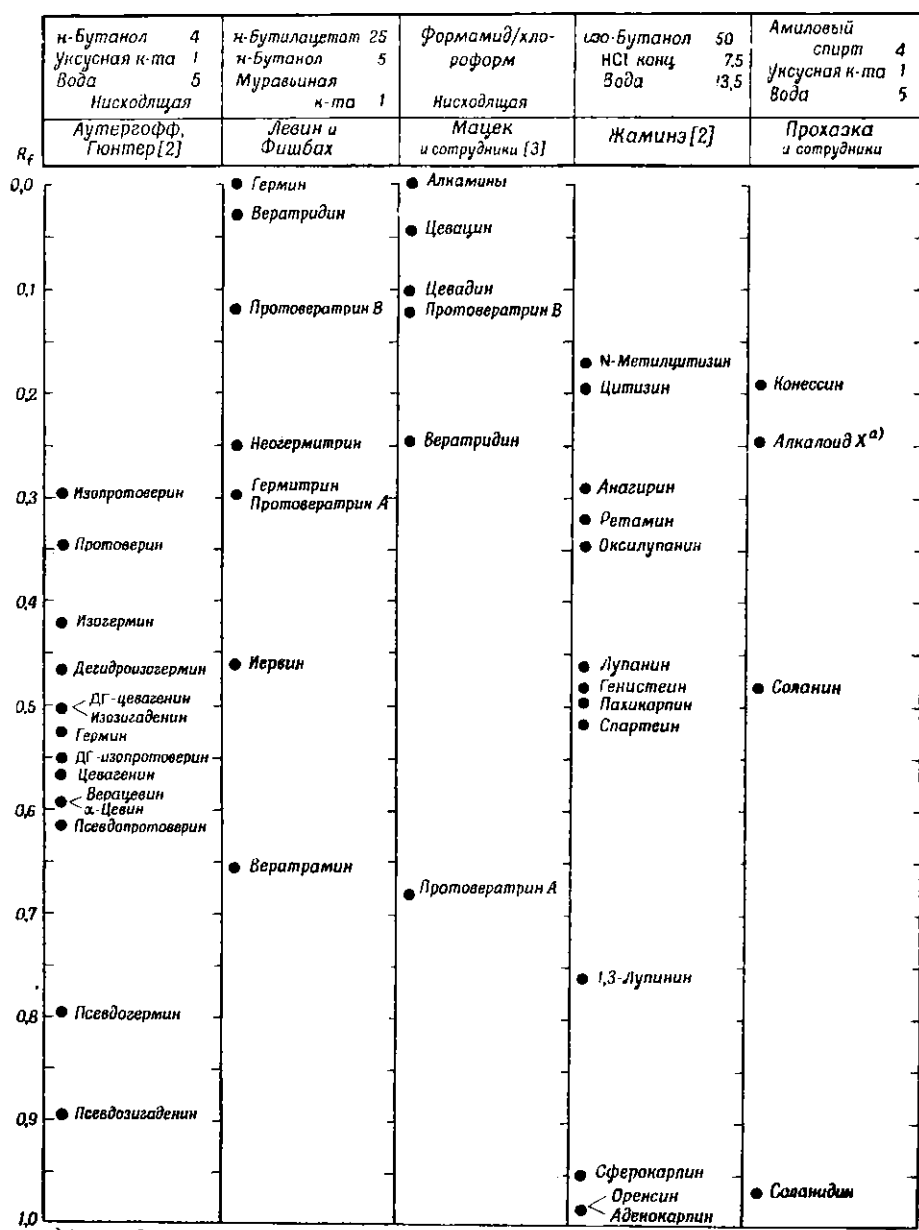
## Прочие группы алкалоидов

### ВЕРАТРОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Для этой группы алкалоидов хроматографию на бумаге впервые применили Пирчо и Гейлинг при изучении метаболизма меченых алкалоидов из *Veratrum viride*. Систематическое изучение зависимости между строением и хроматографическим поведением алкалоидов сабадиллы и некоторых их структурных аналогов позволило Мацеку и Вейделеку [9] применить хроматографию на бумаге для решения вопросов строения. Один из методов был основан на использовании аддитивности влияния отдельных функциональных групп при хроматографическом поведении: этерификация

Таблица 98

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ВЕРАТРОВЫХ, ЛУПИНОВЫХ И СТЕРОИДНЫХ АЛКАЛОИДОВ



свободных гидроксильных групп в молекуле алкаминов повышала хромотографическую подвижность в зависимости от характера вводимого ацила и от положения ацилируемой гидроксильной группы (см. табл. 95). Вторым методом состоял в образовании боратных комплексов со свободными

$\alpha$ -гликольными группировками в молекуле алкаминол. У алкаминол цевина и верацевина в молекуле присутствуют, например, три  $\alpha$ -гликолевые группировки, склонные к образованию трех боратных комплексов. Постепенным этерифицированием можно нарушить отдельные гликолевые системы. Если, следовательно, хроматографировать какой-либо алкалоид параллельно на двух полосках бумаги, одна из которых пропитана борной кислотой, то наличие одной свободной гликолевой группировки будет проявляться в снижении значения  $R_f$  на величину  $\Delta R_M$ . Наличие двух или трех свободных  $\alpha$ -гликолевых систем приведет к большему снижению  $R_f$  и, следовательно, к большему значению  $\Delta R_M$ . Из численного значения этого снижения можно определить, сколько свободных  $\alpha$ -гликолевых группировок присутствует в молекуле этерифицированного алкалоида (табл. 99).

Таблица 99

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА СВОБОДНЫХ  $\alpha$ -ГЛИКОЛЕВЫХ ГРУППИРОВОК  
В ВЕРАТРОВЫХ АЛКАЛОИДАХ  
(Мацек и Вейделек [9])

Алкалоид	Формамид/хлороформ				$\Delta R_M$	Число свободных гликолевых групп
	без пропитки		$H_3BO_3$			
	$R_f$	$R_M$	$R_f$	$R_M$		
3,4,16-Триацетилцевин- <i>D</i> -орто-ацетат <sup>a)</sup>	0,62	—0,2	0,59	—0,17	0,03	0
3,16-Диацетилцевагенин- <i>C</i> -орто-ацетат	0,62	—0,21	0,49	0,02	0,23	1
3-Вератроилверацевин	0,42	0,14	0,10	0,97	0,83	2
3,16-Диацетилцевин	0,14	0,78	0,03	1,6	0,82	2
3,14,16-Триацетилверацевин	0,82	—0,65	0,29	0,38	1,03	2

<sup>a)</sup> Для разделения применяли систему бензол — хлороформ (7 : 3).

Комбинацию этого способа с расчетом  $R_f$  на основании аддитивности влияния функциональных групп с учетом поправок на положение эфирных групп можно с успехом использовать для решения структурных вопросов, особенно в ряду вератровых алкалоидов (частично синтетических).

### Обнаружение

По Нэшу и Брукеру, более чувствительным, нежели проявление реактивом Драгендорфа (*D 144*), является проявление концентрированной серной кислотой (*D 1*), с которой вератровые алкалоиды и лежащие в их основе алкамины дают фиолетовое или желто-зеленое окрашивание; в ультрафиолетовом свете эти пятна обнаруживают синюю, розовую или желтую флуоресценцию. Чувствительность метода составляет около 1  $\mu$ г (Мацек и сотрудники [8]). Аутергофф [1] указывает, что алкалоиды из сабадиллы после разделения в системе фенол — вода флуоресцируют в ультрафиолетовом свете. Левин и Фишбах для проявления вератровых алкалоидов рекомендуют опрыскивание бромфеноловым синим с последующей выдержкой во влажной атмосфере. Аутергофф и Гюнтер [2] этот обычный способ проявления дополнили реакцией с хлористым трифенилтетразолием (*D 5*), с которым цевагенин, изогермин, изопротоверин и изогигаденин реаги-

руют с образованием окрашенных в красный цвет формазанов, а также реакцией с хлорным железом (Д 53), с помощью которой можно проявлять дегидрогенизированные алкалоиды (образование фенольных гидроксильных групп). Подобные алкалоиды можно также идентифицировать после элюирования из бумаги на основании их ультрафиолетовых спектров (Аутергофф и Шварц [3]), либо спектрофотометрировать непосредственно на бумаге (Мацек и сотрудники [3]).

### Системы растворителей

Для разделения алкаминол по Нэшу и Брукеру наиболее удобна система *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5), по Мацеку с сотрудниками [3] — метанол — 5%-ный аммиак — бензол (1 : 1 : 2, II 10). Для разделения эфиров алкалоидов из *Veratrum album* Нэш и Брукер рекомендовали этиленхлорид с водой и уксусной кислотой (49,5 : 49,5 : 1), для разделения алкалоидов из *Schoenocaulon officinale* и частично синтетических сложных эфиров цевина, верацефина и цевагенина хорошо зарекомендовали себя системы формамид/хлороформ или смесь бензол—хлороформ (Мацек и сотрудники [7, 8]). Значения  $R_f$  некоторых алкалоидов приведены в табл. 98.

### Количественное определение

Мацек и сотрудники [7] для определения малых количеств алкаминол в вератрине пользовались простейшим способом анализа на основании размеров и интенсивности пятен после реакции с серной кислотой. Грант и Кеннеди извлекали алкалоиды из бумаги и определяли их колориметрически после реакции с серной кислотой. Мацек и сотрудники [7] анализировали сложные эфиры алкалоидов вератрина колориметрическим путем с *n*-диметиламинобензальдегидом в серной кислоте. Оба эти метода с применением концентрированной серной кислоты недостаточно надежны и точность определения не слишком велика.

### ЛУПИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Помимо обычных способов проявления алкалоидов, для алкалоидов лупина можно пользоваться флуоресценцией некоторых из них в ультрафиолетовом свете (Жаминэ [2]), а для цитизина, N-метилцитизина и анагирина — реакцией с хлорным железом (Пем и Галиновский [4]).

Из обычных систем для разделения большего числа алкалоидов Жаминэ [2] рекомендовал систему изобутанол—уксусная кислота—вода (50 : 7,5 : 13,5) или *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5). Для разделения спартеина и генистеина по Мюнье [1] наиболее удобны бумага, пропитанная 0,5 *M* раствором кислого цитрата натрия, и система 2-бутанол, насыщенный водой; в этих условиях значение  $R_f$  спартеина составляет 0,18, а генистеина — 0,35. Пем и Галиновский [4] для лучшего отделения цитизина от N-метилцитизина и анагирина рекомендовали основную систему метилизобутилкетон—пиридин—вода (2 : 1 : 2); цитизин имел  $R_f$  0,08, N-метилцитизин — 0,31 и анагирин — 0,45. Оттаи и Окуда в системе *n*-бутанол—этанол—0,5 н. уксусная кислота (6 : 2 : 3) разделили дегидро- $\alpha$ -матридины: дегидро- $\alpha$ -матридин имел  $R_f$  0,67, гомодегидро- $\alpha$ -матридин — 0,72 и нордегидро- $\alpha$ -матридин — 0,60. Значения  $R_f$  некоторых других алкалоидов приведены в табл. 98.

АЛКАЛОИДЫ ЧЕЛИБУХИ (*STRYCHNOS*)

Разделение стрихнина и бруцина не представляет затруднений; для хроматографирования можно использовать какую-либо из систем, предложенных Мюнье и сотрудниками [6, 7], на бумаге, пропитанной солями. Гриффон и Романо для разделения оксистрихнина, метилстрихнина, стрихнина, тетрагидрострихнина, стрихнидина и бруцина применяли двумерную хроматографию: в первом направлении они пользовались системой ацетон — диэтиламин — вода (15 : 1 : 4), в которой, однако, не разделяются пары стрихнидин—тетрагидрострихнин и стрихнин—бруцин; в поперечном направлении применяли систему соляная кислота — *n*-бутанол—10%-ный раствор желтой кровяной соли—глицерин—уксусная кислота (30 : 200 : 50 : 5 : 5); присутствующий ферроцианид в кислой среде со стрихнином, оксистрихнином, тетрагидрострихнином и стрихнидином образует нерастворимые осадки, остающиеся на линии старта. Затем от них легко отделяют бруцин. Перед проявлением реактивом Драгендорфа (*Д 144*) необходимо разрушить связь с ферроцианидом, подвергая хроматограмму действию паров диэтиламина. Жаминэ [1] разделяет бруцин, дигидробруцин, стрихнин и ретулин в системе изобутанол—соляная кислота—вода (50 : 7,5 : 13,5). Для разделения вомицина, гольстина и ретулина удобным оказался 5%-ный водный аммиак.

## ПИЛОКАРПИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Для отделения пилокарпина или изопилокарпина от пилозина Мюнье и сотрудники [7] рекомендовали бумагу, пропитанную 0,5 *M* раствором хлористого калия, и систему *n*-бутанол—соляная кислота (100 : 2, вода до насыщения). В этой системе пилокарпин имел  $R_f$  0,44, изопилокарпин—0,47 и пилозин—0,55.

## АЛКАЛОИДЫ ПЛАУНОВ

Берто и Штолль для разделения аннотина, акрифолина и аннотинина предложили *n*-бутанол, насыщенный водой; хроматографирование проводили в атмосфере HCN. Аннотин имел  $R_f$  0,35, акрифолин—0,44 и аннотинин 0,60.

## СТЕРОИДНЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Помимо реактива Драгендорфа (*Д 144*), для проявления конессина, конессимина, конессидина, конимина и голаррессимина Чеше и Петерсен рекомендовали реактив Майера (*Д 149*), чувствительный даже к 5—10  $\mu$ г алкалоидов. Для хроматографирования оказалась удобной система *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5), в которой, однако, не разделяются конессин, конессимин и голаррессимин.

Для разделения алкалоидных гликозидов соласонина и соламаргина Кун и Лёв пользовались системой этилацетат—уксусная кислота—вода (3 : 1 : 3), прибавляя к верхней фазе 15% этанола. Алкалоиды проявляли фосфорномолибденовой кислотой (*Д 22*). Конессин, соланин и соланидин разделяли также Прохазка и сотрудники (см. табл. 98).

## ГРУППА ЛАППАКОНИТИНА

В системе *n*-бутанол—уксусная кислота — вода (10 : 1 : 4) можно отделить лаппаконин от лаппаконитина и пикролаппаконитина (Дайбинг и сотрудники). Лаппаконитин, однако, нельзя отделить от пикролаппаконитина даже при применении систем основного характера. Различить их удается по флуоресценции пикролаппаконитина в ультрафиолетовом свете или с помощью реакции диазотирования; лаппаконитин этой реакции не дает.

*Систематический анализ*

Во всех упоминаемых до сих пор работах рассматривалось разделение и идентификация узких групп большей частью структурно близких алкалоидов, которые встречаются в определенных видах растений. Во многих случаях, однако, необходимо иметь метод, который позволил бы анализировать и неизвестную смесь алкалоидов. Для таких случаев Маецк и сотрудники [3] попытались разработать систематический ход анализа, позволяющий по поведению алкалоидов в какой-либо определенной системе разделить их на несколько групп. В пределах этих групп идентификацию производили на основании значений  $R_f$  в дополнительных системах с учетом результатов ряда специфических реакций проявления и в отдельных случаях — измерения ультрафиолетовых спектров непосредственно на бумаге. Способ этот был разработан для 65 алкалоидов. Иной путь избрали Гольдбаум и Казьяк, которые предложили ход анализа для идентификации 44 алкалоидов и других азотистых соединений на основании поведения их на бумаге при различных значениях pH; алкалоиды разделяли на 7 групп, в каждой из которых, однако, для точного анализа необходимо еще пользоваться дополнительными системами.

Маецк и сотрудники [3] предложили ход анализа, позволяющий обнаружить следующие алкалоиды:

Алкалоиды, не содержащие азота в гетероцикле: эфедрин, колхицин, демекольцин.

Производные пиридина: ареколин, конинин, лобелин, никотин, пиперин.

Алкалоиды, содержащие пирролидино-пиперидиновый цикл: атропин, эргонин, томатропин, кокаин, скополамин, спартеин.

Хинолиновые алкалоиды: хинин, прохинин.

Алкалоиды, содержащие изохинолиновый цикл: апоморфин, берберин, дигидрооксикодейнон, этилморфин, героин, гидрастин, гидрастинин, кодеин, котарнин, криптопин, наркотин, нарцеин, оксикодейнон, папаверин, тубокурарин, тебаин.

Производные индола: агроклавин, элимоклавин, эрогобазин, эргобазинин, эрготамин, эрготаминин, эргозин, эргокорнин, эргокорнинин, эргокрестин, эргокрестинин, эргокриптин, эргокриптинин, кислоты лизергиновую и изолизергиновую, пенниклавин, резерпин, винкамин, иохимбин.

Прочие алкалоиды: аконитин, бруцин, цевацин, цевин, цевадин, эметин, гермин, грамин, пилокарпин, протовератрин А, протовератрин В, стрихнин, верацевин, вератридин.

## Ход анализа

Анализируемый образец наносят на хроматографическую бумагу в двух точках; рядом на одну полоску помещают в качестве метчиков кодеин, нарцеин и диацетилморфин (героин). Затем бумагу пропитывают формамидом (II 9a) и проводят разделение хлороформом с добавкой 1 % уксусной кислоты. Полосу хроматограммы, содержащую метчики и один из анализируемых образцов, после высушивания опрыскивают реактивом Драгендорфа (Д 144). В зависимости от значений  $R_f$  пятен (иными словами, от их подвижности относительно взятых метчиков), дающих положительную реакцию с реактивом Драгендорфа, алкалоиды делят на 4 группы.

Группа I состоит из гидрофильных алкалоидов с значениями  $R_f$  от 0 до 0,2. Поскольку значения  $R_f$  в формамидных системах воспроизводятся не очень точно, сравнивают подвижность исследуемых алкалоидов с кодеином и относят в эту группу все алкалоиды, имеющие величину  $R_f$ , меньшую, чем кодеин (единственное исключение составляет протOVERATрин В, перемещающийся несколько быстрее).

В группу II входят алкалоиды с величинами  $R_f$  0,2—0,35, т. е. обладающие подвижностью, средней между кодеином и нарцеином.

Группу III образуют алкалоиды с величинами  $R_f$  0,35—0,80, т. е. имеющие  $R_f$  в интервале между значениями  $R_f$  нарцеина и героина.

Группу IV составляют алкалоиды со значениями  $R_f$  выше 0,80 и подвижностью, превышающей подвижность героина.

Вторую полоску хроматограммы просматривают в ультрафиолетовом свете. Если вещества обнаруживают синюю флуоресценцию, то опрыскивают раствором *n*-диметиламинобензальдегида (Д 102). Фиолетово-синее окрашивание указывает на присутствие алкалоидов спорыньи, которые выделяют в самостоятельную группу V и идентифицируют далее по их хроматографическому поведению.

Идентификацию алкалоидов в отдельных группах проводят в зависимости от числа и характера этих групп. Для большого числа алкалоидов первой группы необходимо дальнейшее разделение. При этом подвижности сравнивают с подвижностью скополамина ( $R_{ск.}$ ) на бумаге, пропитанной

Таблица 100

СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ХОД АНАЛИЗА АЛКАЛОИДОВ.  
РАЗДЕЛЕНИЕ ПО ГРУППАМ

Хроматограмма:	1				2
	$R_f$ 0—0,2	$R_f$ 0,2—0,3	$R_f$ 0,3—0,8	$R_f$ 0,8—1,0	УФ-свет <i>n</i> -ДМАБ син.
Группа	I	II	III	IV	V

формамидом, с хлороформом в качестве подвижной фазы, при перетекании. Полученные таким образом группы IA и IB разделяют далее по их хроматографическому поведению в системе бензол—метанол—5%-ный аммиак (2 : 1 : 1) в камере, насыщенной нижней фазой, на подгруппы IAA, IAB, IAC, соответственно IVA, IBV. Схемы идентификации алкалоидов в этих подгруппах и далее в группах II—IV показаны в табл. 102—107, схемы идентификации алкалоидов спорыньи — в табл. 97.

Таблица 101

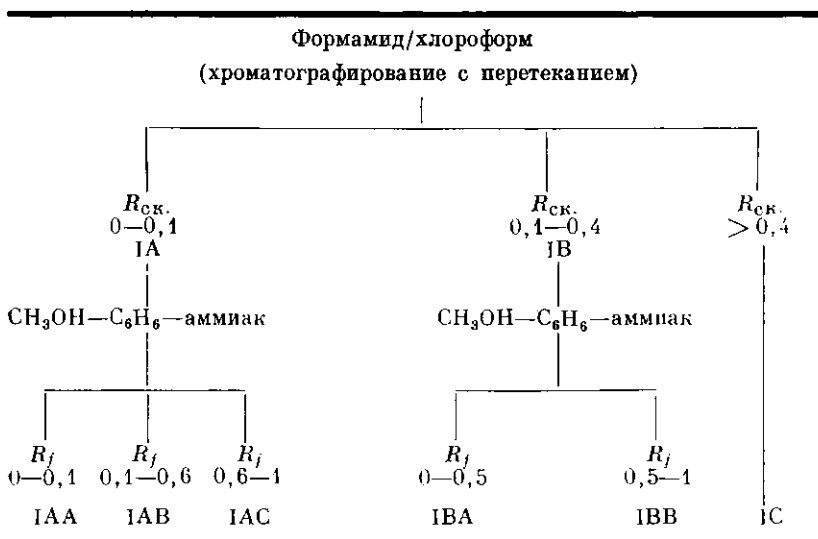
СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ХОД АНАЛИЗА АЛКАЛОИДОВ.  
РАЗДЕЛЕНИЕ ГРУППЫ I НА ПОДГРУППЫ

Таблица 102

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКАЛОИДОВ В ГРУППЕ IA

Алкалоиды	Системы растворителей			Проявление					Ультра- фиолето- вая спектро- графия
	уксусная кис- лота + форм- амид/хлороформ 15 час	метанол 5%-ный $\text{NH}_3$ 1 бензол	н-бутанол уксусная кис- лота вода	УФ	$\text{H}_2\text{SO}_4$ , Д 1	$\text{KMnO}_4$ , Д 3а	$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , Д 14б	прочие	
<b>IAA</b>	$R_{\text{ск.}}$								
экгонин . . . . .	0,0	0,0	0,13	—	—	—	—	—	345, 291, 260
тубокурарин . . . . .	0,0	0,0	0,22	—	—	ж.	кр. к.	—	0
гермин . . . . .	0,0а)	0,03	0,44	—	ф.	ж.	—	—	290, 249
морфин . . . . .	0,03а)	0,08	0,40	—	ф.	ж.	—	Д 51	357, 271
берберин . . . . .	0,06а)	0,10	0,52	ж.	ж. з.	—	кр. к.	—	
<b>IAB</b>									
верапедин . . . . .	0,0а)	0,22	0,54	—	ф.	ж.	—	—	
цевин . . . . .	0,05а)	0,43	0,60	—	ф.	ж.	—	—	240
<b>IAC</b>									
гидрастинин . . . . .	0,02	0,85	0,39	з.	—	—	—	—	294, 251
котарнин . . . . .	0,03	0,77	0,52	ж.	к.	з.	—	—	310, 250
эфедрин . . . . .	0,05	0,71	0,57	—	—	ж.	к.	Д 95а	258

а) Вещества можно разделить с перетеканием в течение 48 час.

Следует подчеркнуть, что для хроматографического разделения необходимо, чтобы разность значений  $R_f$  двух алкалоидов составляла по крайней мере 0,07; в противном случае пятна сливаются. Исключение составляют вещества с  $R_f$  0—0,3, которые удастся разделить, хроматографируя

Таблица 103

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКАЛОИДОВ В ГРУППЕ IV

Алкалоиды	Системы растворителей				Проявление				Ультра- фиолето- вая спектро- графия
	формамид + ук- сусная кис- лота/хлороформ 15 час	2 1 метанол 5%-ный $\text{NH}_3$ бензол	4 н-бутанол уксусная кис- лота 1 5 вода		$\text{H}_2\text{SO}_4$ , Д 1	$\text{KMnO}_4$ , Д 3a	$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , Д 14б	прочие	
IVA апоморфин . . .	$R_{\text{ск.}}$ 0,17	0,24	0,49	син.	ф.	ж.	ф.	Д 51	340, 316, 293, 258
IVB грамин . . . . .	0,11	0,84	0,58	—	к.	ж.	к.	—	282, 248,
гоматропин . . .	0,19	0,73	0,48	—	—	—	—	—	290, 250
спартеин . . . .	0,25	0,94	0,53	—	—	ж.	—	—	328, 295, 280, 265
Атропин . . . . .	0,27	0,75	0,51	—	—	—	—	—	257
Цевацин . . . . .	0,39	0,85	0,69	—	ф.	ж.	—	—	240

Таблица 104

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКАЛОИДОВ В ГРУППЕ IC

Алкалоиды	Системы растворителей				Проявление				Ультра- фиолето- вая спектро- графия
	формамид + ук- сусная кис- лота/хлороформ 15 час	2 1 метанол 5%-ный $\text{NH}_3$ бензол	4 н-бутанол уксусная кис- лота 1 5 вода		$\text{H}_2\text{SO}_4$ , Д 1	$\text{KMnO}_4$ , Д 3a	$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , Д 14б	прочие	
Конийн . . . . .	$R_{\text{ск.}}$ 0,40	0,00	0,66	—	—	—	—	Д 95a	349, 328, 300, 245
Иохимбин . . . .	0,78	0,79	0,66	з.	ф.	ж.	ф.	—	288
Цевадин . . . . .	0,94	0,92	0,78	—	ф.	ж.	—	—	347, 319, 297, 248
Скополамин . . .	1,00	0,68	0,42	—	—	—	—	—	0
Кодеин . . . . .	1,2	0,83	0,47	—	ф.	ж.	—	—	288, 251
Протовератрия В	1,4		0,74	—	—	ж.	—	—	

с перетеканием, а также алкалоиды, флуоресцирующие в ультрафиолетовом свете, поскольку их можно наносить в ничтожных количествах. В таких случаях удастся разделить и такие пары алкалоидов, значения  $R_f$  которых различаются на 0,04. Если эти условия не выполнены, алкалоиды приходится разделять на основании качественных реакций или ультрафиоле-

товых спектров поглощения. Сюда относятся главным образом такие пары алкалоидов, которые трудно разделить хроматографическим путем: эметин—этилморфин, дигидроокси Кодеинон—окси Кодеинон, никотин—кокаин, винкамин—протовератрин А, гидрастин—папаверин.

Если анализируемая смесь представляет собой очень пеструю смесь алкалоидов или содержит значительное количество одного алкалоида

Таблица 105

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКАЛОИДОВ В ГРУППЕ II

Алкалоиды	Системы растворителей				Проявление				Ультра-фиолетовая спектрография
	формамид + уксусная кислота/хлороформ	формамид/хлороформ	н-бутанол уксусная кислота/вода	УФ	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Д 1	KMnO <sub>4</sub> , Д 3a	Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , Д 146	прочие	
Эметин . . . . .	0,21	0,83	0,50	син.	—	ж.	—	—	340, 288, 247
Этилморфин . . .	0,22	0,67	0,55	—	ф.	ж.	—	—	288, 253
Вератридин . . .	0,24	0,36	0,84	—	ф.	ж.	—	—	294, 252
Дигидроокси Кодеинон . . . . .	0,25	0,78	0,35	—	—	ж.	—	Д 71	350, 283, 253
Лобелин . . . . .	0,26	0,63	0,79	—	—	ж.	—	—	300, 259
Окси Кодеинон . .	0,28	0,78	0,41	—	—	ж.	ф.	—	287, 251
Пилокарпин . . .	0,29	0,68	0,29	—	—	ж.	—	—	320, 294, 241
Нарцеин . . . . .	0,30	0,33	0,63	—	ж.	—	ф.	—	314, 250

Таблица 106

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКАЛОИДОВ В ГРУППЕ III

Алкалоиды	Системы растворителей				Проявление				Ультра-фиолетовая спектрография
	формамид + уксусная кислота/хлороформ	формамид/хлороформ	н-бутанол уксусная кислота/вода	УФ	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Д 1	KMnO <sub>4</sub> , Д 3a	Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , Д 146	прочие	
Никотин . . . . .	0,37	—	0,49	—	—	ж.	—	Д 152	363, 255
Прохинин . . . . .	0,44	0,20	0,78	ф.	—	ж.	ф.	—	291, 249, 261
Стрихнин . . . . .	0,48	0,77	0,61	—	—	ж.	ф.	—	320, 261
Хинин . . . . .	0,51	0,35	0,74	син.	—	ж.	—	—	280, 248
Кокаин . . . . .	0,52	0,94	0,63	—	—	ж.	ф.	—	283, 251
Тебаин . . . . .	0,65	0,94	0,63	—	ж.	ж.	—	—	0
Протовератрин А .	0,69	—	0,92	—	—	ж.	—	—	350, 297, 247
Аконитин . . . . .	0,70	—	0,76	—	—	ж.	син.	—	250, 296
Винкамин . . . . .	0,72	—	0,80	ж.	ф.	—	ж.	—	
Бруцин . . . . .	0,73	—	0,51	син.	—	ж.	о.	—	
Героин . . . . .	0,76	—	0,60	—	ф.	ж.	—	—	

наряду с ничтожным количеством другого, удобнее перед систематическим исследованием провести предварительное хроматографирование на хроматографическом картоне и после вырезания и элюирования пятен или полос подвергать полученные элюаты систематическому анализу, как описано выше.

Таблица 107

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКАЛОИДОВ В ГРУППЕ IV<sup>a)</sup>

Алкалоиды	Системы растворителей			Проявление					Ультра-фиолетовая спектро-графия
	формамид/бен- зол хлорформ	формамид/бен- зол	формамид/бен- зол бензин	УФ	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Д 1	KMnO <sub>4</sub> , Д 3a	Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , Д 146	прочие	
Демекольцин . . .	0,23	0,00	0,00	ж. к.	ж.	ж.	ж.	—	
Колхицин . . . .	0,59	0,00	0,00	ж.	ж.	—	ж.	—	
Резерпин . . . .	—	0,51	0,08	з.	ф.	ж.	—	—	266
Гидрастин . . . .	—	0,72	0,19	к.	—	ж.	ф.	—	291, 251
Папаверин . . . .	—	0,76	0,22	—	ф.	—	ф.	—	318, 292, 248
Криптопин . . . .	—	0,76	0,22	—	ф.	—	—	—	320, 253
Наркотин . . . .	—	0,91	0,50	з.	к.	ж.	ф.	—	320, 280, 246
Пиперин . . . .	—	0,96	0,80	—	к.	ж.	ж.	Д 152	351, 330, 280, 252

<sup>a)</sup> Разделение группы V (алкалоиды спорыньи) см. в табл. 97.

## ЛИТЕРАТУРА

- Abe M., Yamano T., Kozu Y., Kusumoto M., J. agr. chem. Soc. Japan, 29, 697 (1955).  
 Adank K., Bovet D., Ducke A., Marini-Bettolo G. B., Gazz. chim. Ital., 83, 966 (1953).  
 Asmis H., Bächli E., Schmid H., Karrer P., Helv. chim. Acta, 37, 1993 (1954).  
 Auterhoff H., Arch. Pharm., 286, 69 (1953). [1]  
 Auterhoff H., Günther F., Arch. Pharm., 288, 455 (1955). [2]  
 Auterhoff H., Schwartz F., Arch. Pharm., 288, 549 (1955). [3]  
 Banes D., Carol J., Wolff J., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., 44, 640 (1955).  
 Bayer I., Katona K., Acta pharm. hungar. 25, 198 (1955).  
 Berg A. M., Pharm. Weekbl., 87, 69 (1952). [1]  
 Berg A. M., Pharm. Weekbl., 87, 282 (1952). [2]  
 Berg A. M., диссертация, Utrecht (1953). [3]  
 Bertho A., Stoll Al., Chem. Ber., 85, 663 (1952).  
 Boscott R. J., Kar A. B., Nature, 176, 1077 (1955).  
 Bräuniger H., Borgwardt G., Pharmazie, 8, 909 (1953).  
 Brindle H., Carless J. E., Woodhead H. B., J. Pharm. Pharmacol., 3, 793 (1951).  
 Brossi A., Häfliger O., Schnider O., Arzneim.-Forsch., 5, 62 (1955).  
 Carless J. E., J. Pharm. Pharmacol., 5, 883 (1953). [1]  
 Carless J. E., Woodhead H. B., Nature, 168, 203 (1951). [2]  
 Castille P., Pharm. Weekbl., 89, 1 (1954).

- De Moerloose P., Pharm. Tijdschr. Belg., 29, 117 (1952); Mededel. Vlaam. chem. Ver., 15, 13 (1952).
- Drey R. E. A., Foster G. E., J. Pharm. Pharmacol., 5, 839 (1953).
- Dybing F., Dybing O., Jensen K. B., Acta pharm. toxicol., 7, 337 (1951).
- Erbring H., Wulf W., Kolloid Z., 125, 99 (1952).
- Foster G. E., MacDonald J., Jones T. S. G., J. Pharm. Pharmacol., 1, 802 (1949).
- Fučík K., Tichý R., Chem. Listy, 47, 1527 (1953).
- Fuchs L., Pöhm M., Scientia pharm., 19, 232 (1951).
- Goldbaum L. R., Kazyak L., Anal. Chem., 28, 1289 (1956).
- Gore D. N., Adshead J. H., J. Pharm. Pharmacol., 4, 803 (1952).
- Grant E. W., Kennedy E. E., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., 44, 129 (1955).
- Griffon H., Romano C., Ann. pharm. Franc., 10, 497 (1952).
- Hochstein F. A., Murai K., Boegemann W. H., J. Am. Chem. Soc., 77, 3551 (1955).
- Jaminet F., J. Pharm. Belg., 35, 449 (1953). [1]
- Jaminet F., J. Pharm. Belg., 36, 9 (1954). [2]
- Jeffrey R. N., Eoff W. H., Anal. Chem., 27, 1903 (1955).
- Jones T. S. G., Chemistry and Industry, 153, 375 (1950).
- Kariyone T., Hashimoto Y., Nature, 168, 739 (1951).
- Karrer P., Nature, 176, 277 (1955).
- Kebrle J., Schmid H., Waser P., Karrer P., Helv. chim. Acta, 36, 102 (1953).
- Kidd D. A. A., Walker J., J. Chem. Soc., 1954, 669.
- Klementschtz W., Mathes P., Scientia pharm., 20, 65 (1952).
- Koloušek J., Kutáček M., Bílek J., Českoslov. Farm., 4, 188 (1955).
- Košťíř J. V., Rybář D. J., Oulehla B., Hais I. M., Beran M., Českoslov. Farm., 1, 621 (1952).
- Kraft D., Pharmazie, 8, 251 (1953).
- Kuhn R., Löw I., Chem. Ber., 88, 289 (1955).
- Leete E., Marion L., Spenser I. D., J. biol. Chem., 214, 71 (1955).
- Leiserson L., Walker T. B., Anal. Chem., 27, 1129 (1955).
- Levine J., Fischbach H., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., 44, 543 (1953).
- List P. H., Naturwissenschaften, 41, 454 (1954).
- Lussman D. J., Kirch E. R., Webster G. L., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., 40, 368 (1951).
- Macek K., Pharmazie, 9, 420 (1954). [1]
- Macek K., Černý A., Semonský M., Pharmazie, 9, 388 (1954). [2]
- Macek K., Hacaperková J., Kakáč B., Pharmazie, 11, 533 (1956). [3]
- Macek K., Semonský M., Vaněček S., Černý A., Naturwissenschaften, 42, 647 (1955). [4]
- Macek K., Semonský M., Vaněček S., Zikán V., Černý A., Pharmazie, 9, 752 (1954). [5]
- Macek K., Vaněček S., Pharmazie, 10, 422 (1955). [6]
- Macek K., Vaněček S., Pelcová V., Vejdělek Z. J., Chem. Listy, 50, 598 (1956); Coll. Czech. chem. Commun., 21, 1182 (1956). [7]
- Macek K., Vaněček S., Vejdělek Z. J., Chem. Listy, 49, 539 (1955); Coll. Czech. chem. Commun., 21, 987 (1956). [8]
- Macek K., Vejdělek Z. J., Nature, 176, 1173 (1955). [9]
- Mačák V., Burešová I., Šantavý F., Ann. pharm. franç., 12, 555 (1954).
- Mannering G. J., Dixon A. C., Carroll N. V., Cope O. B., J. Lab. clin. Med., 44, 292 (1954).
- Markovič O., Ditterová V., Chem. Zvesti, 9, 576 (1955).
- Mathes P., Klementschtz W., Scientia pharm., 19, 235 (1951).
- McMullen W. H., Pazdera H. J., Missan S. R., Ciaccio L. L., Grenfell T. C., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., 44, 446 (1955).
- Mesnard P., Boussemart E., Bull. Trav. Soc. Pharmac. Bordeaux, 88, 175 (1950).
- Miletti M., Adem bri G., Sperimentale, Sez. Chim. biol., 4, 99 (1955).
- Munier R., Bull. Soc. chim. France, 1952, 852. [1]
- Munier R., Bull. Soc. chim. biol., 35, 1225 (1953). [2]
- Munier R., Macheboeuf M., Bull. Soc. Chim. biol., 31, 1144 (1949). [3]
- Munier R., Macheboeuf M., Bull. Soc. Chim. biol., 32, 904 (1950). [4]
- Munier R., Macheboeuf M., Bull. Soc. Chim. biol., 33, 846 (1951). [5]
- Munier R., Macheboeuf M., Cherrier N., Bull. Soc. Chim. biol., 33, 1919 (1951). [6]

- Munier R., Macheboeuf M., Cherrier N., Bull. Soc. Chim. biol., **34**, 204 (1952). [7]
- Nash H. A., Brooker R. M., J. Am. Chem. Soc., **75**, 1942 (1953).
- Ochiai E., Okuda S., Pharm. Bull., **1**, 266 (1953).
- Paul A. G., Kelleher W. J., Schwarting A. E., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., **43**, 205 (1954).
- Pircio A., Geiling E., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., **41**, 552 (1952).
- Pöhm M., Monatsh., **85**, 1010 (1954). [1]
- Pöhm M., Fuchs L., Naturwissenschaften, **40**, 244 (1953). [2]
- Pöhm M., Fuchs L., Naturwissenschaften, **41**, 63 (1954). [3]
- Pöhm M., Galinovsky F., Monatsh., **84**, 1197 (1953). [4]
- Porter W. L., Naghski J., Eisner A., Arch. Biochem., **24**, 461 (1949).
- Procházka Z., Lábler L., Kotásek Z., Chem. Listy, **48**, 1066 (1954).
- Reichelt J., Českoslov. Farm., **3**, 330 (1954); Pharmazie, **9**, 968 (1954). [1]
- Reichelt J., Pharmazie, **10**, 234 (1955). [2]
- Reichelt J., Pharmazie, **11**, 718 (1956). [3]
- Resplandy A., Compt. rend., **238**, 2527 (1954). [1]
- Resplandy A., Compt. rend., **239**, 496 (1954). [2]
- Resplandy A., Sannié C., Compt. rend., **241**, 65 (1955). [3]
- Romeike A., Pharmazie, **7**, 496 (1952). [1]
- Romeike A., Flora, **143**, 67 (1956). [2]
- Salvesen B., Paulsen A., Medd. Norsk farm. Selskap, **15**, 33 (1953).
- Schmid H., Karrer P., Helv. chim. Acta, **33**, 512 (1950). [1]
- Schmid H., Kebrle J., Karrer P., Helv. chim. Acta, **35**, 1864 (1952). [2]
- Schultz O. E., Strauss D., Arzneimittel-Forsch., **5**, 342 (1955).
- Schute J. B., Pharm. Weekbl., **86**, 201 (1951). [1]
- Schute J. B., Nature, **171**, 839 (1953). [2]
- Slavík J., Slavíková L., Chem. Listy, **48**, 1382 (1954); Coll. Czech. chem. Commun., **20**, 21 (1955). [1]
- Slavík J., Slavíková L., Chem. Listy, **49**, 106 (1955); Coll. Czech. chem. Commun., **20**, 356 (1955). [2]
- Steiniger E., Ochsner F., Schweiz. Apoth.-Ztg., **93**, 395 (1955).
- Stoll A., Rügger A., Helv. chim. Acta, **37**, 1725 (1954).
- Svendsen A. B., Pharm. Acta Helv., **26**, 323 (1951). [1]
- Svendsen A. B., Aarnes E. D., Paulsen A., Medd. Norsk. farm. Selskap., **17**, 116 (1955). [2]
- Tanaka K., Sugawa T., J. pharm. Soc. Japan, **72**, 616 (1952). [1]
- Tanaka K., Sugawa T., J. pharm. Soc. Japan, **72**, 620 (1952). [2]
- Tewari S. N., Naturwissenschaften, **41**, 217 (1954).
- Thies H., Reuther F. W., Naturwissenschaften, **41**, 230 (1954). [1]
- Thies H., Reuther F. W., Naturwissenschaften, **42**, 462 (1955). [2]
- Thies H., Reuther F. W., Naturwissenschaften, **42**, 486 (1955). [3]
- Tschesche R., Petersen R., Chem. Ber., **87**, 1719 (1954).
- Tso T. C., Jeffrey R. N., Arch. Biochem. Biophys., **43**, 269 (1953).
- Tuzson J., Vastagh G., Pharm. Acta Helv., **29**, 118 (1954). [1]
- Tuzson J., Vastagh G., Pharm. Acta Helv., **29**, 357 (1954). [2]
- Tyler V. E., Jr., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., **44**, 52 (1955). [1]
- Tyler V. E., Jr., Schwarting A. E., J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed., **41**, 354 (1952). [2]
- Vidic E., Arzneimittel-Forsch., **5**, 291 (1955).
- Wagner G., Pharmazie, **10**, 470 (1955).
- Walaszek E. J., Kelsey F. E., Geiling E. M. K., Science, **116**, 225 (1952).
- Wegner E., Naturwissenschaften, **40**, 580 (1953).
- Werle E., Koch J., Naturwissenschaften, **38**, 333 (1951).
- Wibaut J. P., Beyerman H. C., Enthoven P. H., Recueil, **73**, 102 (1954).
- Wieland T., Merz H., Chem. Ber., **85**, 731 (1952).

# ДРУГИЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ АЗОТ

---

## Производные пиридина

К. Мацек

Сведения о веществах, содержащих пиридиновый цикл, приведены также в главе об алкалоидах (стр. 536) и в главе о компонентах нуклеиновых кислот (стр. 507).

### АЛКИЛПИРИДИНЫ

#### Обнаружение

Для проявления алкилпиридинов можно использовать или йодид висмута (III) (Кафнер и Фадерл), или раствор Лугола (*Д 2а*). С реактивом Кёнига (*Д 152*) лишь некоторые основания дают красное окрашивание;  $\gamma$ -пиколин дает сине-фиолетовую окраску, благодаря чему его легко отличить от остальных производных пиридина. Уокер для обнаружения алкилпиридинов использовал кислотно-основной индикатор (метилловый красный). Этот индикатор он добавлял к подвижной фазе системы в количестве 0,25% (см. ниже). При проявлении по методу Бодэ хроматограммы, содержащей медные комплексы алкилпиридинов, о характере анализируемых оснований можно судить непосредственно по окрашиванию отдельных пятен: пятно  $\alpha$ -пиколина окрашено в зеленый цвет,  $\beta$ -пиколина — в оранжевый,  $\gamma$ -пиколина — в синий, пятно 2,6-лутидина имеет розовый цвет, 2, 3-лутидина — желтый цвет, 2,4-лутидина — синий, 2,5-лутидина — также синий цвет.

#### Системы растворителей

Принимая во внимание летучесть пиридиновых оснований, необходимо использовать кислые системы. Первой из предложенных систем была система *n*-бутанол — 2н. соляная кислота (1:1 + метилловый красный). С помощью этой системы Уокеру удалось осуществить хорошее отделение пиридина от хинолинов и коллидина. Используя систему этанол — соляная кислота — вода (20:1:2), Кафнер и Фадерл получили

очень хорошие результаты при отделении пиридина от пиколинов и лутидинов. Данные их опытов представлены в табл. 109. Кроме того, с помощью этой системы можно разделить отдельные пиколины. Бодэ использует для пропитки бумаги раствор 5 г хлорида меди и 20 мл глицерина в 100 мл воды. После высушивания бумаги на воздухе в качестве подвижного растворителя применяют эфир.

#### Идентификация алкилпиридинов по их производным

В тех случаях, когда отдельные изомеры пиридиновых оснований нельзя непосредственно идентифицировать на хроматограмме, Ерхель и Якобс [1] рекомендуют окислять эти основания двуокисью селена в соответствующие кислоты. Кафнер и Фадерл используют для окисления перманганат калия (II 125). Этим способом можно идентифицировать практически все возможные изомеры пиколинов и лутидинов (стр. 564—565). Ерхель и Якобс использовали для окисления пиридиновых оснований также перекись водорода, с помощью которой эти основания переводились в N-окиси [2]. Однако ввиду близких значений  $R_f$  этот метод, по-видимому, менее удобен.

### АЛЬДЕГИДЫ И КЕТОНЫ ПИРИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

#### Обнаружение

Альдегиды и кетоны со свободным  $\alpha$ -положением можно обнаруживать при помощи реакции Кёнига (Д 152). По данным Ерхеля и Якобса [1], для обнаружения альдегидов пиридина особенно хорошо использовать диметилдигидроперезорцин (димедон) и окисную соль железа (Д 150). С помощью последнего реактива анализируемое вещество можно обнаружить лишь в том случае, если его количество составляет не менее 1  $\mu$ г.

#### Системы растворителей

Для разделения альдегидов Ерхель и Якобс [1] использовали в качестве растворителя систему 2-бутанол — муравьиная кислота — вода (75:15:10). Однако значения  $R_f$ , которые были получены в этом случае для различных альдегидов, мало отличались друг от друга. Для кетонов, по данным Франкенбург и сотрудников, оказалась пригодной система бутилацетат — метанол — 0,25 %-ный раствор аммиака (95:5:25).

### ПИРИДИНКАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ

#### ОБНАРУЖЕНИЕ

#### Физические способы обнаружения

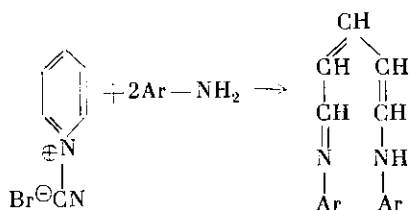
Большинство веществ этой группы имеет характерные спектры поглощения с максимумом при 260 м $\mu$ . Поэтому для обнаружения на бумаге можно использовать контактную фотографию, применяя разрядную лампу

низкого давления, дающую излучение с длиной волны, близкой к указанной (Мюнне, Лейпнер [2]). Этим способом можно обнаружить до 1  $\mu\text{г}$  вещества.

### Химические способы обнаружения

К наиболее простым способам, применяемым для обнаружения веществ этой группы, в первую очередь относится проявление с помощью индикаторов. Ерхель и Якобс [1] использовали в качестве флуоресцентного индикатора флуоресцеин. Кафнер и Фадерл рекомендуют использовать в этом случае 4-метилумбеллиферон (Д 151), который несколько чувствительнее флуоресцеина и имеет более удобную область перехода (рН 6,5—7,6). Кроме того, 4-метилумбеллиферон бесцветен, что позволяет осуществлять дальнейшую обработку бумаги другими реактивами, например реактивом Кёнига. Для некоторых более сильных кислот, особенно для обнаружения дикарбоновых кислот, можно также использовать бромфеноловый синий (Д 6). Чувствительность индикаторов составляет около 20—50  $\mu\text{г}$ , т. е., как мы увидим далее, приблизительно в 100 раз меньше чувствительности некоторых реактивов. Несколько более чувствительным реактивом является пикрилхлорид (Д 99), который дает характерное окрашивание с третичными производными пиридина, если последние присутствуют в количестве не менее 5  $\mu\text{г}$  (Катбертсон и Айрленд [1]).

Одним из наиболее часто применяемых методов идентификации производных пиридина с незамещенным  $\alpha$ -положением является реакция Кёнига с бромцианом и ароматическими аминами (Д 152). В хроматографии на бумаге эта реакция была впервые применена Хюбнером, а затем Кодичком и Редди. В процессе этой реакции после присоединения бромциана прежде всего происходит размыкание гетероциклического кольца с образованием глутаконового альдегида. Глутаконовый альдегид тотчас же реагирует с ароматическим амином. В результате последней реакции происходит образование интенсивно окрашенного иминопроизводного глутаконового альдегида:



Возможность протекания этой реакции, ее чувствительность и окрашивание образующегося продукта зависят от замещения анализируемого производного пиридина, от характера используемого амина, а по некоторым данным, и от рН. В отношении первого условия следует отметить, что обычно считают необходимым наличие свободного  $\alpha$ -положения. Специфичность действия амина, используемого в реактиве, можно показать на примере *n*-аминобензойной кислоты. Так, опрыскивание этой кислотой не позволяет обнаружить изоникотиновую кислоту, если даже последняя присутствует в количестве 10  $\mu\text{г}$ . В то же время *n*-аминобензойная кислота хорошо реагирует с бензидином и 3-метил-1-фенилпирозолоном (Катбертсон и сотрудники [2]). Чувствительность реакции Кёни-

га при наблюдении флуоресценции пятен составляет около 0,1  $\mu\text{г}$ ; в некоторых случаях ее удается повысить до 0,02  $\mu\text{г}$  (Кафнер и Фадерл).

По данным Холмана, для обнаружения веществ, содержащих карбамидную группу, очень удобен реактив, состоящий из гипобромита, сульфамата и нафтилэтилендиамина (Д 153). Чувствительность этого реактива в отношении указанных производных составляет от 1 до 2  $\mu\text{г}$ . Производные с заместителями в  $\alpha$ -положении можно определять с помощью 3%-ного раствора закисной соли железа (Кафнер и Фадерл [2]). Двухзамещенные производные образуют пятна, окрашенные в желтый цвет.

### Микробиологические способы обнаружения

Лейфер и сотрудники для обнаружения никотиновой кислоты и некоторых родственных ей веществ, имеющих характер витаминов, применил биоавтографический метод с микроорганизмом *Lact. arabinosus*. Джонсу и сотрудникам с помощью метода круговой хроматографии удавалось обнаруживать никотиновую кислоту и никотинамид, присутствующие в количестве 0,01  $\mu\text{г}$ . Джонсон и Лин предпочитали использовать микроорганизм *Tetrahymena cremonensis*.

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Разделение пиридинмонокарбоновых кислот осуществляется без особых затруднений. Для их разделения можно использовать смесь *n*-бутанола и метанола, содержащую 35% воды (Хасидзумэ), или систему 2-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10) Ерхель и Якобс). Для разделения дикарбоновых кислот, по данным Кафнера и Фадерла, лучше всего использовать систему *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (3 : 1 : 1) или систему *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Чтобы различить монокарбоновые и дикарбоновые кислоты, удобнее всего использовать систему *n*-бутанол — 1,5 н. раствор аммиака (3 : 2). Значения  $R_f$  некоторых производных пиридина приведены в табл. 109.

### ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРИДИНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Наибольшее число работ в этой области было посвящено исследованию метаболизма никотиновой кислоты и гидразида изоникотиновой кислоты, а также определению последнего.

### АМИДЫ, ГИДРАЗИДЫ И ПЕПТИДЫ

#### Приготовление образца

Чаще всего на присутствие этих веществ анализируется моча. Для проведения анализа Редди и Кодичек упаривали досуха 10 мл мочи при пониженном давлении и температуре 55—60°. Затем остаток экстрагировали 1 мл воды и раствор центрифугировали. 10  $\mu\text{л}$  полученного при центрифугировании чистого раствора наносили прямо на бумагу. Лейшнер после доведения рН мочи до 6—7 наносил образец на бумагу без предварительного концентрирования.

## Обнаружение

Кроме реакции Кёнига и реактива, содержащего пикрилхлорид или гипобромит (табл. 108), для проявления гидразидов можно использовать

Таблица 108

## РЕАКЦИИ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДИНА

Производное пиридина	BrCN	BrCN + + ПАБ (Д 152а)	BrCN + бен- зидиям	BrCN + о-фенилен- диамина (Д 152г) б)	BrCN + n-ДМАБ <sup>в)</sup>	Пикрилхло- рид (Д 99)	
	Катбертсон и сотрудники [2] а)			Лейшнер		Катбертсон и сотрудники [2] а)	
						норм.	NH <sub>3</sub>
Никотиновая кислота	св. ж.	ж.	кр.	кр.	ж.	св. ж.	кр.
Изоникотиновая кис- лота . . . . .	—	—	св. син.	син. ф.	—	св. ж.	кр.
Никотинамид . . . . .	св. ж.	ж.	о. кр.	ж.—кр.	ж.	св. ж.	кр.
Изоникотинамид . . . . .	—	—	пурп.	син. ф.	—	св. ж.	кр.
Гидразид никотино- вой кислоты . . . . .	св. ж.	ж.	о.			кр.	кр.
Гидразид изоникоти- новой кислоты . . . . .	—	св. ж.	св. ж. з.	—	ж.	пурп.	пурп.
Никотин . . . . .		ж.—о. ж.					
Анабазин . . . . .		о. ж.					

а) Указанное окрашивание было получено при нанесении 10 мкг вещества.

б) Чувствительность реакции составляет 0,2 мкг.

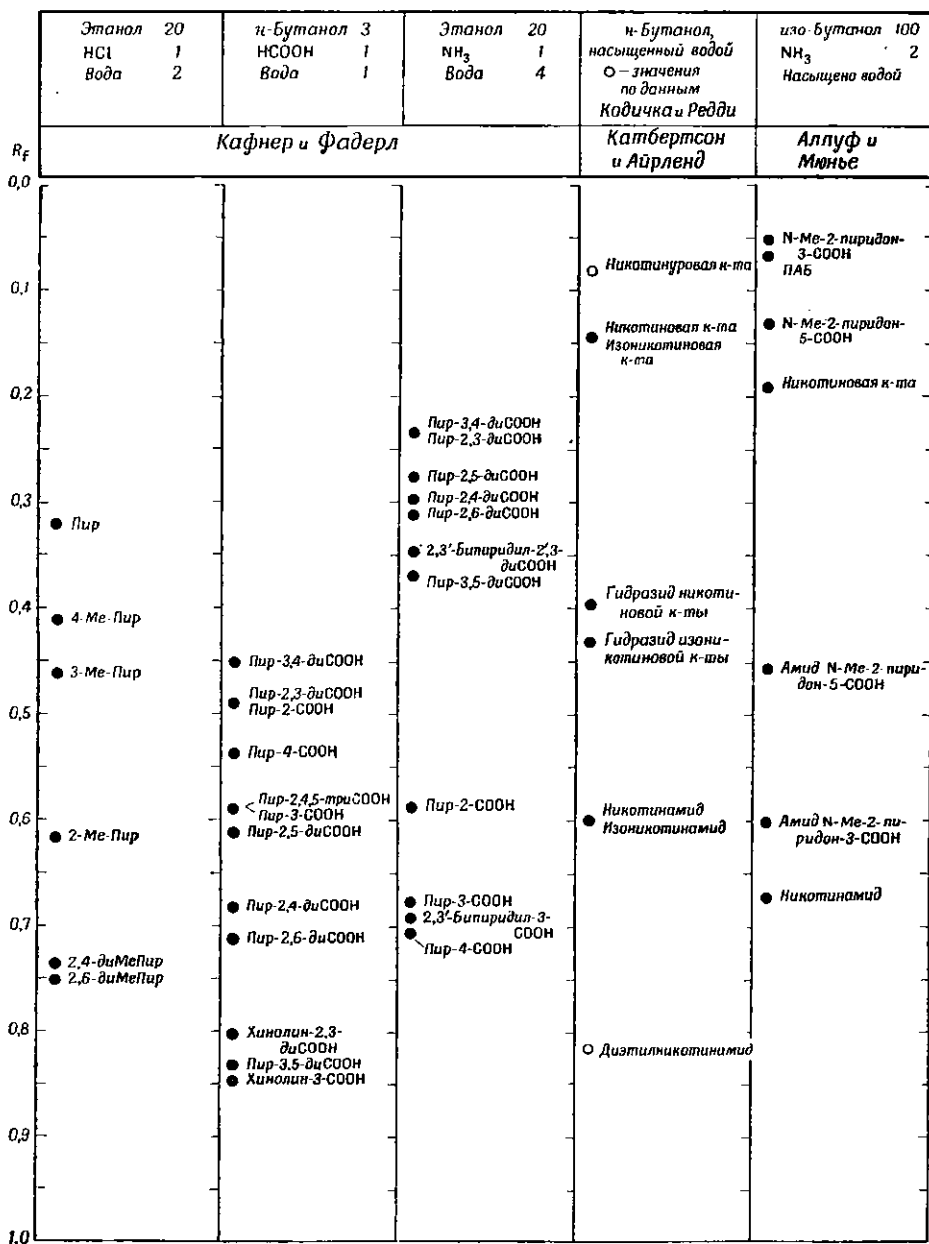
в) Чувствительность реакции составляет 1—5 мкг.

реакцию с *n*-диметиламинобензальдегидом. Эта реакция более специфична (Д 102, Катбертсон и сотрудники [2]). Для обнаружения четвертичных производных пиридина с группой —CO—NH—R в β-положении, по данным Кодичка и Редди, может использоваться синевато-белая флуоресценция в ультрафиолетовом свете, если хроматограмма была предварительно обработана парами метилэтилкетона и аммиака (1:1) в течение одного часа при комнатной температуре. Чувствительность этой реакции по данным авторов составляет 0,05 мкг.

## Системы растворителей

В качестве растворителей чаще всего используют насыщенный водой *n*-бутанол (Кодичек и Редди) или смесь *n*-пропанола с водой (4:1; Катбертсон и сотрудники [1]). Из других применявшихся систем приведем смесь *n*-бутанола с ацетоном и водой (45:5:50; Джонсон и Лин); систему, состоящую из изобутанола, муравьиной кислоты и воды (100:20:45), и насыщенную водой смесь изобутанола и аммиака (100:2; Аллуф и Мюнье). Для хорошего отделения гидразида изоникотиновой кислоты от свободных кислот или амидов Лейшнер [1,2] рекомендует применять двумерную хроматографию: в первом направлении для разделения использовали насыщенный водой 2-бутанол, а во втором направлении — систему, состоящую из изоамилового спирта, ацетона, уксусной кислоты и воды (56:24:6:14). Значения *R<sub>f</sub>* для этой системы приведены в табл. 109.

Таблица 109

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДИНА

## Количественный анализ

Для определения гидразида изоникотиновой кислоты Лейшнер использовал *n*-диметиламинобензальдегид. Анализ проводили спектрофотометрически после промывания бумаги 0,1 н. соляной кислотой. Этим

способом можно определить от 5 до 25  $\mu\text{г}$ . Максимальная ошибка анализа при содержании гидразид изоникотиновой кислоты в анализируемом растворе, равном 25  $\mu\text{г/мл}$ , составляет  $\pm 25\%$ . Эта ошибка связана в основном со сгущением анализируемого раствора, а при нанесении более концентрированных растворов — с адсорбцией на бумаге.

### СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ ПИРИДИНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Для обнаружения эфиров этих кислот очень удобно использовать реакцию Кёнига (*Д* 152). Поскольку соединения этой группы обладают значительно менее полярным характером, Мадек и сотрудники рекомендуют брать в качестве неподвижной фазы формамид, а для хроматографирования использовать хлороформ или смесь бензола с хлороформом (8 : 2).

## Производные индола

### Ж. Прохазка

Соединения индола широко распространены в природе. Большое число производных индола природного происхождения обладает значительным физиологическим действием. Такими веществами являются, например, алкалоиды спорыньи, жабыи яды, ауксины и др. В этой главе будут рассматриваться лишь простейшие производные индола, не содержащиеся в молекуле других колец (табл. 110) (см. также стр. 543). При изучении этих веществ чаще всего использовали хроматографию на бумаге. Связь хроматографического поведения веществ с их химическим строением была, пожалуй, лучше всего изучена именно для группы производных индола (Прохазка и сотрудники [1]). На основании экспериментальных данных (табл. 111) и теоретических предпосылок (Бейт-Смит и Уэстолл, Райхль и Шауэр и Булирш) (см. стр. 77) были рассчитаны так называемые «групповые константы» ( $\Delta R_M$ ) для различных функциональных групп. Эти расчеты сделаны для системы четыреххлористый углерод — уксусная кислота и частично для некоторых других систем (табл. 112). Указанные расчеты сделали возможным вычисление величин  $R_M$ , а следовательно, и  $R_f$  для отдельных соединений индола на основании данных об их структуре. При этом в большинстве случаев было достигнуто хорошее соответствие с экспериментальными данными. Однако иногда этого не наблюдалось. Такие случаи особенно интересны, так как они свидетельствуют о том, что имеет место какое-то внутримолекулярное взаимодействие. Чаще всего оно связано с образованием водородных мостиков. Так, например, величина  $R_f$  для индол-2-карбоновой кислоты вопреки ожиданию оказалась значительно больше величины  $R_f$  для индол-3-карбоновой кислоты. Это явление мы объясняем возникновением пятичленного клешневидного комплекса, образованного водородным мостиком между азотом ядра индола и карбонильным кислородом заместителя, который находится в положении 2. Образование водородных мостиков можно было также наблюдать и у индолов, замещенных в положении 7 амино- или нитрогруппой. Величины  $R_f$  для этих производных индола были значительно больше, чем величины  $R_f$  для их изомеров, у которых аналогичные заместители

Таблица 110

## РЕАКЦИИ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛА

Производное индола	Сокращение <sup>а)</sup>	Д 102	Д 154	Д 156		Д 50
				в види- мом свете	в ультра- фиолето- вом свете	
Индол . . . . .	И	роз. ф.	роз.	кр. ф.		к.
3-Метилиндол (скатол)		син. ф.	к. ж.	ж.	ж.	ж.
2-(Индолил-3)-этанол (триптофол) . . . . .	ИЭтОН	ф.	ж. к.	о.	о.	о.
Индолил-3-альдегид	ИСНО	ф.	о. к.	ф.		о.
Индолил-3-ацетальде- гид . . . . .	ИСН <sub>2</sub> СНО	ж. к.	к.			
1-(Индолил-3)-бутен-1- он-3 . . . . .	ИБутенон	ж.		о.	—	
Аскорбиген . . . . .		ф.		о.	о.	
Вещество С . . . . .	«С»	сер.		о.	о.	
Индол-3-карбоновая кислота . . . . .	ЗИСООН	роз. ф.	кр.	ф.		о. к.
Индолил-3-уксусная кис- лота (гетероауксин)	ИУК	син.	кр.	ж.	ж.	ж. о.
Этиловый эфир индолил- 3-уксусной кислоты	ЭТИУК	ф.	ж. о.			ж. о.
β-(Индолил-3)-пропио- новая кислота . . . . .	ИПК	син.	ж.	ж.	ж.	о.
γ-(Индолил-3)-масляная кислота . . . . .	ИМК	син.	ж. к.	о.	о.	о.
β-(Индолил-3)-молочная кислота . . . . .	ИМолК	ф.	о. кр.	о.	о.	ж.
Индолил-3-пировино- градная кислота . . . . .	ИПиВК	сер. ж.		ж. к.	—	о.
Индолил-3-ацетамид	ИААмид	син.	кр.	о. к.	о.	о.
3-Диметиламинометил- индол (грамин) . . . . .	Грамин	роз.	роз. син.	ф.	—	—
Триптамин . . . . .	Трип	ф.	к.	о.	о.	ж.
N-Метилтриптамин . . . . .	NMeТрип	син.		сер.	—	з.
2-Амино-3-(индолил-3)- пропанол-1 . . . . .	Триптофанол	ф.				ж.

Продолжение табл. 110

Производное индола	Сокращение <sup>а)</sup>	Д 102	Д 154	Д 156		Д 50
				в видимом свете	в ультрафиолетовом свете	
Триптофан . . . . .	Трипт	ф.	ж.	о.	о.	ж. о.
<i>d</i> - $\alpha$ -Метиламино- $\beta$ -(индолил-3)-пропионовая кислота (абрин) . .	Абрин . . .	кр. ф.	ж.			ж. о.
$\alpha$ -Триметил- $\beta$ -(индолил-3)-пропиобетанин (гипафорин) . . . .	Гипафорин	ф. к.	ж.			
Калиевая соль индолил-3-сульфокислоты (индикан) . . . . .	Индикан	к.	син.			
Индикан-гликозид . .	Индикан-Г	ж.				
2-Оксииндол (оксинидол) . . . . .	Оксинидол	ж.		ж.	—	ж.
5-Оксииндолил-3-уксусная кислота . . . .	5ОНИУК	з. син.	з. син.			кр.
5-Окситриптамин (серотонин) <sup>б)</sup> . . . . .	Серотонин	сер. ф.	син.	сер.	—	кр. о.
5-Окситриптофан . . .	5ОНТрипт	син. з.	з. син.			кр.
2-Диметиламиноэтил-5-оксинидол (буфотенин) . . . . .	Буфотенин	син. ф.				кр.
Изатин . . . . .	Изатин	ж.	ж.			
2-Карбоксииндолил-3-уксусная кислота	2СООНИУК	ф.		ж.	(ж.)	
Индиготин . . . . .	Индиготин	кр.	син.			
Дисульфонат индиго		кр.	син.			

<sup>а)</sup> Эти сокращения будут использованы в табл. 111. Сокращения для остальных соединений приведены в перечне сокращений.

<sup>б)</sup> По данным Джемсона и Стивенса, наибольшей чувствительностью в отношении проявления серотонина (до 0,02  $\mu$ г), триптамина и некоторых других триптаминов с  $\text{NH}_2$ -группой и индольным кольцом, не имеющим заместителей в положениях 1 и 2, обладает раствор нингидрина (Д 112а, 10% уксусной кислоты). Опрысканную этим раствором хроматограмму выдерживают в течение 2–3 мин при 90–100°. Указанные соединения дают с этим раствором реакцию, вызывающую сине-зеленую флуоресценцию.

Таблица 111

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛА

	Аетролейный эфир 100 Метанол 4	ССl <sub>4</sub> 100 Уксусная кислота 2	Изопропиловый эфир, насыщенный водой	н-Бутанол, насыщенный 1н.НСl	н-Бутанол 8 25% ный ме-тиламин 3	изо-Пропанол 10 NH <sub>3</sub> 1 Вода 1 а)
R <sub>f</sub>	Проказна и сотрудники [2]			Эрспарер		Стоув и Тиманн
0,0	● ИМК ● Грамин, МейМолк ● ИПрОН-2 ● Оксиндол, ИбуОН ● Иацетон ● ИСН <sub>2</sub> И ● ЗИСОМе	● Аскорбиген ● ИПрдиОН ● < ИМолк, 5ОНИ ● 2СООНИУК ● ИПиВК, ИААмид	● "С" ● 6NO <sub>2</sub> 2Ме- ● ЗИСООН ● Аскорбиген ● ИМолк ● 2СООНИУК		● Буфотенидин ● 5ОНТрип	● ИАкрК ● 7ОНИУК ● 5ОНТрип ● ИПиВК
0,1	● МейПлВК ● МейУК	● ИСНО ● ИБАмид ● ЗИСООН ● < 2СООНИПК ● 2ОНИПК	● 2СООНИПК	● < 5ОНТрип ● Буфотенидин ● 5,6(МеО) <sub>2</sub> Трип ● Серотанин ● NMe-серотанин ● Буфовиридин ● Буфотенин	● ДГБуфотенин ● Буфотионин	● 5ОНИУК ● Трип ● ЗИСООН
0,2	● МейПК	● ИзтОН ● Ибутенон, ИУК		● ДГБуфотенин ● Трип, 5МеОТрип ● Триптофанол ● < 6МеОТрип	● Трип ● Гипафорин ● ИУК	● ИУК ● Гипафорин ● Абрин ● ИМолк
0,3	● Индол ● МейМК	● МейМолк ● ИСН <sub>2</sub> СНО ● ИПрОН		● Гипафорин ● Трип ● NMeТрип, ● NMe <sub>2</sub> Трип ● 1МеТрип	● ИМК ● Буфовиридин	● NSTрип ● ИМК
0,4		● ИПК	● ИПрдиОН	● Грамин ● ИУК ● ИПК ● ИМК	● Серотанин	● ИМК
0,5	● 2ИСОМе ● Скато	● ЗИСОМе ● ИПрОН-2, 3т- ● ИбуОН ИМолк ● 2ИСООН	● Оксиндол		● Серотанин	● Серотанин
0,6	● 2СООЭтИПКЭт ● МейМК ● 3Алл	● Оксиндол ● Иацетон ● ИМК	● ИАкрК ● ИПиВК ● ЗИСООН ● ИУК, МейМолк ● ИСНО	● 5,6(МеО) <sub>2</sub> Трип		● ИААмид ● Оксиндол ● Трип ● НАЦиндоксил ● ИзтОН
0,7	● 2,3Ме <sub>2</sub> 7NO <sub>2</sub> И ● 3ИПр	● МейУК ● МейПлВК ● 5ОНИ	● 5ОНИ, ИПК ● Ибутенон ● ИзтОН	● 6МеОТрип ● NMe <sub>2</sub> Трип, ● 5МеОТрип ● Триптофанол, ● буфотенин ● Трип ● 1МеТрип ● Грамин	● < 2ФИ ● НАЦНЭтТрип ● NЭтТрип, Индол ● Грамин ● < N(ИЭт)Пиррол ● 3тИУК ● МейУК	
0,8		● МейПК ● НАЦИбутенон ● ИАЭт <sub>2</sub> амид ● Индол ● НАЦИацетон ● МейМК, ● Скато	● 3тИМолк, ИПрОН ● ИПрОН-2 ● МейПК ● ИМК ● Иацетон ● МейУК, МейПлВК ● ЗИСОМе ● Скато	● Скато	● Скато	● Скато, 3Илл
0,9		● ЗИСОМе ● 2СООЭтИПКЭт				
1,0						

а) Для этой системы Сен и Леопольд определили следующие величины  $R_f$ : для индикана — 0,00; для индиготина — 0,00; для индиго-тетрасульфата — 0,06; для индиго-дисульфата — 0,16; для триптофана — 0,19; для индикана — 0,68; для изатина — 0,79; для N-апетилин-доксила — 0,87; для индирубина — 0,96.

Таблица 112

ГРУППОВЫЕ КОНСТАНТЫ ДЛЯ РАСЧЕТА ВЕЛИЧИН  $R_f$  ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛА

Группа	Изопропанол 10	ССl <sub>4</sub> 100	Петролейный 100
	Аммиак 1 Вода <sup>а)</sup> 1	Уксусная к-та <sup>б)</sup> 2	эфир 5 Метанол <sup>б)</sup> 5
—CH <sub>3</sub> (в положении 3) . . . . .	—0,38	—0,25	—0,34
—CH <sub>2</sub> — . . . . .	—0,16	—0,44	—0,21
Двойная связь C=C . . . . .			+0,21
—CN . . . . .	+0,49	+1,02	
Кислород кетогруппы . . . . .	+0,60	+1,6	+1,63
Кислород альдегидной группы в цепи . . . . .		+1,88	
Кислород альдегидной группы в по- ложении 3 . . . . .	+0,55	+2,16	
—ОН вторичная . . . . .		+1,93	
—ОН первичная . . . . .	+0,76	+2,25	+2,02
—ОН фенольная (в положении 5) . . . . .	+0,23	+2,3	
—ОН фенольная (в положении 7) . . . . .	+0,49		
—COOH в положении 2 . . . . .		+0,76	
—COOH в положении 3 . . . . .	+1,18	+1,61	
—COOH в цепи . . . . .	+1,43	+1,61	
—CONH <sub>2</sub> в цепи . . . . .	+0,8	+2,62	
—NH <sub>2</sub> в цепи . . . . .	+0,92		
—COOCH <sub>3</sub> (в положении 2) . . . . .		—0,35	—0,24
—COOCH <sub>3</sub> (в положении 3) . . . . .		+0,71	+0,8
—ОН рядом с —COOCH <sub>3</sub> . . . . .		+1,09	+1,05
—ОН рядом с —COOH . . . . .	+0,11	+1,54	
—ОН вторичная вицинальная . . . . .		+1,43	
—ОН первичная вицинальная . . . . .		+1,75	
—NH <sub>2</sub> рядом с —COOH . . . . .	+0,39		
—COOH рядом с —NH <sub>2</sub> . . . . .	+0,91		
Амидирование карбоксила . . . . .	—0,63	+1,01	
Метилирование карбоксила . . . . .	—1,20	—0,9	

<sup>а)</sup> Константы вычислены на основании данных Стоува и Тиманна. Поскольку в этом случае мы имеем дело с однофазной системой, точность рассчитанных констант следует считать низкой.

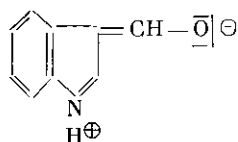
<sup>б)</sup> Константы вычислены на основании данных Прохазки и Шанды. Основная константа для системы четыреххлористый углерод — уксусная кислота была вычислена на основании величин  $R_f$  дикарбоновых кислот в той же системе и имела значение 0,46.

находились в положении 5. Определение разницы величин  $R_M$  для производных индола, у которых заместители находятся в положениях 5 и 7, показало, что образующаяся водородная связь у нитропроизводных значительно прочнее, чем у аминокпроизводных.

Путем сравнения вычисленной величины  $R_M$  с экспериментально найденной можно было доказать существование слабой водородной связи (или вообще пространственного взаимодействия) даже у производных с вицинальными гидроксильными группами, а также у производных с гидроксильной и карбоксильной группами, находящимися у одного атома. В качестве примера таких веществ можно привести индолилпропандиол и индолилмолочную кислоту.

Сравнение расчетных и экспериментально найденных величин  $R_M$  помогло обнаружить, кроме присутствия водородных мостиков, и другие интересные структурные особенности некоторых производных индола. Так, например, величина  $R_f$  для индол-3-альдегида оказалась неожиданно меньше величины  $R_f$  для индол-3-карбоновой кислоты. Этот факт можно

объяснить влиянием енольной формы индол-3-альдегида, которая в результате наличия положительного заряда у атома азота в значительной степени обладает полярным характером:



Не удалось также рассчитать величину  $R_M$  индолилбутенона путем сложения групповых констант ядра скатола, карбонильной и метиленовой групп и двойной связи. Эта неудача объясняется образованием сопряженной системы, для которой было бы необходимо рассчитывать групповые константы сопряженных двойных связей, карбонильных групп и т. д.

Кроме того, уже одно сравнение групповых констант в различных системах является поучительным и интересным. Так, например, в системе четыреххлористый углерод — уксусная кислота гидроксильная группа способствует увеличению гидрофильности молекулы в большей степени, чем карбоксильная группа. Аналогичным образом действует амидная группа, которая по сравнению с другими группами способствовала наибольшему уменьшению величины  $R_f$  (если не учитывать аминогруппу, которая диссоциирует в кислой среде).

При помощи групповых констант, приведенных в табл. 112, удастся приближенно рассчитать величины  $R_f$  некоторых производных индола, еще не подвергавшихся хроматографическому исследованию. В благоприятных случаях на основе значений  $R_f$  удастся оценить строение неизвестных соединений индола. На основании данных Леонгарди [2] мы попытались вычислить величины  $R_f$  некоторых образцов меланогенов для отдельных систем из табл. 111. Расчеты показали, что для разделения должна быть очень удобной система изопропиловой эфир — вода. Приближенная оценка  $R_f$  для 5,6-диоксииндола в этой системе дает величину 0,1; для диметилового эфира величина  $R_f$  составляет около 0,8, а для изомерного монометилового эфира — не менее 0,6. Подтверждение этих данных может быть получено только опытным путем.

### Приготовление образца

Образцы готовили лишь в тех случаях, когда концентрация производных индола была слишком низка по сравнению с концентрацией веществ, являвшихся балластом. Поскольку производные индола могут иметь кислый, нейтральный или основной характер, приготовление образцов будет зависеть от характера этих производных. При приготовлении образцов в большинстве случаев приходится иметь дело с отделением коллоидных веществ (главным образом белков), которые часто нарушают нормальное течение хроматографического процесса. Коллоидные вещества обычно можно отделить путем экстракции образца органическим растворителем. Большая часть соединений индола переходит в процессе экстракции в фазу органического растворителя. За исключением триптофана, 5-окситриптофана, нескольких продуктов разложения аскорбигена и некоторых меланогенов мочевины, большинство описанных в литературе производных индола имеет средне- или слабополярный характер (если эти соединения присутствуют в недиссоциированной форме). рН раствора, в котором находится исследуемый образец, доводят до такой величины,

чтобы не происходило диссоциации основных или кислых веществ. Затем природные вещества экстрагируют в зависимости от их полярности этилацетатом или эфиром. Экстракт, не содержащий белков, пектинов и других мешающих при хроматографировании гидрофильных веществ, наносят на бумагу. Однако если экстракт содержит слишком много очень липофильных веществ (воска, жиры и т. п.), то их также необходимо отделить (по крайней мере большую часть) путем распределения сконцентрированного экстракта между петролейным эфиром и 90%-ным метанолом. Большая часть соединений индола перейдет в более полярную фазу.

### Техника хроматографирования

Соединения индола очень неустойчивы. Они чувствительны к действию света, кислорода и кислот. Очень часто пятна образцов, нанесенных на бумагу, на воздухе быстро приобретают красную или коричневую окраску. Ввиду этого необходимо предохранять нанесенные на бумагу образцы от действия света и кислорода воздуха. Операции, связанные с осуществлением хроматографирования, необходимо проводить в этом случае по возможности быстро. На некоторые соединения индола (например, индолные основания, аскорбинген) неблагоприятное воздействие оказывают также щелочи. Аскорбинген, нанесенный на бумагу, разлагается в атмосфере, содержащей аммиак.

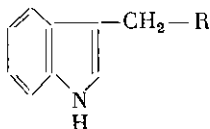
Поскольку соединения индола довольно часто хроматографируют в липофильных растворителях, обладающих иногда значительной летучестью, перед проявлением хроматограмму с нанесенными на нее пятнами необходимо подвешивать в герметически закрываемой камере, атмосфера которой должна быть насыщена всеми компонентами используемой системы растворителей. Такое проведение процесса хроматографирования препятствует уменьшению скорости продвижения растворителя, подавляет адсорбцию на бумаге и способствует образованию пятен более правильной формы.

### Обнаружение

Обнаружение индолных производных осуществляется сравнительно просто. Большинство производных индола взаимодействует с кислотами как в присутствии окислителей, так и без них. Кроме того, большинство соединений индола дает окрашенные продукты конденсации с альдегидами (в кислой среде) и окрашенные продукты азосочетания с диазотированными ароматическими аминами. Очень часто пестрое окрашивание пятен, возникающее при проявлении, является весьма специфичным для отдельных соединений. Зная величины  $R_f$ , в этом случае можно легко характеризовать отдельные производные.

Чаще всего при проявлении используют *n*-диметиламинобензальдегид с соляной кислотой (реактив Эрлиха, Д 102). Заслуга широкого применения этого реактива в хроматографии индолов принадлежит Эрспамеру и Пашеко [1]. Кроме *n*-диметиламинобензальдегида, чаще всего применяют видоизмененный реактив Сальковского. (Д 154, Линзер и сотрудники), т. е. смесь хлорной кислоты с  $\text{FeCl}_3$ , затем альдегид коричной кислоты с соляной кислотой (Д 92, Ерхель и Мюллер [3]), нитрит натрия с соляной кислотой (Д 155, Фишер) и диазотированную сульфаниловую кислоту (Д 51, Эрспамер). Помимо последнего реактива, можно с таким же успехом использовать и другие диазотированные амины — прежде

всего *n*-нитроанилин (Д 50, Эрспамер) и бензидин (Д 52, Клерк-Бори и сотрудники). Однако одним из наиболее часто используемых реактивов является формальдегидный реактив (Д 156, Прохазка [1]). Этот реактив дает характерную желтую или оранжевую флуоресценцию и окрашивание от желтого до оранжево-коричневого почти со всеми производными, содержащими заместители в индольном кольце в положении 3, причем в этих заместителях по соседству с ядром должна находиться метиленовая группа:



Исключение составляют такие соединения, в которых R является группой OH, индолилом, диметиламиногруппой и другими группами. Такого вида соединения, как и некоторые другие, дают лишь пятна, окрашенные в цвета от розового до фиолетового. Эрспамер для проявления серотонина (5-окситриптамина) использовал формальдегидный реактив, который отличался от реактива, применяемого Прохазкой, тем, что вместо соляной кислоты он содержал бихромат калия. Это видоизменение формальдегидного реактива целесообразно лишь при проявлении серотонина. Для проявления других производных, имеющих указанную выше общую формулу, такая модификация формальдегидного реактива непригодна.

Для проявления производных индола, не имеющих заместителей в положениях 1, 2 и 3, весьма удобна реакция Тормэлена (Д 95, Леонгарди [1]), хотя она и имеет ограниченное значение. Эта реакция вызывает синее окрашивание.

Для обнаружения многих производных индола можно также с успехом использовать нитрат серебра (Д 4). Производные оксиндола можно проявлять с помощью реактива Яффе (Д 107).

Кроме указанных химических реактивов и других реактивов, которые имеют меньшее значение и здесь не приводятся, для проявления некоторых соединений индола использовали также биологические испытания, с помощью которых на хроматограмме обнаруживали вещества, оказывающие влияние на рост растений. Наиболее простым из биологических методов является, по-видимому, метод Лаквилла, который измерял длину coleoptilia после определенного инкубационного периода на увлажненных частях хроматограммы, разрезанной в поперечном направлении (см. рис. 99).

### Системы растворителей

Среди производных индола, подвергавшихся хроматографическому исследованию, можно найти вещества самой различной полярности, начиная от сильно гидрофильных (например, 5-окситриптофан) и кончая сильно липофильными веществами, какими являются алкилиндолы (например, скатол). При этом необходимо принимать во внимание, что индольные кислоты и основания в зависимости от pH используемой системы могут вести себя либо как гидрофильные, либо как липофильные вещества. Так, например, если  $\omega$ -индолилжирные кислоты находятся в диссоциированном состоянии (т. е. если система имеет основной характер, например

аммиак), их можно хроматографировать в сильно полярных растворителях (даже в однофазных системах). Если эти кислоты находятся в недиссоциированном состоянии (в кислых системах), их гидрофильность незначительна и, следовательно, для их хроматографирования пригодны значительно менее полярные растворители. По сравнению с более полярными растворителями, которые лучше смешиваются с водой, последние имеют то преимущество, что они обладают большей разделяющей способностью. Точно то же самое, только наоборот, можно сказать и об индольных основаниях (триптамин и т. п.). Они ведут себя как гидрофильные вещества в кислых системах и как липофильные — в основных. Хорошей иллюстрацией этому является работа Стоува и Тиманна, которые весьма подробно изучили влияние состава и pH растворителя на величину  $R_f$  различных соединений индола.

На основании литературных данных можно сказать, что чаще всего при хроматографировании производных индола используют систему, состоящую из *n*-бутанола с аммиаком. Наиболее удачной системой в этом случае является, по-видимому, *n*-бутанол, насыщенный 5%-ным раствором аммиака (Уэлер и сотрудники). Весьма близкую к ней полярность имеет система изопропанол — аммиак — вода (лучше всего в соотношении 10 : 1 : 1; Сен и Леопольд). Эту систему также используют довольно часто. Однако, поскольку она является однофазной и основной, разделение в ней, так сказать, «незакономерно». Так, например, индолилуксусная кислота, индолилмолочная кислота и триптофан имеют в этих системах весьма близкие, если не одинаковые, значения  $R_f$ . В кислых слабо полярных системах величины  $R_f$  этих трех веществ, наоборот, существенно различаются.

В табл. 111 приведены также и другие растворители, пригодные для хроматографирования производных индола всех типов. Эти растворители расположены в таблице в порядке их полярности. Из них лучше всего исследована система четыреххлористый углерод — уксусная кислота (100 : 2), о которой речь шла уже во введении. Групповые константы для этой системы приведены в табл. 112.

### Количественный анализ

Методы количественного анализа производных индола существенно не отличаются от методов количественного определения других веществ. Большинство авторов использует метод сравнения величины поверхности пятен стандартного и анализируемого образцов (Беннет-Кларк и сотрудники, Пашеко [2]).

Шрейер и Гедтке для обнаружения серотонина использовали 10%-ный раствор ксантгидрола в смеси метанола с уксусной кислотой (1 : 1). Хроматограмму выдерживали в атмосфере HCl до образования желтого фона. Обработка ксантгидролом приводила к возникновению синих пятен, которые элюировали смесью уксусной кислоты с метанолом (2 : 1). Для определения количества серотонина, присутствующего в элюате, определяли интенсивность окрашивания элюата при длине волны 580 мμ. Аналогичным образом Валента и сотрудники осуществляли количественный анализ аскорбингена (см. стр. 633). Однако Валента использовал элюирование непроявленного пятна. Затем в элюате проводили цветную реакцию с трихлоруксусной кислотой и определяли интенсивность окрашивания элюата. Этот метод, по-видимому, удобно использовать и для анализа остальных производных индола.

Кроме обоих указанных методов (сравнение величины пятен и фотометрическое определение вещества в элюате), Линзер и сотрудники для анализа ростовых веществ, содержащих индольное кольцо, использовали также биологические методы, т. е. количественную оценку данных «Пас-тентеста».

## Имидазолы

### А. Женишек

Хроматография на бумаге имидазолов оказала ценную помощь при изучении обмена гистидина. При помощи этого метода были открыты и идентифицированы многие соединения, образующиеся при расщеплении гистидина. Гистамин также часто исследовали с помощью метода хроматографии на бумаге. Для биогенеза пуринов большое значение имеет аминимидазолкарбоксамид и его производные.

Рассмотрим влияние строения некоторых имидазолов на величину  $R_f$ . Можно видеть, что по сравнению с гистидином у них наблюдается ослабление основного характера (например, гистидин и имидазолпропионовая кислота). Ослабление основного характера объясняется в данном случае потерей аминогруппы, в результате чего происходит значительное увеличение величины  $R_f$  (например, с 0,1 до 0,5 в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода; 4:1:5). Присутствие сопряженной двойной связи повышает  $R_f$  урокановой кислоты по сравнению с  $R_f$  насыщенной имидазолпропионовой кислоты (0,65 и 0,50 для той же системы). Добавление одного атома углерода в боковую цепочку имидазолпропионовой кислоты приводит к увеличению  $R_f$  с 0,32 (для имидазолпропионовой кислоты) до 0,50 (для имидазолуксусной кислоты). По данным Пасини и Верцеллоне, в *n*-бутаноле, насыщенном 1 н. соляной кислотой, *транс*-форма урокановой кислоты имеет меньшее значение  $R_f$  (0,20), чем *цис*-форма (0,25).

### Приготовление образца

Экстракцию гистамина из ткани проводят по Уэсту и Райли путем растирания ткани с 10%-ной трихлоруксусной кислотой с последующим центрифугированием полученного гомогената. Для осуществления количественного анализа гистамина Яманиси и сотрудники экстрагировали 10 г массы, растиравшейся с 5 г песка и 40 мл воды. Спустя 30 мин прибавляли 5 мл 6 н. соляной кислоты, после чего проводили центрифугирование. Получающиеся 25 мл жидкости упаривали до объема 10 мл. Приготовленный таким путем образец наносили на бумагу в количестве 25  $\mu$ л.

Исходя из доводов, приводившихся против обессоливания (см. стр. 95), мы старались избегать электролитического обессоливания также и для этих веществ. Женишек и Крал, а позже Хайс и сотрудники установили, что при обессоливании образцов пота, содержащих урокановую кислоту, из последней образуется имидазолпропионовая кислота. Упомянутые авторы наносили образцы пота непосредственно на бумагу. При анализе мочи необходимо сначала упаривать ее в вакууме и несколько

раз экстрагировать 80%-ным этанолом (Иноуэ). Северин и Федорова в случае незначительной концентрации имидазолов в анализируемом образце концентрировали их путем осаждения солями ртути в кислой среде с последующим выделением имидазолов сероводородом. Гистамин можно концентрировать из культивированной почвы амберлитом ИРЦ 50 (Пено и сотрудники).

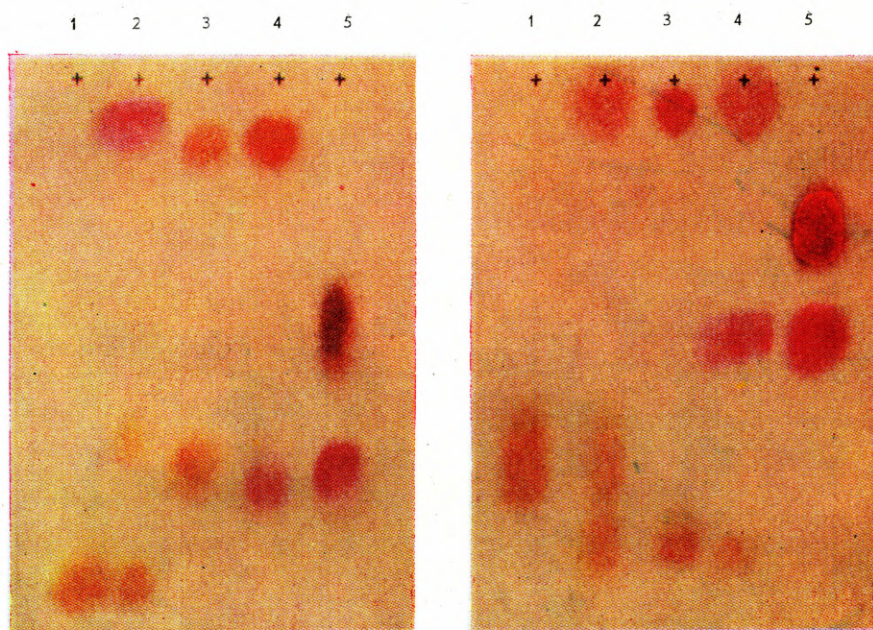
Де-Вай и сотрудники перед хроматографированием образца, содержащего гистидин, проводили реакцию азосочетания с диазотированным *n*-нитроанилином. Авторы установили, что образующийся в процессе реакции азосочетания окрашенный продукт представляет в случае некоторых соединений сложную смесь веществ.

### Обнаружение

Универсальной реакцией имидазолов является реакция азосочетания с диазотированными аминами, при которой на бумаге образуются ярко окрашенные пятна. Эту реакцию можно использовать для обнаружения большинства имидазолов, изучавшихся до настоящего времени в хроматографии. Чаще всего используют сульфаниламид, сульфаниловую кислоту (реактивы Паули; Д 51), *n*-хлоранилин и *n*-нитроанилин (см. также стр. 302). По нашим данным окраска продуктов реакции азосочетания с сульфаниламидом ярче окраски продуктов этой реакции с сульфаниловой кислотой. С сульфаниламидом гистидин и гистамин дают продукты, окрашенные в ярко-красный цвет, имидазолпропионовая кислота дает несколько менее ярко окрашенные продукты. Пятна урокановой кислоты имеют коричнево-оранжевый цвет, а пятна имидазолуксусной кислоты — фиолетово-красный (рис. 216). Для проявления метилгистидина, гистидина и гистамина можно также использовать нингидрин. Для производных с заместителями в положении 1 реакцию азосочетания использовать нельзя. Однако, по данным Коппе и Вуда, 1 метил-2-меркапто- и 1-метил-2-тиоцианоимидазол дают с реактивами Паули окрашенные продукты. Для проявления веществ с заместителями в положении 1 Каугилл использовал 1%-ный раствор йода в этаноле. В этом случае большинство веществ дает пятна с неустойчивой окраской, но все вещества дают пятна с устойчивой флуоресценцией. Однако с этим реактивом реагируют и остальные имидазолы, у которых положение 1 свободно. Проявление имидазолов, содержащих кето- или альдегидную группу в боковой цепи (например, имидазолпировиноградная кислота и имидазолметанал), можно проводить в присутствии остальных имидазолов с помощью 2,4-динитрофенилгидразина (Д 71). В этом случае для проявления и идентификации также используют облучение ультрафиолетовым светом. Для проявления соединений имидазола, содержащих серу, Коппе использовал, кроме реактивов Паули, реактивы Гроте (Д 11).

### Системы растворителей

Значения  $R_f$ , приведенные в табл. 113, позволяют быстро решить, какую систему растворителей удобно использовать в данном случае. При хроматографировании продуктов обмена гистидина нами были получены очень хорошие результаты для системы *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5); Иноуэ использовал в этом случае смесь, состоящую из бутанола, пиридина и воды (2 : 1 : 1). Хорошие результаты были получены нами и другими авторами при использовании *n*-бутанола, насыщен-



**Рис. 216.** Идентификация содержащихся в поте человека урокановой (имидазолакриловой) кислоты и других веществ, реагирующих с реактивом Паули.

Слева — система: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5); проявление проводили с помощью реактива Паули (D51).

1—10 мкг урокановой кислоты; 2—100 мкл пота, не подвергавшегося обессоливанию; 3 — 10 мкг гистидина и тирозина; 4—100 мкл пота, подвергнутого электролитическому обессоливанию; 5—10 мкг имидазолуксусной и имидазолпропионовой кислот. Отдельные пятна сверху вниз: гистидин (не отделяется от гистамина), имидазолуксусная кислота, тирозин, имидазолпропионовая кислота, урокановая кислота.

Справа — система: *n* - бутанол, насыщенный 1 н. соляной кислотой. Порядок пятен сверху вниз: гистидин, имидазолуксусная кислота, имидазолпропионовая кислота, урокановая кислота, тирозин.

Таблица 113

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ИМИДАЗОЛОВ

Ацетон 30	Уксусная н-та 1
$\text{CHCl}_3$ 5	н-Бутанол 1
Вода 4	Этилацетат 1
$\text{NH}_3$ 0,2	Вода 1
Каугилл	

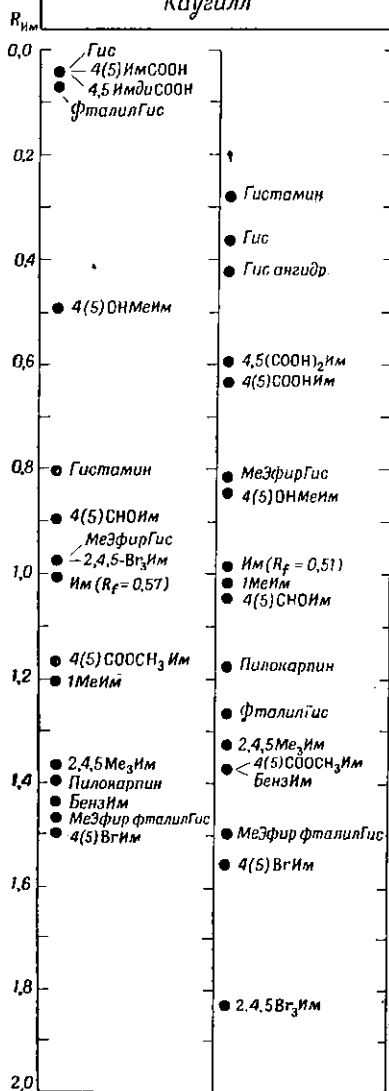
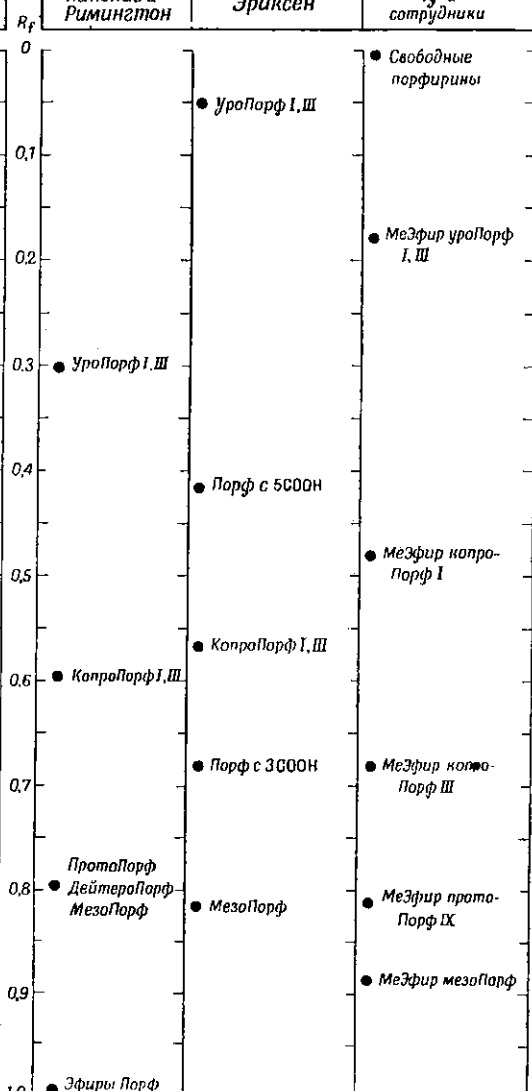


Таблица 114

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ПОРФИРИНОВ И ИХ ЭФИРОВ

2,4-Лутидин	2,6-Лутидин 5	Керосин I 4
Вода	Вода 3	$\text{CHCl}_3$ 2,6
$\text{NH}_3$ (атм.)	$\text{NH}_3$ (атм.)	Керосин II 5
Нисходящая	Восходящая	Пропанол I
Николас и Римингтон	Эриксен	Чу и сотрудинки



ного 1 н. соляной кислотой. С помощью этой системы Пасини и Верцелло не разделяли также *цис*- и *транс*-формы урокановой кислоты. Для отделения гистидина от гистамина можно использовать систему *н*-бутанол — вода — аммиак (7 : 2 : 1). Пено и сотрудинки рекомендуют прибавлять

к этой системе изопропанол, который способствует образованию небольших резко очерченных пятен. Каугилл использовал для разделения двадцати имидазолов смесь этанол — этиловый эфир — вода — аммиак (4:5:1:0,5).

В заключение следует отметить, что гистидин, содержащийся в биологическом материале, под влиянием присутствующего в образце хлористого натрия очень часто дает несколько пятен с различными значениями  $R_f$ . По данным Кейна и Кирби-Берри, этого можно избежать, если использовать систему *n*-бутанол — этанол — 2 н. соляная кислота (4:1:2). Подобным образом и гистамин дает иногда два пятна при использовании смеси бутанола с уксусной кислотой (Уэст и Райли). В этом случае образование двух пятен происходит под влиянием избыточного количества трихлоруксусной кислоты, использовавшейся для удаления белков.

### Количественный анализ

Количественное определение гистидина описано в главе об аминокислотах. Для определения урокановой кислоты в поте Крал и сотрудники использовали видоизмененный метод стандартной добавки, разработанный Кейном и Кирби-Берри. Надежность полученных результатов была доказана полярографически. Визуальное определение содержащегося в тканях гистамина, обнаруженного с помощью реактива Паули, можно осуществить с точностью  $\pm 15\%$  (Пено и сотрудники). Шмидт и Форхейер отделяли гистамин с помощью метода двумерной хроматографии, затем элюировали его 0,001 н. раствором соляной кислоты и проводили реакцию азосочетания с реактивом Паули, после чего фотометрически определяли его количество. Яманиси и сотрудники определяли концентрацию гистамина в экстракте мяса по величине образовавшихся на хроматограмме пятен (для проявления был использован нингидрин), величина которых зависит от логарифма концентрации.

## Производные пиррола

### А. Комаркова

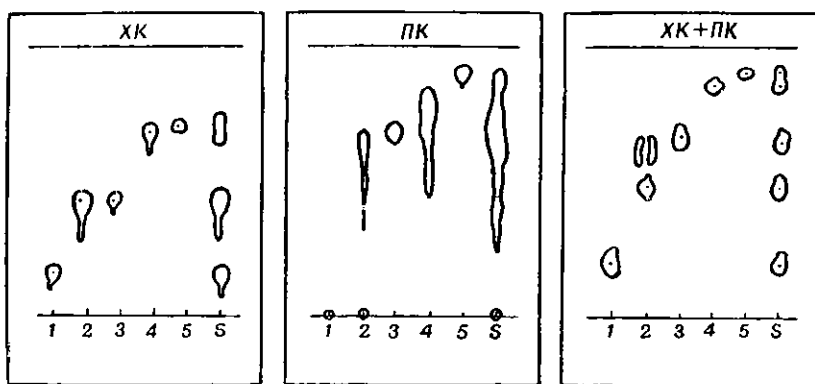
В этой статье рассмотрены порфирины, порфобилиноген и красящие вещества, содержащиеся в желчи и листьях растений. Витамин  $B_{12}$  и родственные ему вещества рассмотрены в главе о витаминах (стр. 623).

### ПОРФИРИНЫ

Для исследования порфиринов в последнее время было разработано большое число хроматографических методов и различных модификаций их. Однако лишь незначительная часть таких методов имеет принципиальное значение. Порфирины можно хроматографировать либо в свободном состоянии, либо в виде метиловых эфиров (табл. 114). Обычно значения  $R_f$  изменяются в обратном направлении по отношению к изменению числа карбоксильных групп (рис. 217 б).

### Приготовление образцов

Для приготовления образцов можно выбрать какой-либо обычный метод экстракции порфиринов из биологического материала. Наиболее



а

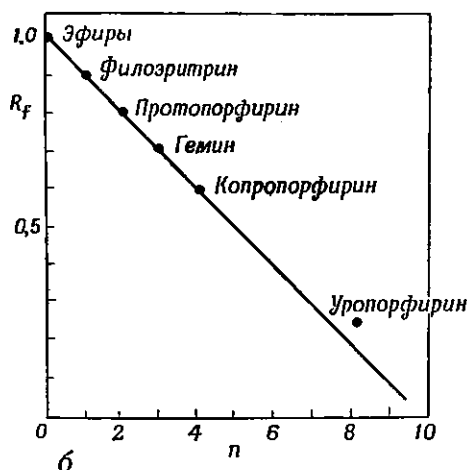
Р и с. 217а. Повторное пропускание растворителя при хроматографировании метиловых эфиров порфиринов (Чу и со-трудники).

ХК — система хлороформ — керосин; ПК — система *n*-пропанол — керосин; ХК+ПК — чередующееся пропускание обеих систем растворителей.

1 — уропорфин I; 2 — копропорфин I; 3 — копропорфин III; 4 — протопорфин IX; 5 — мезопорфин. S — смесь.

Р и с. 217б. Зависимость величин  $R_f$  порфиринов от числа карбоксильных групп в молекуле ( $n$ ) (Николас и Римингтон).

Система: лутидин — вода — аммиак. Дейтеропорфин, мезопорфин и гематопорфин имеют те же значения  $R_f$ , что и протопорфины (две группы COOH).



б

часто применяется метод Фишера и Шварца, при котором получают свободные порфирины. Конечный экстракт порфиринов в соляной кислоте упаривают в вакууме и после растворения его в 2 н. растворе аммиака наносят на бумагу. Для получения образцов, содержащих метиловые эфиры порфиринов, порфирины, находящиеся в соляной кислоте, этерифицируют метанолом, насыщенным газообразным хлористым водородом, или метанолом в смеси с концентрированной серной кислотой (19:1). Этерификацию необходимо проводить в течение не менее 4 час. Затем эфиры экстрагируют хлороформом. На бумагу наносят хлороформенный экстракт или ацетоновый экстракт, полученный после выпаривания хлороформа.

## Обнаружение

Обнаружение всех порфиринов проводят в ультрафиолетовом свете; порфирины дают красные флуоресцирующие пятна.

## Системы растворителей

*Хроматография свободных порфиринов.* Метод разделения свободных порфиринов впервые был разработан Николасом и Римингтоном, которые исследовали несколько известных систем растворителей. Наилучшие результаты были получены при использовании смеси 2,4- и 2,5-диметилпиридинов (лутидина), насыщенной водой, в атмосфере аммиака при 19°. Этим способом можно обнаружить уже 0,5 мкг стандартного вещества. В такой системе не удалось отделить дикарбоксильные производные и изомеры порфиринов. Кель и Штих [2], Эриксен, Корвин и Ортен, использовавшие те же самые методы с небольшими изменениями для разделения свободных порфиринов, подтвердили результаты Николаса и Римингтона. Следует также упомянуть об использовании 2,6-лутидина (вместо 2,4- или 2,5-лутидина) с водой (5:3) в атмосфере аммиака (Эриксен). С помощью этой смеси Эриксену удалось достигнуть лучшего разделения. Фальк [1] сообщает, что, видоизменив метод Эриксена, он разделил изомеры копропорфирина, причем не только изомеры I и III, но даже II и IV. Копропорфирин II передвигается с наибольшей скоростью, копропорфирины III и IV имеют одинаковую подвижность, копропорфирин I движется с наименьшей скоростью. Однако при таком порядке имеется возможность спутать порфирин, имеющий три карбоксильные группы, с копропорфирином II или, соответственно, копропорфирин I с порфирином, содержащим пять карбоксильных групп.

*Хроматография метиловых эфиров порфиринов.* Чу и сотрудники [1] использовали для разделения две системы: хлороформ — керосин (фракция 190—250°) в соотношении 2,6:4 и *n*-пропанол — керосин (1:5). Для хроматографирования использовали восходящий метод. Сначала хроматографировали в первой системе до высоты, находящейся от линии старта на расстоянии около 7,5 см. Затем бумагу вынимали из камеры и отмечали линию фронта карандашом. После высушивания и выравнивания температур хроматографировали во второй системе до той же высоты. С помощью этого метода можно разделить изомеры копропорфирина I и III, но не изомеры уропорфирина. Однако, как указывает Фальк [2], с помощью этого метода в смеси копропорфиринов I и III можно обнаружить только 25% отдельных изомеров, а для разделения изомеров II и IV этот метод вообще непригоден. Фальк и Бенсон [3] для разделения изомеров уропорфирина I и III использовали метод восходящего хроматографирования в системе керосин — хлороформ (4:6) с добавкой 1% этанола. Хроматографирование вели до тех пор, пока пятна не достигали приблизительно одной трети длины бумаги. После высушивания хроматограммы нижнюю полосу бумаги отрезали приблизительно на расстоянии 2 см от пятен. Затем хроматографировали в системе керосин — диоксан (4:1,5) в том же направлении до самого верха бумаги. Величина  $R_f$  уропорфирина I равна 0,02, а уропорфирина III — 0,5. Раппопорт и сотрудники отдавали предпочтение методу горизонтальной хроматографии в системе петролейный эфир — хлороформ (3:1) и гептан — дихлорэтан — *трет*-бутанол (20:1:1,5). Для устранения примесей при обработке биологического материала используют «вспомогательную»

систему растворителей петролейный эфир — хлороформ в соотношении 1:1. В этой системе хроматографируют приблизительно на 2 см от линии старта. При этом все примеси остаются на линии старта. В процессе дальнейшего хроматографирования используют приводившиеся выше системы растворителей. Для проведения быстрого ориентировочного анализа весьма удобна смесь толуол — метанол (10:0,1), предложенная Михальцем и Комарковой. Разделение изомеров с помощью этой смеси осуществить нельзя. Чу и Чу [2] для разделения метиловых эфиров дикарбоновых порфиринов использовали метод двумерной хроматографии на бумаге, обработанной силиконом. В первом направлении для хроматографирования использовали смесь керосина, тетрагидропирана и метилбензоата (5:1,4:0,35), а во втором — систему вода — ацетонитрил — *n*-пропанол — пиридин (3,8:1:2:0,5). Для разделения комплексных соединений порфиринов с железом Чу и Чу [3] используют метод обращенных фаз, применяя при этом бумагу, обработанную силиконом, и систему вода — *n*-пропанол — пиридин (5,5:0,1:0,4).

### Количественный анализ

Для количественного анализа порфиринов, разделенных на бумаге, Кель и Гюнтер [1] вырезали образованные порфиринами пятна и промывали их затем хлороформом. Перешедшие в элюат порфирины омыляли 7,8 н. соляной кислотой, после чего определяли интенсивность флуоресценции.

### ПОРФОБИЛИНОГЕН

Хроматография порфобилиногена имеет значение главным образом при проверке его чистоты при выделении из биологического материала в виде кристаллов, как это описывают Уэстолл, а также Куксон и Римингтон. В других случаях его идентификация в биологическом материале с помощью хроматографии не имеет большого практического значения. Для проявления порфобилиногена можно использовать либо опрыскивание хроматограммы реактивом Эрлиха, либо облучение ультрафиолетовым светом после нагревания хроматограммы в течение 15 мин при 100° в сосуде, заполненном парами уксусной кислоты (в результате такой предварительной обработки порфобилиноген превращается в порфирин). В качестве разделяющей смеси Уэстолл использовал шесть систем растворителей. Наибольшее значение из них имеют следующие системы: этилацетат — пиридин — вода (50:22,5:50;  $R_f$  0,17); этилацетат — уксусная кислота — вода (25:5:20;  $R_f$  0,27); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5;  $R_f$  0,51). Последняя система была также использована Римингтоном и Кролем для обнаружения лактамной формы порфобилиногена.

### КРАСИТЕЛИ, СОДЕРЖАЩИЕСЯ В ЖЕЛЧИ

Разделение уробилина и стеркобилина является актуальной проблемой, имеющей большое значение. В настоящее время существует лишь небольшое число работ, посвященных хроматографическим методам исследования этих веществ, причем часто результаты этих работ сомнительны. До сих пор нет ни одного надежного метода разделения обоих пигментов.

### Приготовление образцов

Большинство авторов используют в хроматографии стеркобилина и уробилина чистые образцы или хроматографируют конечные продукты, используя при этом известные, обычно применяемые реакции, например реакции Гмелина, Эрлиха и мезобиливиолиновую. При хроматографировании билирубина точно так же использовали или чистые метчики, или спировой экстракт из сыворотки желчи; некоторые авторы наносили на бумагу непосредственно нативную сыворотку желчи.

### Обнаружение

Обнаружение всех этих веществ является в общем несложным, поскольку здесь мы большей частью имеем дело с веществами, которые уже своей окраской указывают положение отдельных пятен. Для более точной идентификации уробилина и стеркобилина используют реактив Шлезингера (Д 157). После обработки этим реактивом хроматограмму изучают в ультрафиолетовом свете. Действие ультрафиолетового света вызывает желто-зеленое свечение комплексных соединений цинка с этими пигментами. Для идентификации уробилиногена и стеркобилиногена можно использовать реактив Эрлиха. Для обнаружения билирубина бумагу можно опрыскивать диазореактивом (Д 51); для различения прямого и непрямого билирубина используют реакцию Берга.

### Системы растворителей

Гор и сотрудники использовали две системы: смесь пропанола с водой (7:3) или хлороформ. Пигменты с центральным метиленовым мостиком (например, билирубин) передвигаются в хлороформе и остаются на линии старта в пропаноле, и, наоборот, пигменты с центральным метиновым мостиком (например, уробилин и стеркобилин) передвигаются в пропаноле и остаются на линии старта в хлороформе. Отделить уробилин от стеркобилина не удалось. Для разделения пигментов, образующихся в процессе реакции Гмелина, эти авторы использовали систему бензол — хлороформ — метанол (0,5:1,8:0,5). Значения  $R_f$ , полученные для билирубина, биливердина, билипурпурина и холетелина, соответственно были равны 0,93; 0,55; 0,64; 0,76. Однако практическое значение этого метода невелико. Несколько лучшие результаты при идентификации уробилиногена были получены Гором и сотрудниками, хроматографировавшими конечный продукт мезобиливиолиновой реакции в смеси циклогексана с хлороформом и метанолом (0,5:1,8:0,1). Происходящее в результате указанной реакции образование мезобиливиолина ( $R_f$  0,65) подтверждает присутствие уробилиногена.

Для разделения так называемых «прямого» и «непрямого» билирубина были использованы самые разнообразные системы. Эти системы подбирали опытным путем, поскольку химическое строение обоих пигментов было неизвестным. Естественно, что в различных системах были получены противоречивые результаты. Так, например, Грис и сотрудники и Шарбонье и сотрудники установили, что при использовании чистого хлороформа «прямой» билирубин остается на линии старта, а «непрямой» движется с фронтом растворителя. Если же, однако, использовать водные растворы буферов с разными значениями pH (Грис и сотрудники), то в кислых и нейтральных растворах, наоборот, «непрямой» билирубин

оставался на линии старта, а перемещался «прямой» билирубин ( $R_f$  0,5—0,6). Такое же разделение обоих пигментов было получено и Коитио в системе вода—метанол (2 : 1). Лишь исследования последних лет, посвященные выяснению химического характера обоих пигментов, показали, что производные билирубина, реагирующие «прямо», обладают большей полярностью и поэтому должны двигаться быстрее в более полярных системах, а в менее полярных системах — отставать. Производные билирубина, реагирующие «непрямо», являются липофильными пигментами и для них характерны противоположные закономерности. Наилучшим методом мы считаем метод Йирса (не опубликован), который применял пробирочное устройство. Для хроматографирования была использована система метанол — уксусная кислота — хлороформ (1 : 0,5 : 10). «Непрямой» билирубин (т. е. сам билирубин) перемещается с фронтом растворителя. «Прямой» билирубин дает два пятна; для пятна, находящегося на линии старта, характерна быстрая реакция с диазореактивом, для второго пятна ( $R_f$  0,5) эта реакция протекает медленнее. Хроматография билирубина применяется при исследовании характера его производных, встречающихся в природе; для клинической практики или диагностики она имеет меньшее значение.

## *Красящие вещества, содержащиеся в листьях растений*

*Ч. Михалец*

### **Приготовление образцов**

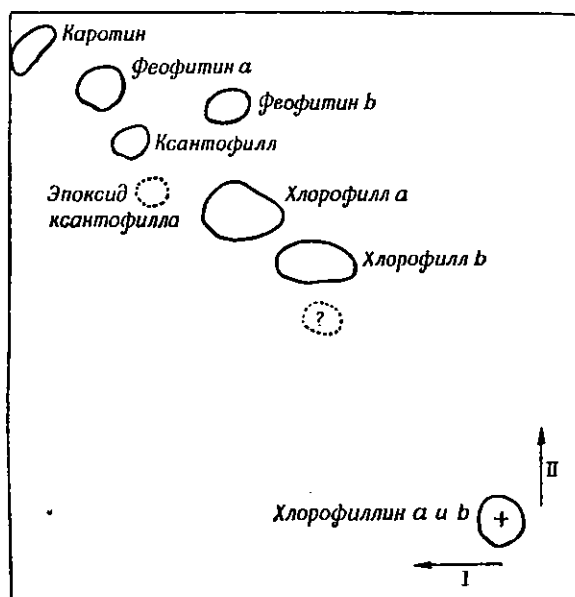
Для проведения хроматографического анализа красящих веществ, содержащихся в листьях, необходимо, чтобы приготовление экстрактов и весь анализ осуществлялись весьма быстро в инертной среде и в темноте. Эти требования следует выполнять для того, чтобы предотвратить изменения анализируемых веществ, происходящие в результате окисления под действием света. Для получения экстрактов красящих веществ растения растирают вместе с песком в ступке или превращают их в однородную массу в гомогенизаторе, куда прибавляют также следы углекислого кальция для нейтрализации кислот. Измельченную массу экстрагируют смесью бензина с метанолом (6 : 14) и отсасывают ее на фильтре, покрытом тонким слоем талька. Полученный прозрачный экстракт тотчас же необходимо анализировать (см. также стр. 603).

### **Обнаружение**

Благодаря тому что разделяемые красящие вещества обладают характерным окрашиванием, идентификация их сравнительно проста. Кроме того, для идентификации можно использовать облучение ультрафиолетовым светом, которое вызывает флуоресценцию большинства красящих веществ, содержащихся в листьях. Флуоресценция будет иметь различные оттенки, начиная с розового и кончая красным.

### Системы растворителей

Бауэр для разделения красящих веществ, содержащихся в листьях, использовал как метод одномерной, так и метод двумерной хроматографии. Разработанные им методики позволяют проводить анализ весьма быстро. При этом достигается достаточно хорошее разделение красящих веществ. Уже хроматографирование в первом направлении дает для системы бензин — петролейный эфир — ацетон (10 : 2,5 : 2) полное разделение хлорофиллов *a* и *b*. При проведении хроматографирования в системе бензин — петролейный эфир — ацетон — метанол (10 : 2,5 : 1 : 0,25) во втором



Р и с. 218. Разделение пигментов, содержащихся в листьях растений (Бауэр).  
Системы растворителей: первое направление: бензин — петролейный эфир — ацетон (20 : 5 : 4);  
второе направление: бензин — петролейный эфир — ацетон — метанол (40 : 10 : 4 : 1).

направлении происходит разделение остальных веществ (рис. 218). Образующиеся пятна хорошо воспроизводятся и имеют округлую или эллиптическую форму. Для осуществления еще лучшего разделения Линд и сотрудники рекомендуют сконцентрировать нанесенные вещества на определенной линии путем кратковременного хроматографирования в ацетоне, затем хроматографировать, например, в петролейном эфире, после чего продолжить процесс в обоих направлениях, используя системы растворителей, применяемые Бауэром. Сапожников и сотрудники использовали для двумерного хроматографирования более простые системы: в первом направлении хроматографируют смесью бензола с петролейным эфиром (3 : 1), во втором — смесью этанола с петролейным эфиром (1 : 14). Были получены точно такие же результаты разделения. Кристаллические хлорофилл-липопротеины были разделены Тибой [1, 2] при помощи смеси пикслин — вода (1 : 1), а разделение хлорофиллов *a* и *b* было осуществлено им в системе толуол — этанол (20 : 0,1). Весьма интересны результаты, полученные Стрейном при разделении содержащихся в растениях пигментов на бумаге, пропитанной глицерином или вазелином или обра-

ботанной каким-либо другим способом. Используя опыт разделения хлорофиллов на колонках сахарозы, Спорер и сотрудники применили для их хроматографирования бумагу, пропитанную сахарозой, и систему, состоящую из *n*-гексана с добавкой 0,5% *n*-пропанола. Разделение такое же, как и при адсорбционной хроматографии. Во всех описанных случаях хроматографирование вели при комнатной температуре восходящим методом.

### Количественный анализ

При проведении количественного определения хлорофиллов Сиронваль [1, 2] использовал хроматографирование тетрахлорметаном в петролейном эфире; разделенные компоненты он элюировал сероуглеродом, а затем определял их спектрофотометрически. Кондо и Мори для определения хлорофилла в дентине рекомендуют использовать метод «количественного мостика» (см. стр. 182). Точность анализа хлорофилла этим методом составляет около 5%.

## Другие группы веществ

К. Мацек

### ГИДАНТОИНЫ

Винь и Фондарэ, которым принадлежит обширное исследование по обнаружению этих веществ, рекомендуют использовать для их проявления полчасовое облучение ртутной лампой низкого давления с последующим наблюдением флуоресценции в ультрафиолетовом свете (фильтр Вуда) либо хлорирование хлорноватистым ангидридом с последующим опрыскиванием йодом (Д 7). Проявление по обоим этим методам можно проводить последовательно на одной и той же бумаге. Для отделения 5-фенил-5'-этилгидантоина ( $R_f$  0,13) от 3-метил-5-фенил-5'-этилгидантоина ( $R_f$  0,75) и 5,5'-дифенилгидантоина ( $R_f$  0,0) или 3-метил-5,5'-дифенилгидантоина ( $R_f$  0,0) указанные авторы использовали смесь пентан — пиридин (100 : 1), насыщенную бензальдегидом и водой.

Данные о хроматографировании тиогидантоина приведены на стр. 480 и 489.

### ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРАЗОЛОНА

Банкмюллер использовал для проявления хлорное железо. Дильман считает, что в этом случае лучше использовать *n*-диметиламинобензальдегид (Д 102), который является более чувствительным реактивом и, кроме того, с различными производными дает различное окрашивание. Для разделения можно использовать обычные двухфазные кислые системы, например систему *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Значения  $R_f$  различных производных пиразолонa и данные об окрашивании с *n*-диметиламинобензальдегидом представлены в табл. 115.

Таблица 115

РЕАКЦИИ И ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ПРОИЗВОДНЫХ ПИРАЗОЛОНА  
В СИСТЕМЕ *n*-БУТАНОЛ — УКСУСНАЯ КИСЛОТА — ВОДА (4:1:5)  
(Дильман)

Производное пиаразолонa	$R_f$	Окрашивание (Д 102)
1-Фенил-2,3-диметил-4-ацетоксиацетиламинопиразолон-5 (пидилон) . . . . .	0,88	ж.
1-Фенил-2,3-диметил-(диэтиламиноацетиламино)-4-пи- разолон-5 . . . . .	0,64	св. ж.
1-Фенил-2,3-диметил-(диэтиламиноацетил)-4-пиразолон-5	0,67	ф.
1-Фенил-2,3-диметилпиразолон-5 (антипирин) . . . . .	0,93	ф.
1-Фенил-2,3-диметил-4-аминопиразолон-5 (аминоантипи- рин) . . . . .	0,58	ж.
1-Фенил-2,3-диметил-4-диметиламинопиразолон-5 (пира- мидон) . . . . .	0,65	ж. а)
Na-соль 1,2-дифенил-3,5-диоксо-4- <i>n</i> -бутилпиразолидина (бутазолидин) . . . . .	0,95	о. а)

а) Реакция протекает медленно.

#### ПРОИЗВОДНЫЕ ТЕТРАЗОЛА

По данным Кайзера и Йори, эти вещества можно обнаруживать с помощью реактива Драгендорфа (Д 144). Отделение кардиазола ( $R_f$  0,86) от корамина ( $R_f$  0,32) можно осуществить в *n*-бутаноле, насыщенном 0,1 н. соляной кислотой.

#### ПИПЕРАЗИНЫ

Кастильони и Ниволи рекомендуют использовать для проявления пары йода (Д 26). Для хроматографирования оказалась пригодной система, предложенная Бангэмом: пиридин — амиловый спирт — вода (35:35:30). В этом случае бумагу лучше всего пропитывать буферным раствором с наиболее высоким значением pH. Этим способом были разделены пиперазин ( $R_f$  0,1), метилпиперазин ( $R_f$  0,8—0,9), диэтилкарбамилпиперазин ( $R_f$  0,6—0,65) и диэтилкарбамазин ( $R_f$  0,75).

#### ТРИАЗИНЫ

Эти вещества, по данным Регнельта, можно обнаруживать путем опрыскивания хроматограммы 1%-ным раствором формальдегида, и после его испарения при 110° — реактивом Шиффа (Д 158). 2,4-Диамино-1,3,5-триазины, замещенные в положении  $C_{(6)}$  различными алкильными группами, можно хорошо разделять в системе *n*-пропанол — вода (8:2). Значения  $R_f$  обычно увеличиваются с длиной алкильной цепи. Замещение аминогруппой (меламин) приводит к уменьшению величины  $R_f$ . Еще более

значительное уменьшение величины  $R_f$  происходит в том случае, когда в качестве заместителя присутствует оксигруппа (аммелин).

### ПРОИЗВОДНЫЕ ХИНОЛИНА

Многие производные хинолина уже были рассмотрены в главе, посвященной алкалоидам (стр. 538). Здесь мы рассмотрим вопрос разделения некоторых оксипроизводных хинолина. Для обнаружения этих веществ можно использовать их флуоресценцию в ультрафиолетовом свете в атмосфере аммиака или соляной кислоты (Смит и Уильямс), а также обработку хлорным железом (Д 53; Вегнер). Для проявления веществ, содержащих фенольные группы, можно использовать реактив Паули (Д 51; Макино, Арай). Для хроматографирования Смит и Уильямс брали систему бензол — *n*-бутанол — аммиак (2 : 5 : 2) или смесь *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). По данным Макино и Арай, с помощью этой системы можно хорошо разделить 4,8-диоксихинолин ( $R_f$  0,79) и 4,8-диоксихинолин-2-карбоновую кислоту (ксантуреновая кислота,  $R_f$  0,45).

### ФЕНАЗИНЫ

Для хроматографического разделения пиоцианина и 1-оксифеназина Мус и Роуэн использовали систему *трет*-бутанол — муравьиная кислота — вода (70 : 15 : 15) или этилацетат, насыщенный водой.

### ЛИТЕРАТУРА

- Allouf R., Munier R., Bull. Soc. Chim. biol., 34, 196 (1952).  
 Ames B. A., Mitchell A. K., J. Am. Chem. Soc., 74, 252 (1952). [1]  
 Ames B. A., Mitchell A. K., J. biol. Chem., 212, 687 (1955). [2]  
 Bangham D. R., Brit. J. Pharmacol., 10, 397 (1955).  
 Bate-Smith E. C., Westall R. G., Biochim. biophys. Acta, 4, 427 (1950).  
 Baudet J., Compt. rend., 239, 2454 (1952).  
 Bauer L., Naturwissenschaften, 39, 88 (1952).  
 Bennet-Clark T. A., Tambiah M. S., Kefford N. P., Nature, 169, 452 (1952).  
 Cain L., Kirby-Berry H., Univ. Texas Publ., 5109, 77 (1951).  
 Castiglioni A., Nivoli M., Z. anal. Chem., 138, 187 (1953).  
 Clerk-Bory M., Pacheco H., Mentzer Ch., Compt. rend., 238, 525 (1954).  
 Cookson G. H., Rimington C., Biochem. J., 57, 476 (1956).  
 Corwin L. M., Orten J. M., Anal. Chem., 26, 609 (1954).  
 Cowgill R. W., Anal. Chem., 27, 1519 (1955).  
 Cuthbertson W. F. J., Ireland D. M., Biochem. J., 52 XXXIV (1952). [1]  
 Cuthbertson W. F. J., Ireland D. M., Wolff W., Biochem. J., 55, 669 (1953). [2]  
 Demoen P., Janssen P., van de Keere B., Živković D., Arch. int. Pharmacodyn., 98, 427 (1954).  
 De Vay J. E., Chang N. H., Hossfeld R. L., J. Am. Chem. Soc., 73, 4977 (1951).  
 Dihlmann W., Naturwissenschaften, 40, 510 (1953).  
 Eriksen L., Scand. J. clin. Invest., 5, 155 (1953).  
 Erspamer V., Boretti G., Arch. int. Pharmacodyn., 88, 296 (1951).  
 Falk J. E., Biochem. Soc. Symp., 12, 17 (1954). [1]  
 Falk J. E., в книге «Porphyrin Biosynthesis and Metabolism», Ciba Found. Symp., London, 1955, стр. 63, 154. [2]  
 Falk J. E., Benson A., Biochem. J., 55, 101 (1953). [3]  
 Fischer A., Planta, 43, 288 (1954).

- Fischer H., Z. physiol. Chem., 96, 177 (1915).
- Frankenburg W. G., Gottscho A. M., Vaitekunas A. A., Zacharius R. N., J. Am. Chem. Soc., 77, 5730 (1955).
- Gohr H., Heinen W., Gorges T., Kersten G., Z. ges. inn. Med., 11, 310 (1956).
- Gries G., Gedigk P., Georgi J., Z. physiol. Chem., 298, 132 (1954).
- Hais I. M., Král J., Ženíšek A., Čas. Lék. čes., 92, 974 (1953).
- Hashizume T., Nature, 173, 645 (1954).
- Holman W. I. M., Biochem. J., 56, 513 (1954).
- Huebner C. F., Nature, 167, 119 (1951).
- Charbonnier A., Mendiorez B. A., Rodriguez J. V., Arch. Soc. biol., Montevideo, 21, 64 (1954).
- Chiba Y., Arch. Biochem., 54, 83 (1955). [1]
- Chiba Y., Noguchi I., Cytologia, 19, 41 (1954). [2]
- Chu T. C., Green A. A., Chu E. J., J. biol. Chem., 190, 643 (1951). [1]
- Chu T. C., Chu E. J., J. biol. Chem., 208, 537 (1954). [2]
- Chu T. C., Chu E. J., J. biol. Chem., 212, 1 (1955). [3]
- Inoue M., Nagasaki Iggakai Zasshi, 28, 1283 (1953).
- Jepson J. B., Stevens B. J., Nature, 172, 772 (1953).
- Jerchel D., Jacobs W., Angew. Chem., 65, 342 (1953). [1]
- Jerchel D., Jacobs W., Angew. Chem., 66, 298 (1954). [2]
- Jerchel D., Müller R., Naturwissenschaften, 38, 561 (1951). [3]
- Johnson B. C., Lin P. H., J. Am. Chem. Soc., 75, 2971 (1953).
- Jones A., Taylor M. P., Gore D. N., Chemistry and Industry, 1954, 461.
- Kaiser H., Jori H., Arch. Pharm., 287, 253 (1954).
- Kehl R., Günther B., Z. physiol. Chem., 297, 254 (1954). [1]
- Kehl R., Stich W., Z. physiol. Chem., 289, 6 (1951). [2]
- Kodicek E., Reddi K. K., Nature, 168, 475 (1951).
- Koeppe R. E., Wood J. L., J. Am. Chem. Soc., 75, 4655 (1953).
- Koichio K., Igaku Kenkyu, 23, 572 (1953); ref. Exc. Med. VI, 8, 588 (1954).
- Kondo S., Mori I., J. pharm. Soc. Japan, 75, 519 (1955).
- Král J. A., Kútová M., Ženíšek A., Krejčí E., Stolz I., Biochim. biophys. Acta, 20, 567 (1956).
- Kuffner F., Faderl N., Monatsh. Chem., 86, 995 (1955).
- Leifer E., Langham W. H., Nyc J. F., Mitchell H. K., J. biol. Chem., 184, 589 (1950).
- Leonhardi G., Naturwissenschaften, 40, 621 (1953). [1]
- Leonhardi G., Naturwissenschaften, 41, 141 (1954). [2]
- Leuschner F., Arch. exper. Path. Pharmacol., 221, 323 (1954). [1]
- Leuschner F., Arzneim.-Forsch., 4, 686 (1954). [2]
- Lind E. F., Lane H. C., Gleason L. S., Plant Physiol., 28, 325 (1953).
- Linser H., Mayr H., Maschek F., Planta, 44, 103 (1954).
- Luckwill L. C., Nature, 169, 375 (1952).
- Macek K., Pelcová V., Vejdělek Z. J., Českoslov. Farm., 5, 73 (1956).
- Makino K., Arai K., Science, 121, 143 (1955).
- Michalec Č., Komárková A., Naturwissenschaften, 43, 19 (1956).
- Moos W., Rowen J. W., Arch. Biochem. Biophys., 43, 88 (1953).
- Monier R., Bull. Soc. Chim. biol., 33, 857 (1951).
- Nehring K., Pharmazie, 9, 221 (1954).
- Nicholas R. E. H., Rimington C., Scand. J. clin. Labor. Inv., 1, 12 (1949).
- Pacheco H., Bull. Soc. Chim. biol., 33, 1915 (1951). [1]
- Pacheco H., Compt. rend., 237, 110 (1953). [2]
- Pasini C., Vercellone A., Gazz. chim. Ital., 85, 349 (1955).
- Pénau H., Saias E., Andretti C., Ann. pharm. franç., 10, 514 (1952).
- Procházka Z., Chem. Listy, 47, 1643 (1953). [1]
- Procházka Z., Šanda V., Macek K., Chem. Listy (в печати). [2]
- Rapport D. A., Calvert C. R., Loeffler R. K., Gast I. H., Anal. Chem., 27, 820 (1955).
- Reddi K. K., Kodicek E., Biochem. J., 53, 286 (1953).
- Rehnelt K., Monatsh. Chem., 86, 651 (1955).
- Reichl E. R., Monatsh. Chem., 86, 69 (1955).
- Rimington C., Krol S., Nature, 175, 630 (1955).
- Сапожников Д. И., Бронштейн И. А., Красовская Т. А., Биохимия 20, 286 (1955).
- Sen S. P., Leopold A. C., Physiol. Plant., 7, 98 (1954).

- Северин С. Е., Федорова В. Н., Биохимия, 16, 286 (1951).  
Schauer H. K., Bulirsch R., Z. Naturforsch., 10b, 683 (1955).  
Schmidt F., Vorheier D., Naturwissenschaften, 42, 392 (1955).  
Schreier K., Gaedtke K., Naturwissenschaften, 43, 130 (1956).  
Schwartz S., J. Lab. clin. Med., 37, 843 (1951).  
Sironval C., Arch. intern. Physiol., 41, 563 (1953). [1]  
Sironval C., Physiol. Plant., 7, 523 (1954). [2]  
Smith J. N., Williams R. T., Biochem. J., 56, 325 (1954).  
Sporer A. H., Freed S., Sancier K. M., Science, 119, 68 (1954).  
Stove B. B., Thimann K. V., Arch. Biochem. Biophys., 51, 499 (1954).  
Strain H. H., J. phys. Chem., 57, 638 (1953).  
Urbach K. F., Giscafré L., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 68, 430 (1948).  
Valenta M., Kutáček M., Icha F., Sborník CSAZV, 29, 193 (1956).  
Vigne J. P., Fondarai J., Bull. Soc. chim. France, 1956, 124.  
Walker W. R., Austral. J. Sci., 13, 26, 84 (1950); C. A., 45, 1912, 3146 (1951).  
Wankmüller A., Naturwissenschaften, 39, 302 (1952).  
Wegner E., Z. Lebensm.-Unters., 102, 34 (1955).  
Weller L. E., Wittwer S. H., Sell H. M., J. Am. Chem. Soc., 76, 629 (1954).  
West C. B., Riley J. F., Nature, 174, 882 (1954).  
Westall R. G., Nature, 170, 614 (1952).  
Yamanishi T., Hanai S., Fukuhara K., Inagaki C., Natural.  
Sci. Rep. Ochanomizu Univ., 5, 101 (1954); ref. Anal. Abstr., 2, 1032 (1955).  
Ženíšek A., Král J. A., Biochim. biophys. Acta, 12, 479 (1953).

# ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ СЕРУ

---

*И. Гаспарич*

В этой главе будут рассмотрены алкилсульфаты, сульфокислоты, сульфонамиды, производные тиомочевины и соли сульфония. Некоторые органические соединения серы из практических соображений рассмотрены в тех же главах, что и аминокислоты и пептиды (метионин, цистин, цистеин, дьенколовая кислота, лантионин, гомоцистеин, таурин, фенилтиогидантоины и т. п.), витамины ( $B_1$ , липоевая кислота, кофермент А в разделе о пантотеновой кислоте, биотин), сахара (гепарин и т. п.), инсектициды (паратион и т. п.), антибиотики (пенициллин и пептидные антибиотики), гетероциклические соединения, содержащие азот (тиобарбитураты, меркаптопурин), амины (тауроциамин), спирты (ксантаты) и т. п.

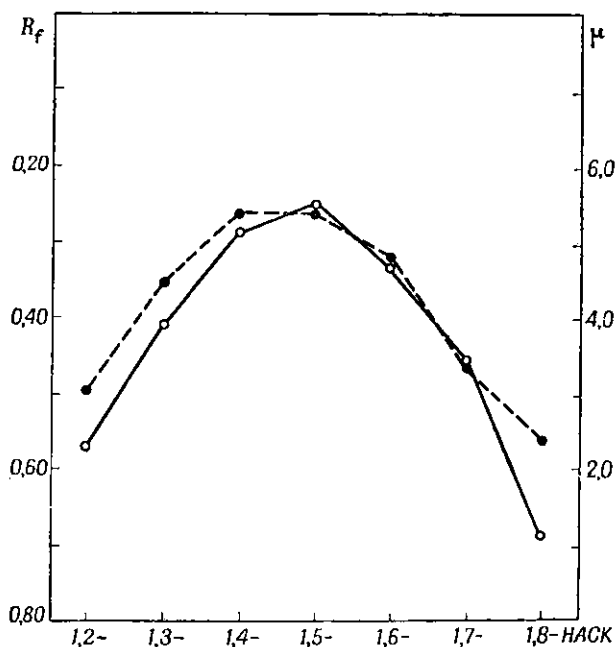
## АЛКИЛСУЛЬФАТЫ

1-Алкил- и 2-алкилсульфаты с алкилами  $C_8 - C_{18}$ , содержащими четное число атомов углерода, являются важными техническими продуктами в текстильной промышленности. Для проявления этих веществ можно использовать или пинакриптоловый желтый (Холнесс и Стоун), или ацетат меди (II) и родамин 6GB (Франкс; *Д 159*). При использовании необработанной бумаги для хроматографирования сульфатов с алкилами  $C_8 - C_{12}$  пригодна система, состоящая из 15%-ного водного раствора этанола, а для определения сульфатов с алкилами  $C_{14} - C_{18}$  — 40%-ный водный раствор этанола (Холнесс и Стоун). При использовании бумаги, пропитанной цетиловым спиртом, в качестве подвижной фазы пригоден 50—70%-ный этанол (Франкс).

## СУЛЬФОКИСЛОТЫ

На поведение ароматических сульфокислот при их хроматографировании прежде всего оказывает влияние число сульфогрупп в молекуле,

затем присутствие других заместителей и взаимное расположение групп. Обычно увеличение числа сульфогрупп существенно снижает величину  $R_f$  (табл. 116 и рис. 219). Если молекула сульфокислоты содержит также группы OH или  $\text{NH}_2$ , то влияние этих групп на величину  $R_f$  будет в основном определяться их положением по отношению к сульфогруппе. Из рис. 220 видно, что чем меньше расстояние между обеими группами, тем больше величина  $R_f$  соответствующего производного (Латинак [1, 2]). Следует



Р и с. 220. Сравнение величин  $R_f$  (○) и значений дипольных моментов (●) изомерных 1-нафтиламиносульфокислот (НАСК).

отметить, что для нафтиламиносульфокислот указанной группы величина  $R_f$  всегда меньше, чем для соответствующих нафтолсульфокислот. Франц и Латинак объясняют влияние положения заместителей взаимосвязью, существующей между величиной  $R_f$  и дипольным моментом (рис. 220). Однако при проведении хроматографического разделения на бумаге, пропитанной буферными растворами, поведение этих кислот становится несколько иным. Это явление в некоторых случаях было использовано Латинаком и Скалицким [3, 4] для улучшения разделения, а также при идентификации неизвестных примесей в полупродуктах, применяемых для получения красителей. При использовании бумаги, пропитанной бикарбонатом натрия, и системы, состоящей из *n*-пропанола и водного раствора бикарбоната (II 126), проявляется влияние слабокислых оксигрупп нафтолсульфокислот. Если оксигруппа обладает настолько высокой константой диссоциации, что она диссоциирует на пропитанной бумаге, это приводит к повышению растворимости кислот в неподвижной фазе, благодаря чему происходит уменьшение величины  $R_f$  (рис. 221, б). Это уменьшение зависит от величины константы диссоциации оксигруппы. Если  $pK_2$  кислот меньше 9,2, происходит уменьшение величины  $R_f$ ;

Таблица 116

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  И ПРОЯВЛЕНИЕ НАФТОЛСУЛЬФО-, НАФТИЛАМИНОСУЛЬФО- И АРИЛАМИНОНАФТАЛИНСУЛЬФОКИСЛОТ (Латинак)

Кислота	Положение групп			n-Бутанол 4 уксусная кислота Вода	n-Бутанол 3 Пиридин Вода	n-Пропанол Вода NaHCO <sub>3</sub> (П 126)	Проявление	
	ОН	NH <sub>2</sub>	SO <sub>3</sub> H				ультрафиоле- товый свет <sup>а)</sup>	окрашивание (Д 50) <sup>а)</sup>
1-Нафтол-3,6,8-трисуль- фо . . . . .	1	—	3,6,8	0,02	0,02	0,06	б. син. б)	малин. кр.
сультон . . . . .	—	—	3,6	0,17	0,23	—	ж. в)	ф. син.
ε . . . . .	1	—	3,8	0,10	0,14	0,47	б. син. б)	кр. о.
сультон . . . . .	—	—	3	0,71	0,73	—	з. ж. в)	кр. ф.
δ . . . . .	1	—	4,8	0,09	0,21	0,39	б. син. б)	о.
1-Нафтол-2-сульфо . . . . .	1	—	2	0,79	0,80	0,85	ф. б)	о.
1-Нафтол-3-сульфо . . . . .	1	—	3	0,61	0,69	0,58	тм. син. б)	о.
Невилля — Винтера . . . . .	1	—	4	0,52	0,67	0,34	тм. син. б)	о.
Нафтол — Л . . . . .	1	—	5	0,50	0,67	0,57	б. син. б)	кр. о.
Шоллкопфа . . . . .	1	—	8	0,72	0,77	0,91	син. б. б)	кр. о.
сультон . . . . .	—	—	—	0,96	0,96	—	ж. в)	св. син. в)
2-Нафтол-3,6,8-трисуль- фо . . . . .	2	—	3,6,8	0,02	0,02	0,09	св. з.	малин. кр.
R . . . . .	2	—	3,6	0,04	0,11	0,09	св. син.	малин. кр.
G . . . . .	2	—	6,8	0,05	0,12	0,09	св. син.	ж. о.
окси-Тобиаса . . . . .	2	—	1	0,71	0,80	0,94	— б)	—
Шеффера . . . . .	2	—	6	0,47	0,66	0,61	(тм. син.)	о. кр.
F . . . . .	2	—	7	0,48	0,66	0,65	(син. ф.)	а.
Кроцеиновая . . . . .	2	—	8	0,54	0,70	0,68	св. син.	ж. о.
Коха . . . . .	—	1	3,6,8	0,00	0,08	0,05	ж. з.	кр. ф.
Амино-ε . . . . .	—	1	3,8	0,14	0,08	0,33	син. з.	кр. ф.
1-Нафтиламино-2-сульфо . . . . .	—	1	2	0,57	0,63	0,89	син. ф.	ф. син.
1-Нафтиламино-3-сульфо . . . . .	—	1	3	0,41	0,47	0,79	син. ф.	ф. кр.
Нафтионовая . . . . .	—	1	4	0,29	0,42	0,69	св. син.	кр. ф.
Лаурента . . . . .	—	1	5	0,26	0,44	0,68	син. з.	ф.
Клеве . . . . .	—	1	6	0,34	0,48	0,77	св. син.	син. ф.
Клеве . . . . .	—	1	7	0,46	0,54	0,81	св. син.	кр. ф.
перидин . . . . .	—	1	8	0,69	0,63	0,86	ж. з.	син. ф.
Амино-Г . . . . .	—	2	6,8	0,03	0,04	0,21	св. син.	о. ж.
2-Нафтиламино-5,7-ди- сульфо . . . . .	—	2	5,7	0,03	0,06	0,18	св. син.	кр.
Тобиаса . . . . .	—	2	1	0,55	0,61	0,85	кр. ф.	кр. ф.
Дала . . . . .	—	2	5	0,34	0,47	0,71	син.	ф. кр.
Броннера . . . . .	—	2	6	0,32	0,46	0,75	кр. ф.	ф. кр.
Баденская . . . . .	—	2	8	0,48	0,51	0,81	св. син.	ж.
Фенил-перидин . . . . .	—	1 г)	8	0,81	0,78	0,95	ж. з.	ф. син.
Толдид-перидин . . . . .	—	1 г)	8	0,84	0,81	0,95	з. ж.	син.
Фенил-Лаурента . . . . .	—	1 г)	5	0,75	0,71	0,95	з. син.	роз. к.
γ . . . . .	8	2	6	0,22	0,42	0,25	син. ф.	ф.
Фенил-γ . . . . .	8	2 г)	6	0,66	0,70	0,84	кр. син.	сер. з.
Диокси-Г . . . . .	2,8	—	6	0,35	0,56	0,24	—	малин. кр.
I . . . . .	5	2	7	0,25	0,43	0,20	син. ф.	малин. кр.

а) Окрашивание после реакции азосочетания с диазотированным n-нитроанилином.

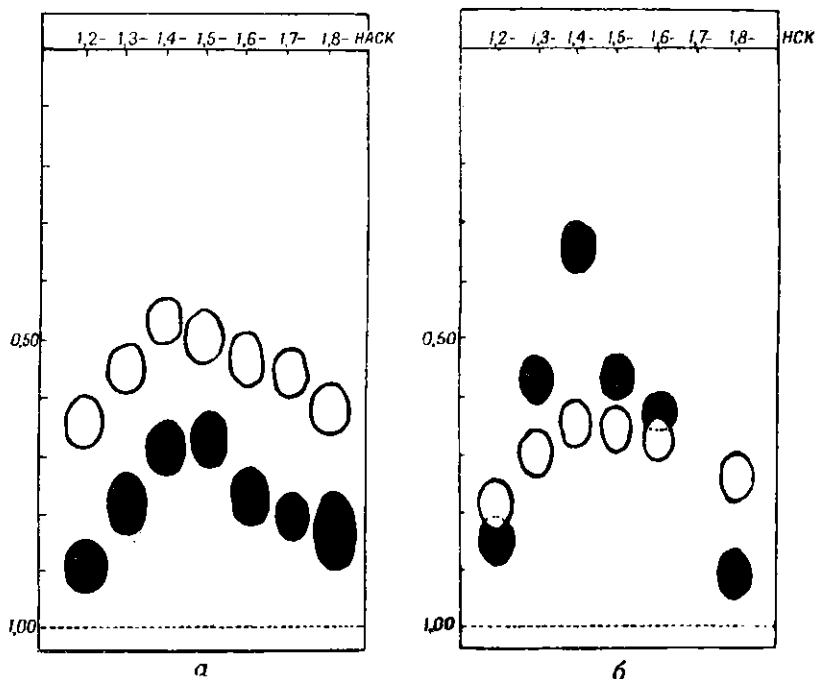
б) Изменяется после опрыскивания 5%-ным раствором едкого кали.

в) После гидролиза 5%-ным раствором едкого кали.

г) Группа NH—R.

д) При слабой флуоресценции цвет указан в скобках.

если  $pK_2$  больше 9,2, то величина  $R_f$  остается без изменения, так как щелочность бумаги недостаточна для того, чтобы вызвать диссоциацию оксигруппы. Кроме того, на хроматографическое поведение 1,2- и 1,8-нафтолсульфокислот оказывает влияние водородный мостик. Такие кислоты, наоборот, имеют на пропитанной бумаге большие значения  $R_f$ .



Р и с. 221. Разделение 1-нафтиламиносульфокислот и 1-нафтолсульфокислот.

Система: *n*-пропанол — 5%-ный водный раствор  $\text{NaHCO}_3$  (2 : 1). Темные пятна — положение кислот на бумаге, пропитанной  $\text{NaHCO}_3$ ; светлые пятна — положение на непропитанной бумаге. HACK — 1-нафтиламиносульфокислота, HCK — 1-нафтолсульфокислота.

Однако все эти изменения не проявляются, если для хроматографирования использовать систему *n*-пропанол — водный раствор бикарбоната натрия на непропитанной бумаге (малая щелочность системы).

Введение в ядро алкильных групп или присутствие конденсированных ядер также приводит к увеличению значений  $R_f$ . В случае *N*-ариллированных нафтиламиносульфокислот *n*-толил приводит к несколько большему увеличению значений  $R_f$ , чем фенил; для *N*-ацетилпроизводных увеличение  $R_f$  намного меньше. Кроме того, *N*-арилирование приводит к резкому снижению различия между величинами  $R_f$  отдельных изомеров.

### Обнаружение

Кроме обычных способов обнаружения кислот с помощью кислотно-основных индикаторов, для проявления сульфокислот можно использовать различные методы, которые в какой-то мере специфичны для отдельных типов сульфокислот. Одним из таких методов прежде всего является флуоресценция в ультрафиолетовом свете (см. табл. 116 и рис. 219).

Характерной флуоресценцией обладают нафтиламин- и нафтолсульфокислоты, которые ведут себя подобно флуоресцентным индикаторам. После опрыскивания бумаги щелочью происходит специфическое изменение флуоресценции. Характерной флуоресценцией обладают также антраценсульфокислоты (интенсивная флуоресценция) и антрахинонсульфокислоты. В последнем случае интенсивность флуоресценции можно повысить, если освещать хроматограмму в течение нескольких минут ртутной лампой (без фильтра). Чувствительность обнаружения для всех кислот колеблется в пределах десятых микрограмма. Проявление бензол-, нафталин-, алкилнафталин- и подобных им сульфокислот можно осуществлять путем нагревания хроматограммы в течение нескольких минут до 200°. Сульфокислоты вызывают обугливание бумаги и проявляются на хроматограмме в виде черных или черно-коричневых пятен, имеющих резко очерченные границы (рис. 222) (Горина и сотрудники, неопубликованные данные). Однако этот способ проявления требует использования больших количеств хроматографируемой кислоты (обычно сотен микрограммов). Для проявления 5—25 мкг нафтиламин- и нафтолсульфокислот можно использовать реакцию азосочетания с диазотированным *п*-нитроанилином. Эта реакция приводит к возникновению окрашивания, характерного для каждой кислоты (Д 50). Кроме того, сульфокислоты, содержащие аминогруппы, можно определять с помощью методов, применяемых обычно для определения ароматических аминов (см. стр. 389). Сульфокислоты, содержащие группы OH, можно определять реактивом Гиббса (Д 54), а сульфокислоты, обладающие восстановительными свойствами, — аммиачным раствором азотнокислого серебра (3-окисульфаниловая кислота). Антрахинонсульфокислоты дают характерно окрашенные пятна после опрыскивания хроматограммы щелочным раствором гидросульфита (Д 160; Матрка и Сметана, неопубликованные данные).

### Системы растворителей

По неопубликованным данным Гориной и сотрудников для разделения бензол-, толуол- и ксилолсульфокислот удобно применять систему *н*-бутанол — этанол — аммиак — вода (30:10:2:8). Однако в этом случае наблюдали колебание значений  $R_f$  в зависимости от концентрации и характера других присутствующих сульфокислот. Отделение нафталин-моносудьфокислот от дисудьфокислот и серной кислоты было осуществлено Латинаком (работа еще не опубликована), который использовал систему, состоящую из *н*-пропанола и 25%-ного раствора аммиака (2:1). Этот пример приведен на рис. 222. Для разделения антрацен- и антрахинонсульфокислот (см. рис. 219), по данным Вечеры и сотрудников [2], наиболее удобной подвижной фазой оказалась органическая фаза системы *н*-бутанол — аммиак — вода (2:1:1). Отделение 4-дифенилсульфокислоты от 4,4'-дисудьфокислоты было осуществлено Рамом и Джурачкой в системе *н*-бутанол — этанол — аммиак — вода (15:5:1:4). Для разделения нафтол- и нафтиламиносудьфокислот, по данным Латинака [1—4], система *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5) оказалась более пригодной, чем система *н*-бутанол — пиридин — вода (3:1:1). Как уже было указано во введении, для хроматографического разделения и идентификации нафтолсульфо- и аминонафтолсульфокислот и неизвестных примесей удобно использовать бумагу, пропитанную бикарбонатом натрия, и систему, состоящую из *н*-пропанола и водного раствора бикарбоната натрия (П 126).

### Количественный анализ

Для количественного определения сульфокислот можно использовать колориметрический метод анализа, который следует применять после экстракции сульфокислот (Хасимото, Симидзу). Метод определения содержания примесей, рекомендуемый Латинаком [2], является скорее полуколичественным методом. Согласно этому методу, анализируемый раствор сравнивают на хроматограмме визуально со стандартным продуктом, который при дальнейшей обработке будет соответствовать полупродукту для производства красителя

### АМИДЫ СУЛЬФОКИСЛОТ

Особенно большое внимание было уделено хроматографическому разделению на бумаге производных *n*-аминобензолсульфамида, используемых в качестве лекарственных средств.

### Обнаружение

Почти все способы обнаружения производных *n*-аминобензолсульфамида основаны на цветных реакциях свободной аминогруппы ароматического ядра. Чаще всего проявление основано на реакции этой аминогруппы с *n*-диметиламинобензальдегидом (Д 102), на реакции диазотирования, протекающей при опрыскивании бумаги (Д 108е) или в парах (Д 108а), а также, по-видимому, на реакции азосочетания. В качестве пассивного компонента азосочетания удобно применять  $\beta$ -нафтол (Ванк-мюллер; Вагнер [1]), *N*-этил- $\alpha$ -нафтиламин (Экман), диметил- $\alpha$ -нафтиламин (Стил) и т. п. Часто также описывают реакцию с реактивом Ру (Витоло; Вагнер [3]; Д 161). Если молекула амида сульфокислоты содержит и другие реакционноспособные группы, то для проявления, например, производных тиомочевины (Вагнер [1]) или 3-окисульфаниламида (Брей и сотрудники) можно использовать аммиачный раствор нитрата серебра (Д 4). Для обнаружения производных тиазола удобно применять цветную реакцию с азотной кислотой (Д 155; Вагнер [1]).

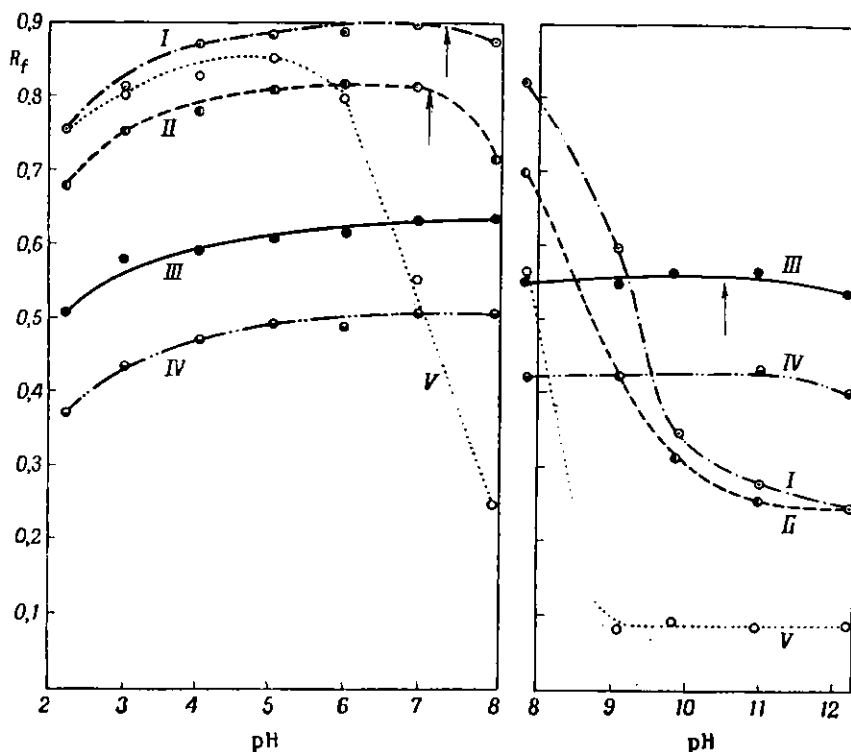
В том случае, если ароматическая аминогруппа амида сульфокислоты ацилирована (фталонил-, сукцинил-), необходимо использовать кислотно-основной метод проявления (на свободную карбоксильную группу).

### Системы растворителей

Большинство авторов использовало систему *n*-бутанол — аммиак или систему *n*-бутанол — уксусная кислота. Этот способ хроматографирования неудобен тем, что величины  $R_f$  и форма пятен в большинстве случаев сильно зависят от рН используемой системы. Нарушение нормального хода процесса хроматографирования объясняется колебаниями концентрации аммиака или уксусной кислоты, происходящими не только в подвижном растворителе, но и в парах хроматографической камеры. Вагнер [2] и Рибарж с сотрудниками систематически изучали влияние рН на величину  $R_f$  и форму пятен. Они хроматографировали амиды сульфокислот на бумаге, пропитанной буферными растворами. Хейненен и сотрудники [1] также указывают на существование зависимости между кислотностью амидов сульфокислот и их величиной  $R_f$ . Сульфамиды большей частью

ведут себя как амфотерные электролиты. Ионизация аминогруппы ароматического ядра при более низких значениях pH, так же как и ионизация сульфамидной группы при более высоких значениях pH, приводит к снижению величин  $R_f$  сульфамидов (рис. 223). Ход кривых, характеризующих зависимость  $R_f$  от pH, зависит от величины рК сульфамида. Из графика, на котором приведены величины рК для диссоциации кислотной функциональной группы, видно, что значения pH, при которых происходит изгиб кривых зависимости величин  $R_f$  от pH, у веществ с более высокими значениями рК сдвинуты вправо.

При выборе условий проведения хроматографического разделения смесей сульфамидов необходимо учитывать изменение их поведения

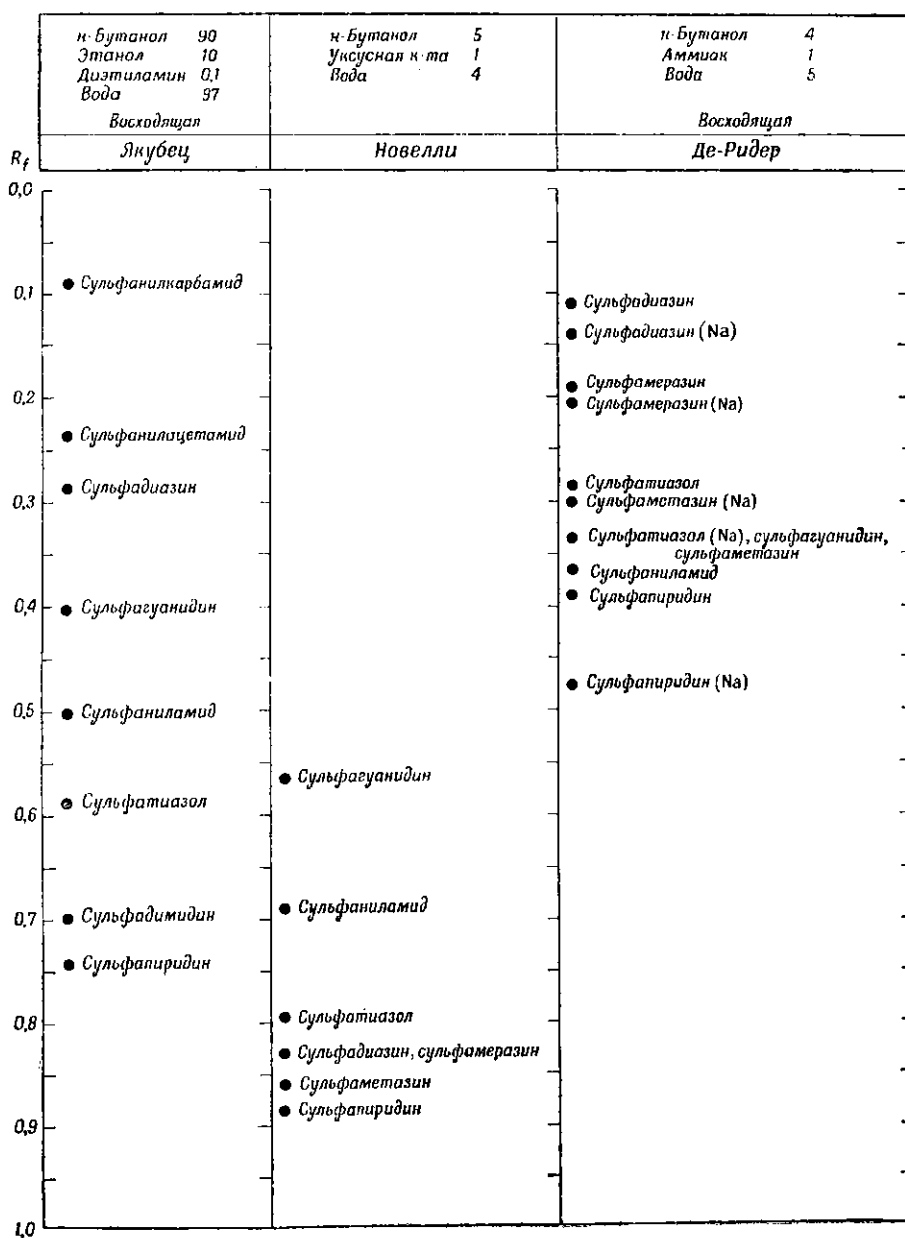


Р и с. 223. Зависимость величин  $R_f$  сульфамидов от значения pH раствора, используемого для пропитки бумаги (Рибарж и сотрудники).

Система: *n*-бутанол, насыщенный водой. Бумага пропитана буферным раствором: слева — раствором Мак-Илвейна, справа — раствором Сёренсена. I — сульфамид, II — сульфатиазол, III — сульфаниламид, IV — сульфагуанидин, V — сульфацетамид. Стрелки обозначают величины рК.

на хроматограмме при изменении величины pH. Эти условия, конечно, будут изменяться от случая к случаю, смотря по тому, какую смесь сульфамидов необходимо разделить. Так, например, из рис. 223 видно, что для разделения смеси сульфозацетамида с сульфотиазолом и сульфометазинном («Детрион» Спофа) удобно использовать бумагу, пропитанную буферным раствором Мак-Илвейна (pH 8,0), или бумагу, пропитанную буферным раствором Сёренсена (pH 8,0—9,0), и в качестве проявителя — *n*-бутанол, насыщенный водой (Рибарж и сотрудники). В табл. 117 приведены величины  $R_f$ , полученные в различных кислых и щелочных системах. Учиты-

Таблица 117

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  СУЛЬФАМИДОВ

вая сказанное выше, их можно использовать в соответствующих случаях. При этом, конечно, следует учитывать возможные осложнения. Здесь же приведены значения  $R_f$  для системы *n*-бутанол — диэтиламин (Якубец). Благодаря тому что диэтиламин менее летуч, чем аммиак, может быть уменьшена возможность колебания концентрации его паров в хроматографической камере.

### Количественный анализ

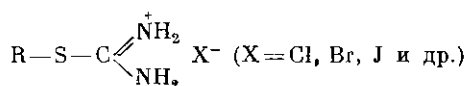
Вагнер [1] разработал метод количественного анализа смеси сульфамидов, основанный на их экстракции из бумаги, диазотировании и сочетании с тимолом и последующем колориметрическом определении концентрации. Сен и Юльте отдают в этом случае предпочтение реакции с *n*-диметиламинобензальдегидом (по Моррису). Хейненен с сотрудниками [2] испытали пять различных методов анализа и нашли, что наилучшие результаты получаются при спектрофотометрическом анализе (средняя погрешность составляет 1—3%). Для проявления сульфамидов в этом случае использовали *n*-диметиламинобензальдегид. После проявления пятна сульфамидов элюировали 95%-ным этанолом. Собранный элюат подвергали спектрофотометрическому анализу.

### ТИОМОЧЕВИНА И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

При хроматографировании тиомочевинны затруднений не встречается. В качестве подвижной фазы можно использовать обычные системы, например смесь *n*-бутанола с уксусной кислотой и водой (4:1:5; Горак).

Проявление можно проводить аммиачным раствором азотнокислого серебра (Д 4), йодоплатинатом калия (Д 84) или йодазидным реактивом (Д 163). Йодазидная реакция (Аве) является характерной реакцией для неорганических веществ, содержащих ионы  $\text{SH}^-$  и  $\text{S}^{2-}$ , а также для органических веществ с группами  $\equiv\text{C}-\text{SH}$ ,  $=\text{C}=\text{S}$  и  $\equiv\text{C}-\text{S}-\text{S}-\text{C}\equiv$  и для некоторых гетероциклических соединений (производные тиазола, тиазина и т. п.).

### АЛКИЛИЗОТИУРОНИЕВЫЕ СОЛИ



I

Наилучшим способом проявления солей S-алкилтиомочевин (I) является опрыскивание хроматограммы 0,04%-ным раствором бромкрезолового зеленого в спирте после ее высушивания при 105° в течение 10 мин. Катионы алкилизотиуруниеиных солей проявляются на хроматограмме в виде синих пятен на желто-зеленом фоне. Тиомочевину можно обнаружить лишь в том случае, если она присутствует в большом избытке; она проявляется в виде светло-желтого пятна между интенсивными синими пятнами метил- и этилизотиуруниеиных солей. Анионы хроматографируемых веществ остаются вблизи линии старта и образуют желтые полосы, длина которых зависит от количества вещества, нанесенного на бумагу. Хроматографирование удобно проводить с образцами, содержащими 15—70 мкг анализируемого вещества.

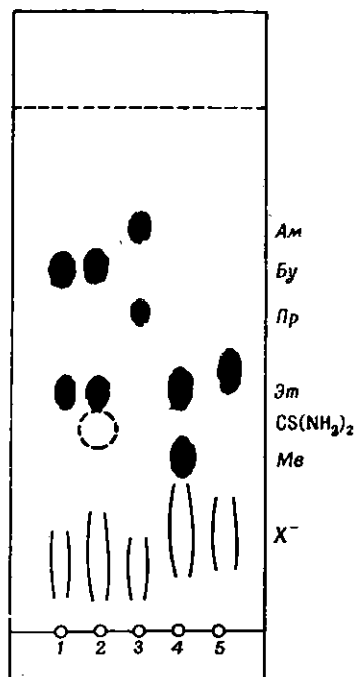
При анализе этих соединений выбор систем растворителей осуществить несколько сложнее. Если используемая система не имеет доста-

точно низкого значения  $pH$ , величина  $R_f$  будет сильно зависеть от вида аниона. В качестве примера можно привести величины  $R_f$  различных солей алкилизотиурония, получаемые для системы *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5; Горак). Значение  $R_f$  сульфата метилизотиурония равно 0,23; хлорида — 0,39; бромиды — 0,43; йодида — 0,53. Если применяют достаточно кислую систему, например *n*-амиловый спирт — уксусная кислота — вода (45:15:10; Вечера и Гаспарич [1]), то влияние анионов исчезает. В этом случае величины  $R_f$ , например, для катионов хлорида, бромиды и йодида алкилизотиурония будут одинаковыми. Такое поведение характерно для солей органических оснований, которые более подробно были рассмотрены в разделе о солях алифатических аминов (стр. 382). На рис. 224 представлена схема хроматограммы S-алкилтиомочевин, которые были разделены в системе *n*-амиловый спирт — уксусная кислота — вода (45 : 15 : 10).

Хроматографическое разделение и идентификацию алкилизотиурониевых солей можно использовать для идентификации алкилгалогенидов и О- и N-алкильных групп (Вечера и Гаспарич [1]). При воздействии тиомочевин в ацетоновом растворе на алкилгалогениды последние переходят в соответствующие соли S-алкилтиомочевин,

Р и с. 224. Хроматографическое разделение алкилизотиурониевых солей.

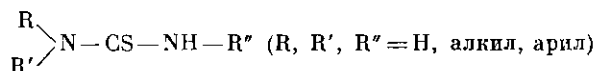
Система: *n*-амиловый спирт — уксусная кислота — вода (45 : 15 : 10). Для проявления использовали бромкрезольный зеленый (Д6). 1 — смесь этил- и *n*-бутилиуроний-йодидов; 2 — йодиды алкилизотиурония после расщепления этил-*n*-бутилового эфира; 3 — смесь *n*-пропил- и *n*-амилизотиурониййодидов; 4 — смесь метил- и этилизотиурониййодидов; 5 — йодид алкилизотиурония после расщепления N,N-диэтил-*n*-фенилендиамина.



идентификацию которых осуществляют с помощью хроматографии на бумаге. Для идентификации О- и N-алкильных групп эти группы отщепляют йодистоводородной кислотой в виде алкилийодидов, которые затем снова переводят в алкилизотиурониевые соли (II 127). Этот метод был разработан для анализа образцов, содержащих 1 мг, а иногда и меньшее количество исходного вещества.

Преимуществом этого метода является то, что с его помощью можно идентифицировать смеси галоидалкилов, а также при известных условиях несколько различных алкилов, связанных в молекуле с атомом кислорода или азота. Следовательно, в этом случае можно идентифицировать и смешанные эфиры, что в остальных случаях требует применения сложной методики. Кроме того, при хроматографировании галоидалкилов в аммиачном растворе *n*-бутанолом можно также идентифицировать соответствующие галоиды (Ледерер).

## N-ЗАМЕЩЕННЫЕ ТИОМОЧЕВИНЫ



## II

Для разделения N-замещенных тиомочевин (II) удобно использовать метод восходящей хроматографии. Кьер и Рубинштейн [1, 2] применяли в этом случае для хроматографирования бумагу ватман 1 и хлороформ, насыщенный водой. Пример такого разделения приведен на рис. 225. Для проявления можно использовать реактив Гроте (Д 11), йодазидный реактив с крахмалом (Д 1636) или аммиачный раствор азотнокислого серебра (Д 4). В первом случае тиомочевин проявляются после опрыскивания и кратковременного нагревания хроматограммы до 100° в виде темно-синих пятен, во втором случае — в виде белых пятен на фиолетовом фоне, а в третьем — в виде коричнево-красных пятен.

Хроматография N-замещенных тиомочевин была разработана с целью изучения изотиоцианатов, выделенных из гликозидов различных растений. Перевод изотиоцианатов в соответствующие N-алкилтиомочевин осуществляли, воздействуя на них аммиаком (II 128; Кьер и сотрудники [3]; Шульц и Гмелин [1]). Эти работы интересно сравнить с работами Шульца и Гмелина [1, 2], в которых преимущественно хроматографировали природные гликозиды.

Проявление гликозидов проводили при нагревании аммиачным раствором азотнокислого серебра (Д 4) или раствором сульфата меди (II) (Д 164). При использовании систем, состоящих из *n*-бутанола, уксусной кислоты и воды (40:10:50; 40:5:55; 40:10:40), *n*-бутанол иногда заменяли изобутанолом. В системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (40:5:55) для отдельных гликозидов были найдены следующие значения  $R_f$ : для гликохеиролина 0,04, для синигрина 0,07, для синальбина 0,11.

Количественный анализ гликозидов проводили с помощью реакции с антроном после их вымывания из хроматограммы и отщепления глюкозы.

## СУЛЬФОНИЕВЫЕ СОЛИ

Для обнаружения сульфониновых солей лучше всего использовать реактив Драгендорфа (Д 144), раствор йода или йодоплатината калия (Д 84). Франц и Хайс (неопубликованные данные) использовали для хроматографирования йодида диметил-β-оксиэтилсульфония систему *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:1;  $R_f$  0,3). Для разделения триалкилсульфониновых солей удобно также использовать *n*-бутанол, насыщенный водой.

## ЛИТЕРАТУРА

- Awe W., Mikrochem. mikrochim. Acta, 38, 574 (1951).  
 Gray H. G., Lake H. J., Thorpe W. V., Biochem. J., 48, 400 (1951).  
 De Reeder P. L., Anal. chim. Acta, 2, 325 (1953).  
 Ekman B., Acta chem. Scand., 3, 383 (1948).  
 Franc J., Latinský J., Chem. Listy, 49, 328 (1955); Collection Czechoslov. chem. Commun., 20, 830 (1955).  
 Franks F., Nature, 176, 693 (1955).

- Hashimoto Y., Shimizu S., J. pharm. Soc. Japan, **73**, 767 (1953).
- Heinänen P., Nyyssönen S., Tuderman L., Farm. Aikakauslehti, No. 5, 84 (1951); ref. C. A., 46, 7286 (1952). [1]
- Heinänen P., Tuderman L., Rämö L., Farm. Aikakauslehti, No. 3, 56 (1954); ref. C. A. 48, 10297 (1954); Chem. Zbl., 1955, 3436. [2]
- Holness H., Stone W. R., Nature, **176**, 604 (1955).
- Horák V., Chem. Listy, **48**, 1416 (1954).
- Jakubec I., Českoslov. Farm., **1**, 43 (1952).
- Kjaer A., Rubinstein K., Nature, **171**, 840 (1953). [1]
- Kjaer A., Rubinstein K., Acta chem. Scand., **7**, 528 (1953). [2]
- Kjaer A., Conti J., Larsen I., Acta chem. Scand., **7**, 1276 (1953). [3]
- Latinák J., Chem. Listy, **48**, 843 (1954). [1]
- Latinák J., Chem. Listy, **48**, 1354 (1954). [2]
- Latinák J., Skalický L., Chem. Listy, **50**, 1598 (1956). [3]
- Latinák J., Skalický L., Chem. Listy, **51**, 91 (1957). [4]
- Lederer M., Science, **110**, 115 (1949).
- Morris C. J. O., Biochem. J., **35**, 952 (1941).
- Novelli A., Anales Direc. nacl. quim., **5**, No. 9, 7 (1952); ref. C. A., 47, 5073 (1953).
- Rahm J., Juračka F., Chem. Listy, **50**, 837 (1956).
- Rybář D., Toušek B., Hais I. M., Chem. Listy, **48**, 1532 (1954); Collection Czechoslov. chem. Commun., **20**, 724 (1955).
- San G. L., Utlée A. J., Nature, **169**, 586 (1952).
- Schultz O. E., Gmelin R., Z. Naturforsch., **7b**, 500 (1952). [1]
- Schultz O. E., Gmelin R., Z. Naturforsch., **9b**, 27 (1954). [2]
- Steel A. E., Nature, **168**, 877 (1951).
- Večeřa M., Gasparič J., Chem. Listy, **48**, 1360 (1954); Collection Czechoslov. chem. Commun., **19**, 1175 (1954). [1]
- Večeřa M., Gasparič J., Borecký J., Chem. Listy, **49**, 706 (1955); Collection Czechoslov. chem. Commun., **20**, 1380 (1955). [2]
- Vitolo E., Boll. Chim. farm., **89**, 351 (1950); ref. C. A., 45, 1464 (1951).
- Wagner G., Arch. Pharm., **285**, 409 (1952). [1]
- Wagner G., Pharmazie, **9**, 123, 631 (1954). [2]
- Wagner G., Pharmazie, **9**, 979 (1954). [3]
- Wankmüller A., Naturwissenschaften, **39**, 302 (1952).

# ВИТАМИНЫ

---

*И. М. Хайс*

Если материал предыдущих глав специальной части этой книги распределен исходя из химического строения веществ, то для витаминов применить этот способ удастся не всегда, так как они представляют собой группу веществ, объединяемых по биологическим особенностям. В некоторых случаях выбор способа классификации был крайне затруднен. В большинстве случаев мы руководствовались тем, насколько доминируют в определенной химической группе вещества витаминного характера; но и при этом нам не удалось избежать некоторого произвола. Витамины группы D вместе со своими провитаминами рассматриваются среди стеролов (стр. 363), никотиновая кислота — в группе производных пиридина (стр. 561), гетероауксин — среди соединений индола (стр. 566), инозит — в разделе о сахарах (стр. 278), холин — среди аминов (стр. 385), витамины группы P — среди соединений флавонов (стр. 310). Наоборот, в главе о витаминах наряду с витамином A, фолиевой кислотой и витамином C рассматриваются также каротиноиды, птеридиновые производные фолиевой кислоты и редутоны.

Адсорбционный колоночный хроматографический метод Цвета дал возможность на протяжении двух прошлых десятилетий выделить и очистить большинство витаминов; в тех случаях когда адсорбционная и ионообменная хроматография не давали нужных результатов, применяли распределительную хроматографию. Хроматография на бумаге оказалась пригодной не только для обнаружения, определения и изучения изменений известных витаминов, но в соединении с микробиологическим методом и биоавтографией (стр. 174) дала возможность открыть новые индивидуальные химические вещества витаминного характера.

## *Жирорастворимые витамины*

Эти сильно липофильные вещества разделяли при помощи распределительной хроматографии с обращенной фазой и адсорбционной хроматографии. В ряде работ приведены анализы смеси витаминов A, D и E.

## КАРОТИНОИДЫ И ВИТАМИНЫ ГРУППЫ А

Экстракт каротиноидов (вместе с хлорофиллами) получают обычным способом, т. е. извлечением из растертого растительного материала растворителем, содержащим ацетон или спирты, с последующим отделением липоидной фракции путем добавления к экстракту воды и эфира или какого-либо другого растворителя жиров.

Первоначально отделение каротиноидов было основано на традиционном способе колоночной адсорбционной хроматографии Цвета, впервые применившего этот метод для разделения красящих веществ, содержащихся в листьях. В настоящее время некоторые авторы применяют неполярные растворители и пользуются непропитанной бумагой. Датта и сотрудники пропитывают бумагу гидратом окиси алюминия (*II 5*) и, применяя в качестве растворителя бензин, разделяют витамин А, сложные эфиры витамина А, ретинен и другие хромогены, дающие характерную реакцию Карра — Прайса. Бауэр разделяет красящие вещества зеленых листьев на непропитанной бумаге, применяя в качестве растворителя систему бензол — петролейный эфир — ацетон (20:5:4) или бензол — петролейный эфир — ацетон — метанол (40:10:4:1). Хорошо зарекомендовала себя двумерная комбинация этих двух систем (см. также рис. 218 на стр. 584).

Наиболее оправданным с теоретической точки зрения было бы применение систем с неподвижной липофильной фазой. Кодишек и Эшби пропитывают бумагу парафином, Блаттна и сотрудники используют для этой цели оливковое масло в 10%-ном растворе толуола, а в качестве подвижной фазы — метанол или 80%-ный этанол. Нунец пропитывает бумагу триглицеридом в 0,5—4%-ном растворе бензола, применяя в качестве подвижной фазы метанол или этанол с добавкой воды или соответственно пиридина.

С целью отделения витаминов группы А от витаминов группы Е Браун пропитывает бумагу силиконом (10%-ный раствор смазки для шлифов в хлористом метиле), подвижным растворителем служит смесь ацетонитрила и воды в различных соотношениях. Взяв, например, соотношение 6:4, он разделил пальмитат, ацетат и свободный спирт витамина А ( $R_f$  0,0; 0,5; 0,92 соответственно). При хроматографировании камеру необходимо тщательно насытить парами растворителей. С этой целью стенки камеры выстилают увлажненной бумагой. Хроматограмму до и после процесса хроматографирования необходимо помещать в атмосферу  $\text{CO}_2$  (из сухого льда). Качественно и количественно разделенные вещества определяют спектрофотометрически, пользуясь непрерывной автоматической регистрацией поглощения при 328 и 296 м $\mu$ . Идентификацию отдельных пятен можно также осуществлять непосредственно на бумаге путем снятия спектра в ультрафиолетовой области.

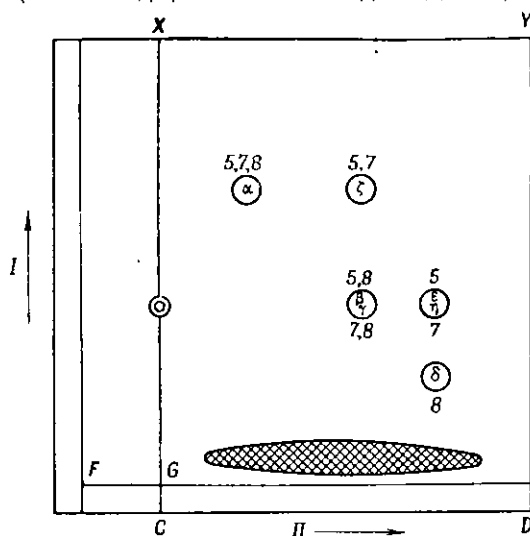
## ВИТАМИНЫ ГРУППЫ Е

Между биологической активностью отдельных токоферолов существуют большие различия, поэтому химические методы определения их общего содержания совместно с различными артефактами необходимо дополнить специфическими методами определения отдельных компонентов. Одним из таких методов является распределительная хроматография.

Липоидный экстракт, полученный из природного материала, омыляют в присутствии пирогаллола, из неомыленной части стеролы удаляют

путем кристаллизации из метанола при  $-15^{\circ}$ , каротины (при наличии их в большом количестве) адсорбируют из бензольного раствора флоридином, который предварительно промывают раствором двуххлористого олова (Браун; Эггит и Уорд [2]). При работе с более чистыми растворами некоторые операции, в частности вымораживание, могут быть опущены.

Токоферолы можно обнаружить на бумаге либо путем опрыскивания 2,2'-дипиридилем, а затем раствором хлорного железа (Д 165), либо азотнокислым серебром (Д 4). Последний метод позволяет получать более устойчивые пятна.  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\eta$ -токоферолы реагируют с диазотированным *o*-дванизидином (после подщелачивания содой; Д 166).



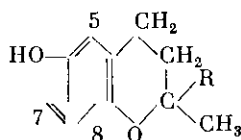
Р и с. 226. Двумерное хроматографирование токоферолов (Грин и сотрудники).

Системы: бумага пропитана  $ZnCO_3$  (П 129). Пробу наносят в виде тонкой линии на  $FG$ . При разделении в первом направлении применяют циклогексан. Затем площадь  $CDYX$  пропитывают 3%-ным раствором парафинового масла в петролейном эфире и после испарения петролейного эфира проводят разделение 75%-ным этанолом во втором направлении. Положение метильных групп отдельных токоферолов обозначено цифрами.

Токоферолы, как вещества, обладающие липофильным характером, разделяются в системах растворителей с неподвижной липофильной фазой. Бумагу пропитывают 2,5%-ным раствором вазелина в эфире (Ф. Браун) либо, еще лучше, 3%-ным раствором парафинового масла в бензине (Эггит и Уорд [2]); в качестве подвижной фазы хорошо зарекомендовал себя 75%-ный раствор этанола, предварительно очищенный перегонкой над едким кали и  $KMnO_4$ . Копецкий отдает предпочтение бумаге, пропитанной 20%-ным раствором парафинового масла в петролейном эфире, а в качестве подвижной фазы — метанолу. Дж. Браун разделяет витамины А и Е на бумаге, пропитанной силиконом.

Иной порядок пятен получают при адсорбционной хроматографии на бумаге, пропитанной основным углекислым диоксидом (П 129), с применением в качестве подвижной фазы циклогексана (Грин и сотрудники [2]). Из данных, приведенных на рис. 226, можно вычислить значения  $R_f$  в обеих системах растворителей. Рис. 226 показывает, что решающим фактором при распределительной хроматографии (парафиновое масло — водный раствор спирта) является прежде всего число замещающих метильных групп, поскольку при адсорбционной хроматографии влияет маскиро-

вание гидроксила, находящегося в положении 6, метильными группами в положении 5 и 7. Изомерные пары монометилтоколов  $\epsilon$  и  $\eta$  и диметилтоколов  $\beta$  и  $\gamma$  в указанных системах растворителей различить нельзя.



Потерь при хроматографировании можно избежать, если герметически закрывающиеся камеры заполнять азотом (Эггит и Уорд [1]). Определение проводят в этанольном элюате, подвергая его обработке дипиридилем и хлорным железом (Эггит и Уорд [1, 3]; II 130).

### ВИТАМИНЫ ГРУППЫ К

Витамин  $K_1$  и другие замещенные 1,4-нафтохиноны при облучении ультрафиолетовым светом (3665 Å) флуоресцируют красным цветом; при облучении в течение менее минуты они переходят в соединения с зеленой флуоресценцией. При добавлении щелочи возникает оранжевая флуоресценция (Грин [1]). Различные нафтохиноны после опрыскивания 5%-ным водным раствором едкого натра дают различные характерные тона: желтый, оранжевый, коричневый, красный и фиолетовый (Спростон и Бассетт).

Грин и Дэм [2] разделяют витамины группы К и продукты, образующиеся в результате их облучения, на бумаге, пропитанной силиконом (табл. 118). Согласно Спростону и Бассетту, для разделения различных

Таблица 118

ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ НАФТОХИНОНОВ

(Грин и Дэм [2])

Бумага пропитана 5%-ным раствором силикона (Dow Corning silicone № 1107) в циклогексане

Нафтохинон	Этанол	750	изо-Пропанол	600
	Уксусная кислота	25	Уксусная кислота	25
	Вода	225	Вода	375
Витамин $K_1$ (филлохинон) . . . . .	0,11		0,28	
Витамин $K_2$ . . . . .	0,14		0,18	
2,3-Окись витамина $K_1$ . . . . .	0,19		0,27	
Фтиокол . . . . .	0,63		0,72	
2-Метил-1,4-нафтохинон . . . . .	0,71		0,82	
Димер 2-метил-1,4-нафтохинона . . . . .	0,73		0,88	

нафтохинонов наиболее пригодной оказалась система амиловый спирт брожения — пиридин — вода (3 : 2 : 1,5). Однако в такой системе, как это следует из обширной таблицы, приводимой авторами, нельзя успешно разделить нафтохиноны и бензохиноны, незамещенные или замещенные липофильными группами (слишком высокие значения  $R_f$ ).

Об антивитаминах К из группы кумаринов и хромонов см. на стр. 326.

## Витамины группы В

Таблица 119

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В

Витамин	н-Бутанол 4 Уксусная кислота 1 Вода 5 (круговая)	н-Бутанол 2 Метанол 1 Бензол 1 Вода 1 (круговая)	н-Пропанол 2 0,1 н. соля- ная кислота 1	80%-ный этанол
	Бергамини	Радхакриш- намурти и Сарма	Гейндринкс	Родригес и де Сильва
Тиамин . . . . .	0,39	0,47	0,51	0,59—0,62
Рибофлавин . . . . .	0,50	0,40	0,39	0,22—0,23
Никотиновая кислота . . . . .	—	0,44	0,62	—
Никотинамид . . . . .	0,80	0,73	0,44	0,68—0,72
Пиридоксол . . . . .	0,67	0,73	—	0,68—0,74
Биотин . . . . .	—	0,64	—	—
Пантотеновая кислота . . . . .	0,44	0,36	—	0,53—0,62
л-Аминобензойная кислота . . . . .	—	0,80	—	—
Витамин В <sub>12</sub> . . . . .	—	0,25	—	—
Холин . . . . .	—	0,34—0,44	0,59	—
Инозит . . . . .	—	0,14	—	—

В табл. 119 приводятся значения  $R_f$ , полученные при хроматографировании смеси некоторых витаминов этой группы. Их проявление рассматривается в последующих разделах этой главы (за исключением никотиновой кислоты, ее амида, холина, инозита и л-аминобензойной кислоты, которые будут рассмотрены в других главах).

### ТИАМИН

Хроматографированию на бумаге витамина В и родственных ему соединений посвящено очень много работ. Этими работами были решены главным образом следующие вопросы: чистота и устойчивость тиаминных препаратов и определение тиамин в смеси витаминных препаратов, образование смешанных дисульфидов с различными сульфгидрильными соединениями, синтез и метаболизм фосфатов тиамин. В последнее время анализ методом хроматографии на бумаге с успехом дополняется методом электрофореза на бумаге. В обычных системах растворителей пятна располагаются в порядке повышения значения  $R_f$  следующим образом: тиаминкарбоновая кислота (Краут и Вильдеман), окситиамин, тиамин, тиохром, хлортиамин, хлортиохром. Фосфорилирование приводит к уменьшению значения  $R_f$ .

#### Приготовление образца

Удаление белковых веществ крови можно осуществить с помощью 5%-ного раствора метафосфорной кислоты (1<sup>1</sup>: 3) (Росси и Ди-Лева). Для очистки экстракта, полученного из биологического материала, можно применить адсорбцию на фуллеровой земле (II 131; Спадони и Течче) или на угле, дезактивированном ацетатом холестерина. Уголь промывают водой, а производные тиамин десорбируют 50%-ным этанолом

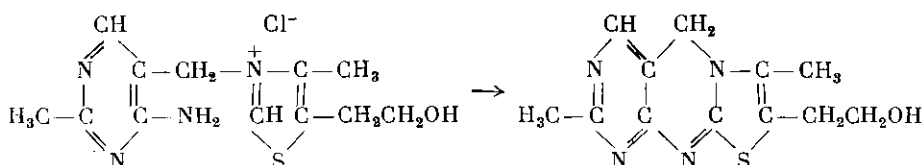
(Силипранди). Смочкевич определяет тиамин хроматографическим методом после предварительной депротеинизации, кислотного гидролиза и ферментативного дефосфорилирования. Некоторые авторы переводят тиамин еще перед хроматографированием в тioxром, применяя для этой цели окисление в щелочной среде; Гири и Балакришнан рекомендуют применять для той же цели BrCN.

### Бумага

При обнаружении пятен методом флуоресценции необходимо, чтобы сама бумага по возможности не флуоресцировала. Этому требованию отвечают различные сорта бумаги. Силипранди и Силипранди применяют для определения тиаминфосфатов бумагу ватман 1, предварительно промытую спиртовым раствором оксихинолина; в случае применения бумаги мунктелл такая предварительная обработка считается излишней. Бартлей промывает бумагу раствором этилендиаминотетрауксусной кислоты.

### Проявление

Наиболее распространенный способ проявления основан на образовании под влиянием окислителей тioxрома, который сам по себе окрашен в светло-желтый цвет, однако флуоресцирует интенсивным светло-синим цветом (*Д 167*). Этим методом можно обнаружить 0,05 мкг тиамина. Условием надежности испытания является свободная аминогруппа у пиримидина и свободное положение 2 у тiazольного ядра. Флуоресцирующее вещество можно фотографировать с применением красного фильтра (Силипранди и Силипранди).



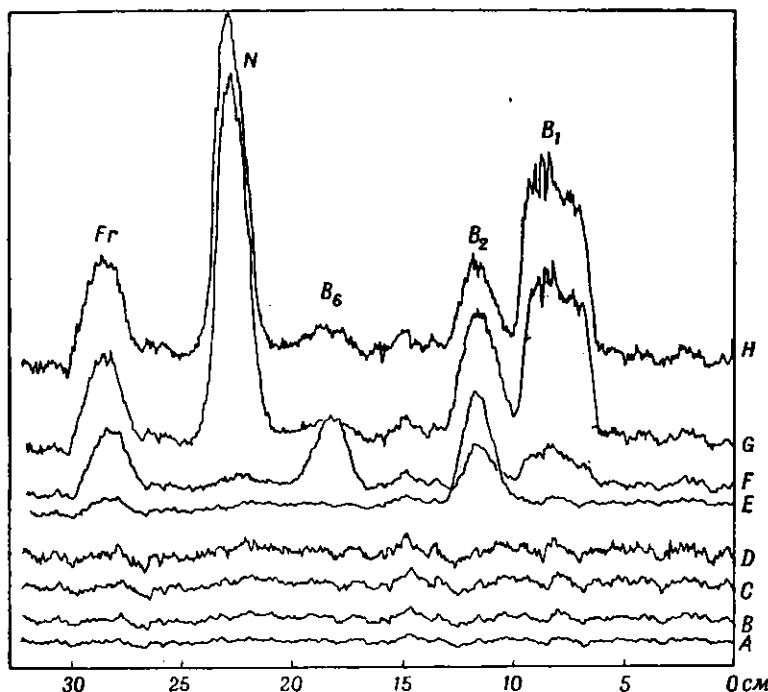
Для обнаружения тиамина можно также использовать его поглощение в ультрафиолетовом свете, фотометрируя непосредственно на бумаге при 240 мμ (Браун и Марш [2]) или наблюдая затухание флуоресценции хроматограммы, облученной светом с длиной волны 270 мμ (Силипранди и Силипранди).

Коричневое окрашивание, возникающее при обработке йодом (Брант), не является специфичным для определения тиамина, хотя в случае последнего окраска более интенсивна, чем для многих иных соединений. После того как эта окраска побледнеет, тиамин можно обнаружить еще и другими реактивами. Качиоппо и Ла-Грутта, а также Гаудиано и Течче [3] проявляют тиамин и 4-метил-5-оксиэтилтиазол йодолатинатом (*Д 84*), а Мацукава с Юруги и Бартлей — йодовисмутатом (*Д 168*). Сочетание с диазотированным амином является, согласно Смочкевич, менее чувствительным методом по сравнению с тioxромовой реакцией; Гаудиано и Течче [3] применяют диазотированный *n*-аминоацетанилид (реакцию сочетания проводят в щелочной среде). Для проявления тиамина можно также использовать йодазидный реактив, дающий характерную реакцию с сульфидной серой (*Д 163*).

Биоавтография как метод обнаружения тиамина применяется редко (Мартен и Гассманн).

### Системы растворителей

Тиамин относится к соединениям, которые легко разделяются в различных системах с водной неподвижной фазой (например, в системе бутанол — уксусная кислота — вода). Некоторые системы растворителей



Р и с. 227. Фотометрическая оценка непосредственно на бумаге до и после хроматографирования витаминов группы В в ультрафиолетовом свете (Дж. Браун и Марш [2]).

Система: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 40 : 5 : 55. На бумагу нанесено 17,5  $\mu$ л раствора смеси, содержащей 0,33% никотинамида (N), 0,022% солянокислого пиридоксола ( $B_6$ ), 0,053% рибофлавина ( $B_2$ ) и 0,11% азотнокислого тиамина ( $B_1$ ) в 10%-ном растворе уксусной кислоты. Кривые характеризуют экстинкцию в зависимости от расстояния от линии старта. Fr — фронт растворителя.

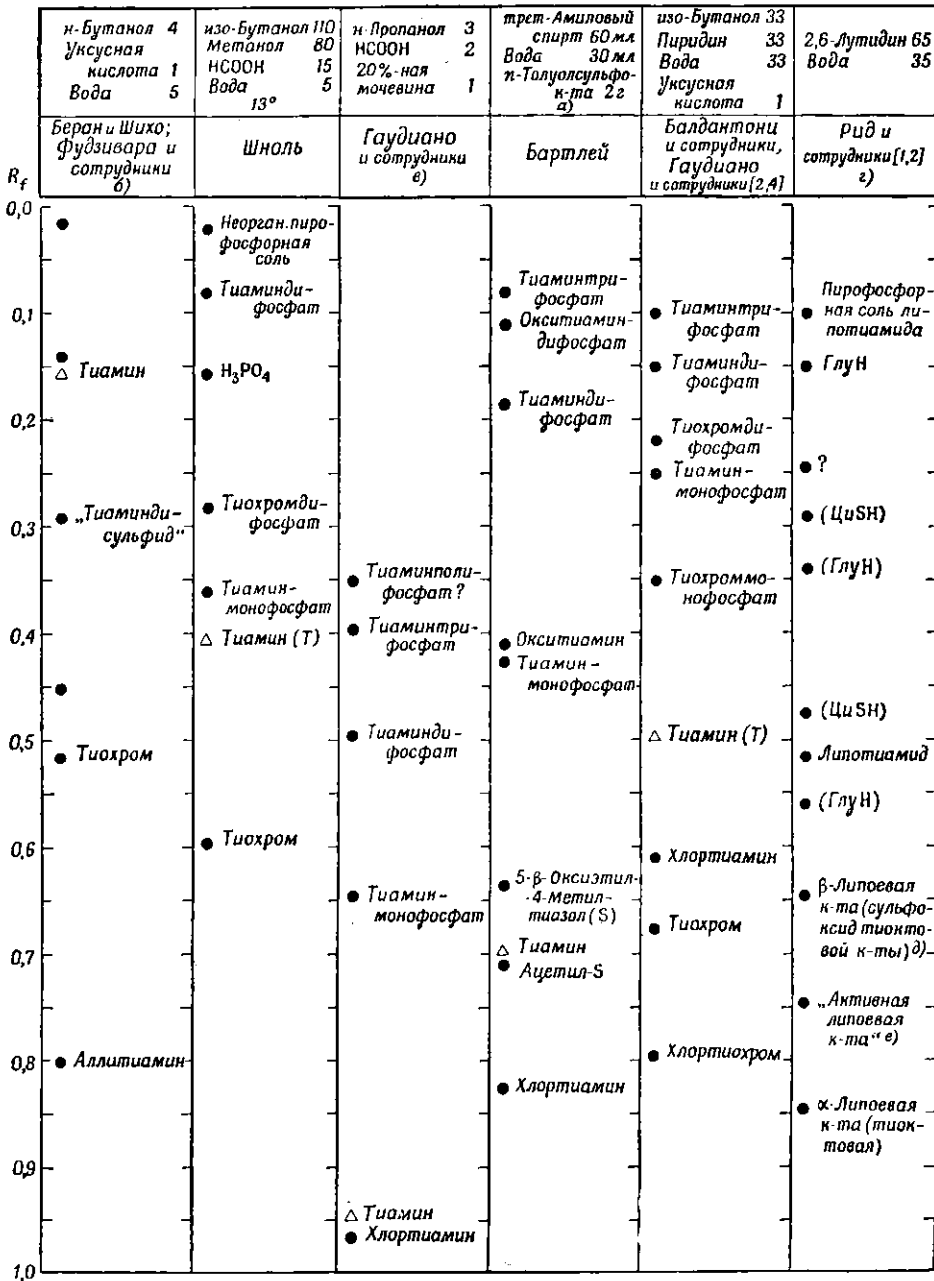
A — до хроматографирования (370 м $\mu$ ); B — до (297 м $\mu$ ); C — до (264 м $\mu$ ); D — до (240 м $\mu$ ); E — после хроматографирования (370 м $\mu$  для рибофлавина); F — после (297 м $\mu$  для пиридоксола); G — после (264 м $\mu$  для никотинамида); H — после (240 м $\mu$  для тиамина).

Для снятия приведенных кривых и абсорбционных спектров бумаги пользовались регистрирующим спектрофотометром Кэри, с шириной щели 2,75 м.м. Мелкие извилины кривых вызваны шумом аппарата и не мешают планиметрической оценке (логарифм площади пропорционален логарифму концентрации).

приведены на рис. 227 и в табл. 120. В основных и нейтральных системах в процессе хроматографирования при действии кислорода воздуха может получаться тиохром.

Мацукава и Юруги разделяли смешанные дисульфиды в системе *n*-бутанол — этанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1 : 10) или *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5).

Таблица 120

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ТИАМИНА ( $\Delta$ ), ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ И РОДСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

а) Бумага, промытая этилендиаминтетрауксусной кислотой. б) Неидентифицированные вещества торговых препаратов обозначены точками. в) Аналогичное разделение в системе н-пропанол—вода—1 М раствор ацетата с pH 5 (7:2:1) (Силипранди и Силипранди). г) ГЛУН, (ГЛУН) и (ЦиSH)—продукты реакции липоевой кислоты с восстановленным глутатионом и цистеином. д) Протоген В. е) Очевидно, липоил-кофермент А.

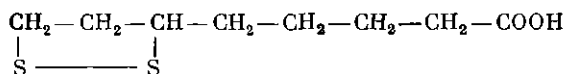
### Количественный анализ

*Непосредственно на бумаге.* Для системы, состоящей из 95%-ного этанола и 10%-ного хлористого калия (2:3), Мияки и сотрудники нашли линейную зависимость между логарифмом длины пятна и логарифмом концентрации. На бумаге можно также измерить интенсивность флуоресценции образовавшегося тиохрома. Балдантони применял этот метод анализа для исследования ферментативной реакции, протекающей во времени. О фотометрическом определении спектра поглощения в ультрафиолетовой области непосредственно на бумаге (Дж. Браун и Марш [2] рис. 227) мы уже упоминали, когда говорили о проявлении. Для этой цели анализируемый раствор лучше всего наносить на бумагу в виде полос и ограничиться определением относительной доли различных соединений в смеси (Гаудиано и сотрудники [4]).

*В элюате.* В водном элюате тиамин можно определить либо непосредственно, т. е. фотометрированием при 270 мμ (Силипранди), либо после перевода его в тиохром, либо флуорометрическим методом (Гири и Балакришнан), либо, наконец, измерением экстинкции тиохрома при 368 мμ (Гаудиано и сотрудники [4]). Последний метод является наименее чувствительным.

### ТИОКТОВАЯ КИСЛОТА

Метод хроматографии на бумаге нашел применение для определения различных форм такого биологически важного соединения, как тиоктовая кислота, называемая также протогеном и α-липоевой кислотой. Эта кислота является фактором, заменяющим ацетат в питательной среде для *Streptococcus lactis*, и, кроме того, служит фактором при биологическом окислении пировиноградной кислоты.



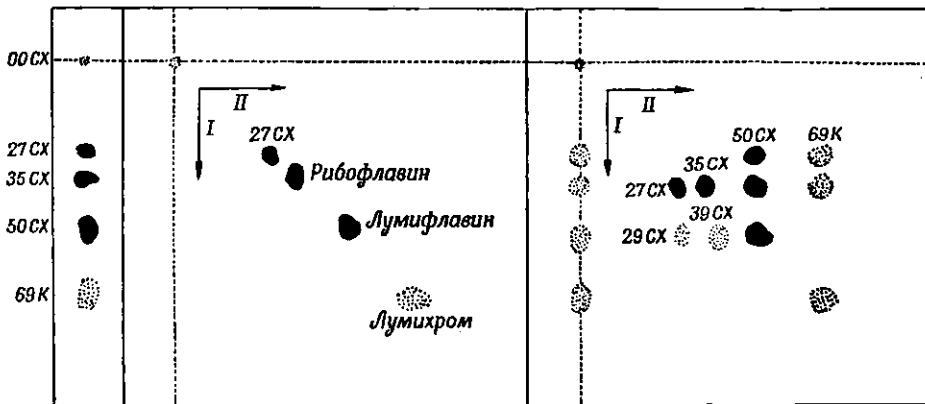
Для биологического проявления тиоктовой кислоты использовали *Streptococcus lactis* (Рид и сотрудники [3]) или *Str. faecalis* на питательной среде, не содержащей ацетата (Фуллер и сотрудники). Риду и сотрудникам [3] удалось обнаружить мутант *E. coli*, фактором роста которого является только лишь конъюгат с тиамином ( $R_f$  0,06 в смеси бутанол — вода). Метод химического проявления тиоктовой кислоты менее чувствителен.

Многочисленность биологически активных форм этого циклического дисульфида обусловлена главным образом тем, что он легко окисляется в β-липоевую кислоту (протоген В, являющийся, по-видимому, сульфоксидом), образует с большим числом различных тиолов дисульфиды, а кроме того, образует с тиамином (по всей вероятности, путем ацилирования его аминогруппы) липотиамиид, дифосфат которого обладает свойствами кофермента. Неидентифицированные соединения, приведенные в табл. 120, обозначены только точкой.

### РИБОФЛАВИН

Методы хроматографии на бумаге были использованы для изучения фотолиза рибофлавина (рис. 228), для изучения метаболизма флавиновых коферментов, для идентификации рибофлавина в смеси с другими флуо-

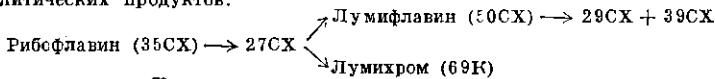
ресцирующими веществами животной ткани, для определения синтетических флавинов и для анализа фармацевтических препаратов. Легкость



Р и с. 228. Двумерная хроматограмма продуктов фотолиза рибофлавина (Свободова и сотрудники).

Система: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5 в обоих направлениях. Проявление хроматограммы в ультрафиолетовом свете. Желто-зеленая флуоресценция обозначается черными пятнами, синяя — темными точками, слабая — светлыми точками.

Слева — одномерная хроматограмма и далее — двумерная без облучения хроматограммы между разделением в первом и втором направлениях. Справа — между разделением в первом и втором направлениях хроматограмму подвергали облучению в течение 1,5 час. Показаны «генетические» ряды фотолитических продуктов:



На схеме не приведены пятна на линии старта.

проявления и отделения рибофлавина обусловила широкое применение последнего в качестве эталонного вещества при хроматографировании других соединений.

### Приготовление образца

Получение концентратов флавинов основано на экстрагировании их из ткани фенолом (Крамер, Сакамото, Яги); см. II 132.

### Обнаружение

Минимальное количество рибофлавина, обнаруживаемое на хроматограмме по флуоресценции в фильтрованном ультрафиолетовом свете (фильтра HPW), составляет 0,01 мкг. Рибофлавин и другие изоаллоксазиновые производные дают желто-зеленое свечение (кроме случаев крайних значений pH), люмихром дает синее свечение. Специфичность обнаружения можно повысить фотолизом после обработки хроматограммы растворителем в первом направлении и хроматографированием во втором направлении.

### Бумага

Бумага ватман 4, по-видимому, менее пригодна по сравнению с бумагой ватман 1. Согласно Яги, следы тяжелых металлов в бумаге повышают значение  $R_f$  в смеси бутанол — уксусная кислота — вода, однако влияние этих металлов можно исключить, если добавлять в систему небольшое количество аммиака.

## Системы растворителей

Системы растворителей для флавинов приведены в табл. 121а. Помимо этого, применялось также большое число других систем. Недостатком систем, содержащих фенол, является гашение флуоресценции (Линдберг и Хуммель). В системах, содержащих спирт и кислоту в подвижной фазе,

Таблица 121а  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  РИБОФЛАВИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Рибофлавин и его производные	н-Бутанол 4 Уксусная кислота 1 H <sub>2</sub> O 5	Амиловый спирт 1 Пиридин 1 H <sub>2</sub> O 2	Колли- дин, на- сыщен- ный H <sub>2</sub> O	н-Бутанол 30 Фенол 160 H <sub>2</sub> O 100	5%-ный Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O, на- сыщен- ный изо- амиловым спиртом (восходя- щая)
	Хюннекенс и сотру- дники. Свободова и сотру- дники	Свободова и сотру- дники	Хюннекенс и сотру- дники			Уитби
Флавинаденидин- нуклеотид . . .	0,05	—	0,17	0,23	0,40	0,90
То же, 4',5'- циклическ. . .	0,05	—	0,30	0,47	0,40	—
Рибофлавинмоно- фосфат . . . .	0,10	—	0,04	0,17	0,54	0,85
То же, 4',5'- циклическ. . .	0,13	—	0,15	0,50	0,54	—
Рибофлавинил- глюкозид . . .	0,22	—	0,50	0,60	0,22	0,50
Промежуточный продукт щелоч- ного фотолиза рибофлавина (27СХ) . . . .	0,27	0,18	—	—	—	—
Рибофлавин . .	0,30	0,29	0,69	0,79	0,30	0,40
Ликсофлавин . .	0,32	—	0,66	0,77	0,29	—
Люмифлавин . .	0,48	0,56	0,68	0,94	0,18	0,25
Промежуточный продукт фотоли- за рибофлавина в уксусной кис- лоте (69СХ) . .	0,69	0,78	—	—	—	—
Люмихром . . .	0,69	0,88	0,72	0,88	0,07	0,10

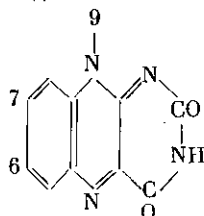
имеет место такое же распределение соединений, как и в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода. 3'-Монофосфат и 4',5'-циклофосфат имеют в данном случае более высокое значение  $R_f$ , нежели обычный рибофлавин-5'-фосфат (Серки и Альбертацци), 4', 5'-циклическая форма флавинаденидинуклеотида (ФАД-Х) также имеет более высокое значение  $R_f$  (см. табл. 121а). Для дифосфата характерно более низкое значение  $R_f$  по сравнению с монофосфатом (Гаудиано и Цинголани).

Значения  $R_f$  двадцати синтетических флавинов приводят Фортер и Каррер. На основании данных, приведенных в табл. 121б, можно сделать вывод о влиянии характера сахарных остатков: сильнее всего снижает величину  $R_f$  производное дисахарида, затем гексозы, пентозы и в меньшей степени дезокси-пентозы. Интересно, что 7-этилпроизводное имеет большую величину  $R_f$ , нежели 6,7-диметилпроизводное.

Таблица 1216

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АНАЛОГОВ РИБОФЛАВИНА  
(ФОРТЕР И КАРРЕР)*n*-Бутанол — муравьиная кислота — вода (77:10:13), бумага ватман 1,  
температура 20—22°, 18 час

Производные изоаллоксазина



Заместители в положении 6 7 9 (1')			$R_f$	Заместители в положении 6 7 9 (1')			$R_f$
Пентозофлавины				Производные рамнозы и дезоксирибозы			
Me	Эт	<i>d</i> -Рибитил	0,31	Me Me	<i>d</i> -Рамнитил		0,29
—	Эт	<i>d</i> -Рибитил	0,25	Me Me	<i>d</i> -Дезоксирибитил		0,24
Me	Me	<i>d</i> -Рибитил (рибофлавин) и его изомеры	0,18—0,19	Гексозофлавины			
				Me Me	<i>d</i> -Сорбитил		0,14
—	Me	<i>d</i> -Арабитил	0,17	— Me <i>d</i> -Маннитил и его изомеры			0,10—0,11
Me	—	<i>d</i> -Рибитил	0,17				
—	Me	<i>d</i> -Ксилитил	0,15	Производные дисахаридов			
—	—	<i>l</i> -Арабитил	0,10	Me Me	<i>d</i> -Мальтозитил		0,06

Для препаративной хроматографии была использована слоистая целлюлоза (Форрест и Тод [2]) и целлюлозный порошок (Уитби). Для этой цели пригодны системы растворителей, зарекомендовавшие себя при хроматографировании на бумаге, например *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (77:10:13).

## Количественный анализ

Путем визуального сравнения со стандартным образцом можно с довольно высокой точностью определить количество анализируемых веществ в пределах 0,3—2 мкг на образец. Дж. Браун и Марш [2] автоматически регистрируют непосредственно на бумаге экстинкцию при 370 мμ (см. рис. 227).

Яги вымывает рибофлавины водой и после облучения и обработки хлороформом проводит флуорометрический анализ. Черный предлагает определять рибофлавин полярографическим методом после элюирования его из пятна. Изучив полярографический характер элюатов, полученных из пятен фотолизированного образца, Кочент пришел к выводу, что наряду с флавидами в элюате присутствуют и «дейтерофлавины».

## ПИРИДОКСИН

Метод хроматографии на бумаге позволяет продемонстрировать неферментативные реакции витаминов описываемой группы с аминокислотами: кроме реакции пиридоксаль, который в присутствии аминокислот переходит в пиридоксамин, было доказано образование других микробиологически активных продуктов, обладающих по сравнению с исходными витаминами меньшими значениями  $R_f$  (Уинстон и Эйген [1]; см. табл. 122 и рис. 89, б справа).

Таблица 122  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ВИТАМИНОВ ГРУППЫ  $B_6$  И РОДСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Соединение	н-Бутанол, насыщенный водой	Этилацетат 2 Пиридин 1 Н <sub>2</sub> O 2	Соединение	Этилацетат 2 Пиридин 1 Н <sub>2</sub> O 2
	Уинстен и Эйген [1] а)	Пуштай		Пуштай
Пиридоксол . . . . .	0,75 (0,64) б)	0,94	4-Пиридоксиновая кислота . . . . .	0,76 в)
Пиридоксаль . . . . .	0,68	0,85	Оксим пиридоксаль	Линия фронта
Пиридоксамин . . . . .	0,18 (0,06) б)	0,65	Пиридоксолфосфат	0,56
			Аденозинтрифосфат	0,37
			Неорганическая фос- форнокислая соль	0,47

а) Аналогичное разделение дает система н-амиловый спирт — ацетон — вода в соотношении 2 : 1 : 2 (Снайдер и Уэндер).

б) В присутствии аминокислот.

в) Опечатка, см. рис. 89.

## Проявление

Для биоавтографии Уинстен и Эйген [1] применяют культуру дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis* 4228; полоски бумаги оставляют на агаре в течение 5 мин, после чего их удаляют (рис. 229). Химические методы проявления пиридоксина являются менее чувствительными. Наличие фенольной гидроксильной группы позволяет осуществить проявление фосфорномолибденовым реактивом по методу Фолина и Дениса (Бергамини) или реактивом Гиббса (Снайдер и Уэндер; Д 54). Согласно данным Черного, пиридоксин можно идентифицировать по флуоресценции продуктов его разложения; аналогичный прием использовал Пуштай. Фосфорилированные производные можно идентифицировать молибденовым реактивом (Д 45). По данным Петерсона и сотрудников, пиридоксаминфосфат образует с нингидрином оранжевое пятно.

## Системы растворителей

Хроматографирование рекомендуют проводить в темноте, так как соединения фотолabile. Значения  $R_f$  различных витаминов группы  $B_6$  и родственных им соединений приведены в табл. 122.

### Количественный анализ

Микробиологические определения можно проводить в элюате пятен (Снайдер и Уэндер). В качестве физических методов анализа можно применить фотометрию непосредственно на бумаге (поглощение при 297 мμ; Браун и Марш [2], см. рис. 227) или полярографию (Черный).

### БИОТИН

Метод хроматографии на бумаге был использован для разделения биотина, дезтиобиотина, обоих изомеров биотинсульфоксида и для характеристики различных биологических форм биотина, таких, как кодезаминаза (Лихштейн и Кристман) и биоцитин (ε-N-биотиниллизин, Райт и сотрудники [1]).

Для биологического проявления как фактора роста непосредственно в элюате пятен применяют культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Мелвил и сотрудники использовали для этой же цели бактерии *Lactobac. arabinosus* и *L. casei*, а Райт и Дрискол [3] — плесень *Neurospora crassa* (метод взвешивания мицелия).

Обзор систем растворителей приведен в табл. 123.

Таблица 123

ЗНАЧЕНИЯ R<sub>f</sub> БИОТИНА И РОДСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Соединение	Фенол, насыщенный водой (восходящая)	н-Бутанол, насыщенный водой		н-Бутанол 4 Уксусная кислота 1 H <sub>2</sub> O 5
	Харрисон	Харрисон (восходящая)	Мелвил	Райт, Дрискол
Биотин . . . . .	0,95	0,23	0,65	0,83
Дезтиобиотин . . . . .	0,86	0,48		0,89
Кодезаминаза . . . . .	0,3—0,5 а)			
Биотин-d-сульфоксид . . . . .			0,25	0,57
Биотин-l-сульфоксид (фактор <i>Asp. niger</i> ) . . . . .			0,15	0,46
Биоцитин . . . . .			—	0,37

а) Лихштейн и Кристман.

### ПАНТОТЕНОВАЯ КИСЛОТА И КОФЕРМЕНТ А

Метод хроматографии на бумаге был с успехом применен при изучении факторов роста для *Lactobacillus bulgaricus* (LBF), составной частью которых является пантотеновая кислота; результаты этого исследования сыграли большую роль при определении структуры кофермента ацетилирования (КоА). Кроме того, было опубликовано несколько работ аналитико-фармацевтического характера.

### Приготовление образцов и бумага

Шихо и Какач очищают дрожжевой экстракт путем осаждения равными объемами этанола, фильтрат перемешивают с отбеливающей глиной NZ 1 и фильтруют. Для отделения фосфорилированных производных применялась бумага, промытая комплексом (Пирпонт и сотрудники).

### Проявление

Для биоавтографии пантотеновой кислоты и для ее определения в элюате (Харрисон) использовались дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *S. carlsbergensis* 4228. Для этой цели пантотеновую кислоту необходимо сначала выделить из 4'-фосфопантотеновой кислоты. Выделение производят с помощью кишечной фосфатазы. Для определения факторов LBF наряду с бактериями *Lactobac. bulgaricus* использовались также бактерии *Ace-tobacter. suboxydans*.

Гидроксамовые кислоты проявляют 2%-ным водным раствором хлорного железа. При нагревании хроматограммы до 160° можно выделить из пантотеновой кислоты  $\beta$ -аланин (Виланд и Мауль).

Для отдельных составных частей кофермента можно применять различные методы химического и физического проявления. Аденин и его производные поглощают в ультрафиолетовой области (см. стр. 510), сульфгидрильные и бисульфидные соединения (цистеамин, пантетеин и их бисульфиды) можно идентифицировать с помощью йодазидной реакции (Д 163) и разделить нитропруссидом (Д 162). Ацилмеркаптаны (например, ацилкофермент А) образуют с гидроксиламином гидроксамовые кислоты, которые можно идентифицировать солями трехвалентного железа; путем омыления щелочами (NaOH, KOH или  $\text{NH}_3$ ) освобождается сульфгидрил, который реагирует с нитропруссидом. В качестве восстановителей сульфгидрилы реагируют с дихлорфенолиндифенолом (1%-ный водный раствор), молибденовый реактив дает характерную реакцию на фосфор (Д 45),  $\beta$ -аланин, цистеамин и пантетеин реагируют с нингидрином,  $\beta$ -аланин реагирует с йодом (Бергамини; Д 2). Аминогруппы и пептидные группы после хлорирования выделяют из йодидов йод. Рибозу (после дефосфорилирования в положении 3) можно окислять перйодатом натрия в альдегиды, взаимодействующие с реактивом Шиффа (Д 28a).

### Системы растворителей

Основой факторов роста бактерий *Lactobacillus bulgaricus* является пантетеин (пантоил- $\beta$ -аланилцистеамин); существовавшее ранее сомнение, является ли LBF индивидуальным веществом или состоит из нескольких компонентов, можно объяснить тем, что он легко образует с различными тиолами смешанные бисульфиды, которые хорошо разделяются хроматографическим методом (Браун и Снелл). Аналогичным образом ведет себя и кофермент А (Басфорд и Хюннекенс); применяя 70%-ный водный раствор этанола, можно выделить четыре формы:  $R_f$  0,42 — восстановленный кофермент А,  $R_f$  0,35 — очевидно, тиазолиновая форма,  $R_f$  0,15 и 0,00 — дисульфиды.

Значения  $R_f$  в некоторых системах растворителей приведены в табл. 124.  $\beta$ , $\beta$ -Диэтиланалог пантотеновой кислоты в системе 2-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 10 : 15) имеет значение  $R_f$  0,8, тогда как пантотеновая кислота — 0,7 (Виланд и Мауль).

Таблица 124

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ПРОИЗВОДНЫХ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ  
МОЛЕКУЛЫ КОФЕРМЕНТА А

Соединение	н-Бутанол 4 Уксусная кислота 1 H <sub>2</sub> O 5	н-Бутанол, насыщенный водой	Соединение	н-Пропанол 6 NH <sub>3</sub> 3 H <sub>2</sub> O 1	Изомасляная кислота 10 0,5 н. NH <sub>3</sub> 6
	Бэддили, Тейн [1, 2]	Снелл и Витупци [2]		Бэддили, Тейн [1], Пирпонт и сотрудники	
Пантотеновая кислота	—	0,57 <sup>a)</sup>	4'-Фосфопантотеновая кислота . . . . .	0,33	0,37
Пантоилгидроксамовая кислота . . . . .	0,61 <sup>b)</sup>	0,02	2'-Фосфопантотеновая кислота . . . . .	0,45	0,40
β-Аланин . . . . .	0,12 <sup>b)</sup>		2',4'-Фосфопантотеновая кислота (циклическая) . . . . .	0,62	
Цистеамин . . . . .	0,26	0,93	2',4'-Дифосфопантотеновая кислота . . . . .	0,13	0,18
N-β-Аланилцистеамин	0,1		Кофермент А . . . . .	0,07	
				0,13	
Пантетеин (пантетин)	0,75		Аденин . . . . .	0,65	0,90
			Аденозин . . . . .	0,73	0,79
			Аденозин-5'-фосфорная кислота . . . . .	0,13	0,18
			Аденозин-3'-фосфорная кислота . . . . .	0,30	0,56

<sup>a)</sup> Харрисон.

<sup>b)</sup> Шихо и Какач.

Вместо хроматографического отделения пантотеновой кислоты некоторые авторы сначала проводят ее гидролиз, а затем уже хроматографическим методом определяют либо β-аланин (Крокерт, Бергамини), либо пантоилгидроксамовую кислоту, образующуюся из α-окси-β,β-диметил-γ-бутиролактона (Шихо и Какач, II 133).

Ацилкоферменты А можно хроматографировать или непосредственно, или в довольно мягких условиях предварительно проводить реакцию с гидроксиламином; на основании хроматограмм образующихся гидроксамовых кислот можно делать вывод о характере исходных ацилкоферментов А. В системе этанол — 0,1 М ацетат натрия с рН 4,5 (1:1) кофермент А имеет значение  $R_f$  0,55, ацетилкофермент А — 0,75 (Стадтман).

## Фолиевая кислота и птеридиновые производные

К. Славик

Метод хроматографии на бумаге в применении к фолиевой кислоте и ее производным был использован во многих работах при изучении обмена веществ с целью анализа и выделения метаболитов и для идентифи-

кации отдельных производных методом сравнения со стандартным образцом. Метод хроматографии на бумаге хорошо зарекомендовал себя при определении строения различных природных производных фолиевой кислоты и других птеридинов, поскольку дал возможность идентифицировать продукты их расщепления, облегчив тем самым проведение структурного анализа с минимальным количеством материала. Кроме того, было изучено хроматографическое поведение ряда синтетически полученных птеридинов, значения  $R_f$  которых являются важными физическими константами. Использование значений  $R_f$  в качестве физических констант в случае птеридиновых производных имеет особенно большое значение, так как эти вещества имеют высокие, но нечеткие температуры плавления и спектры поглощения у многих из них весьма близки друг к другу.

### Приготовление образца

При обработке биологического материала, особенно гомогенатов ткани, хорошо зарекомендовал себя способ удаления белков добавлением  $1/10$  объема 70%-ной трихлоруксусной кислоты (Славик и Матушко [1]). После отделения белкового осадка трихлоруксусную кислоту можно легко удалить путем трехкратного промывания эфиром. Для удаления белка из инкубационных смесей, содержащих ферменты, рекомендуется добавка равного объема абсолютного этанола (Славик и Славикова [2]). При хроматографировании птеридинов мочи целесообразно подвергать предварительной очистке активированным углем (Славик и Славикова, неопубликованные данные; II 134). Благодаря этому можно исключить нежелательное влияние неорганических солей. Обессоливание птеридиновых веществ электролитическим методом проводить нельзя, поскольку они восстанавливаются на катоде с разложением.

### Сорт бумаги и нанесение образца

Для хроматографирования птеридинов большинство авторов применяют бумагу ватман 1 и 2 или Шлейхер — Шюльц 2043а (Чеше и Корте [2]). Для препаративных целей можно пользоваться бумагой ватман 3 (Славик и Славикова [2]). При хроматографировании чистых веществ Гуд и Джонсон рекомендуют наносить их в растворе 5%-ного аммиака в концентрации приблизительно 0,05—0,1%. Нанесение пробы в виде полосы является более предпочтительным, чем нанесение пробы в виде точки, особенно в случае применения водных растворителей. В случае птеридинов с гидрированным пиразинным циклом (кроме лейковорина) образец необходимо наносить и хроматографировать в атмосфере инертного газа ( $N_2$ , He), как это описано для случая хроматографирования производных тетрагидрофолиевой кислоты Гринбергом и Йенике. Хроматографирование в атмосфере  $CO_2$  не рекомендуется.

### Проявление

Большое число птеридинов сильно флуоресцируют, что позволяет обнаруживать их в ультрафиолетовом свете с длиной волны 365 мμ (фиолора). Некоторые птеридины, не поглощающие свет с длиной волны 365 мμ, можно успешно идентифицировать в свете лампы минералайт (или какой-либо другой) при длине волны 255 мμ в виде флуоресцирующих или светопоглощающих пятен (Альберт и Браун [1]).

Наиболее интенсивная флуоресценция наблюдается для большинства птерицинов при pH около 10; при pH меньше 3 и больше 11 наблюдается обычно гашение флуоресценции. Поэтому для усиления флуоресценции бумагу рекомендуют перед обнаружением пятен опрыскивать 3%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Только 7-замещенные птерицины (например, изоксантоптерин) флуоресцируют сильнее в слабокислой среде, нежели в среде щелочной.

Чеша и сотрудники [5] проявляют уротрион путем опрыскивания бумаги 0,1 н. раствором перманганата калия в серной кислоте. После исчезновения окрашивания при последующем опрыскивании хроматограммы перекисью водорода появляется флуоресцирующий зеленым цветом, напоминающим цвет мха, продукт окисления уротриона. Другие птерицины разлагаются на нефлуоресцирующие вещества.

Фолиевая кислота и ее конъюгаты не флуоресцируют. Если эти соединения находятся в количестве более чем 20  $\mu\text{g}$ , то их можно идентифицировать в ультрафиолетовом свете с длиной волны 365 м $\mu$  в виде темных пятен на бумаге, флуоресцирующей светло-фиолетовым цветом. Более чувствительный метод идентификации фолиевой кислоты предлагает Коменда, который восстанавливает ее с расщеплением хлористым титаном непосредственно на бумаге, после чего проявляет с помощью реакции Маршалла отщепившуюся ПАБ (Д 169). Из производных фолиевой кислоты  $\text{N}_{(10)}$ -формилфолиевая кислота флуоресцирует синим, а  $\text{N}_{(10)}$ -оксиметилфолиевая кислота — зеленым цветом. Гидрированные производные фолиевой кислоты не флуоресцируют и не гасят флуоресценцию. Большинство этих веществ окисляется на воздухе, и флуоресцирующие продукты окисления можно, следовательно, идентифицировать, если выдерживать хроматограмму в течение нескольких часов на воздухе (Гринберг и Йенике). Лейковорин воздухом не окисляется. Для проявления гидрированных птерицинов, малых количеств фолиевой кислоты и других ее нефлуоресцирующих производных можно пользоваться весьма чувствительной биоавтографией с применением *L. casei*, а для лейковорина — с применением *Leuconostoc citrovorum* (Зауберлих; Виланд и Хатчингс). Биоавтография является наиболее распространенным методом проявления фолиевой кислоты и ее биологически активных производных именно благодаря высокой чувствительности.

### Системы растворителей

Наиболее часто в качестве системы растворителей применяют систему бутанол — уксусная кислота в различных соотношениях (табл. 126), которую применили еще Гуд и Джонсон для изучения чистоты ксантоптерина, а другие авторы — для разделения производных фолиевой кислоты (Рауэн и сотрудники, Эрикссон и сотрудники [2]). Альберт и сотрудники [1] применяют систему *n*-бутанол — 5 н. уксусная кислота (2 : 1) для идентификации большого числа синтетических птерицинов. Для разделения птерицинов, не содержащих остатка *n*-аминобензоилглутаминовой кислоты, оказалась пригодной смесь пропанол — 1%-ный аммиак (2 : 1, Форрест и Митчелл [1]). Из остальных систем с органическими растворителями хорошо зарекомендовал себя при разделении конъюгатов фолиевой кислоты и других биологически активных факторов этой группы, содержащихся в крови, изоамиловый спирт, насыщенный цитратным буферным раствором с pH 9 (Виланд и Хатчингс). Для разделения конъюгатов фолиевой кислоты был также использован изо-

Таблица 125

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ПТЕРИДИНОВ В 3%-НОМ РАСТВОРЕ ХЛОРИСТОГО АММОНИЯ  
(Чеше и сотрудники [1—6])  
(пт — птеридин)

Птеридин	$R_f$	Птеридин	$R_f$
Птерородин . . . . .	0,00	7-Этилксантоптерин . . . . .	0,41
Метилптерородин . . . . .	0,00	4,7-Диокси-пт . . . . .	0,45
7-( $\gamma$ -Бензоилокси)-ацетонилксантоптерин . . . . .	0,04	6-Окси-7,8-дигидро-пт . . . . .	0,45
		6-Окси-пт . . . . .	0,45
		Ксантоптерин-ацетат . . . . .	0,49
4,7-Диокси-2-амино-9-ацетил-пт	0,14	2,4-Диокси-пт . . . . .	0,53
7-Ацетонилксантоптерин . . . . .	0,15	2-Амино-4-ОН-6-оксиметил-пт . . . . .	0,54
5-Ацетоксиметилфурано-пт . . . . .	0,15	2-Амино-4-окси-пт . . . . .	0,55
7-( $\gamma$ -Фталимидо)-ацетонилксантоптерин . . . . .	0,16	7-( $\beta$ -ОН- $\alpha$ -оксипропил)-ксантоптерин . . . . .	0,55
7-( $\gamma$ -Метокси)-ацетонилксантоптерин . . . . .	0,20	7-( $\beta$ -Оксипропил)-ксантоптерин . . . . .	0,55
		2-Амино-4-окси-пт-7-кислота . . . . .	0,57
		2-Амино-4-окси-пт-6-кислота . . . . .	0,60
4-ОН-2-Амино-5'-метилфурано-2',3',6:7-пт . . . . .	0,25	2-Амино-4-окси-пт-6-альдегид . . . . .	0,61
Лейкоптерин . . . . .	0,26	2-Амино-4-ОН-6-(диоксиэтил)-пт . . . . .	0,64
Уротрион . . . . .	0,29	7-Окси-пт . . . . .	0,65
6-Окси-7-амино-пт . . . . .	0,30	2-Амино-4-ОН-6-(триоксипропил)-пт . . . . .	0,67
Ксантоптеринкарбоновая кислота	0,30	2-Амино-4-ОН-6-(тетраоксипропил)-пт . . . . .	0,67
Изоксантоптеринкарбоновая кислота . . . . .	0,30	7-Сульфометилксантоптерин . . . . .	0,68
4-Окси-2-амино-5'-метилтиофано-2',3':6,7-пт . . . . .	0,30		
7-Ацетонилксантоптериндиацетат . . . . .	0,30		
Эритроптерин . . . . .	0,33	Энолацетат 4-окси-2-амино-4'-оксо-5'-метилдигидрофурано-2',3':6,7-пт . . . . .	0,73
7-Метилксантоптерин . . . . .	0,33	2-Амино-4-ОН-6-(1',2'-диоксипропил)-пт . . . . .	0,75
Изоксантоптерин . . . . .	0,37	7-Сульфэтилксантоптерин . . . . .	0,80
Продукт окисления уротриона . . . . .	0,37		
Ксантоптерин . . . . .	0,39		
2-Амино-4,7-диОН-пт-6-альдегид . . . . .	0,40		
4-Окси-2-амино-5'-метилтиофано-2',3':6,7-пт . . . . .	0,40		

амиловый спирт, насыщенный 5%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Закржевский и Никол [3]). Эта система также хорошо отделяет лейковорин от остальных птеридинов (табл. 127). Во всех приведенных смесях фолиевая кислота, имеет относительно низкие значения  $R_f$ . Стремясь повысить величину  $R_f$  фолиевой кислоты, некоторые авторы использовали также коллидин, насыщенный водой, смесь коллидина с лутидином и бутанола с морфолином (Закржевский и Никол [2]).

Кроме указанных смесей, для разделения птеридинов широко применялся ряд водных буферных растворов. Чеше и Корте [2] использовали для разделения птеридинов, не содержащих остатка *n*-аминобензоилглу-

Таблица 126

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПТЕРИДИНОВ ПРИ РАЗДЕЛЕНИИ СИСТЕМОЙ *n*-БУТАНОЛ—5 н. УКСУСНАЯ КИСЛОТА В СООТНОШЕНИИ 2 : 1 (Альберт и сотрудники) [1—3]

Птеридин	$R_f$	Птеридин	$R_f$
4,6,7-Триоксиптеридин 2-Амино-4,6,7-триоксиптеридин 2,4,6,7-Тетраоксиптеридин	0,05	7,8-Дигидро-6-оксиптеридин . . 6-Аминоптеридин 4-Оксиптеридин 2,4-Диоксиптеридин 4,6-Диоксиптеридин 4,7-Диоксиптеридин-6-альдегид	0,50
Оксим 4,7-диОН-птеридин-аль- дегида . . . . .	0,20	6-Метил-4-оксиптеридин . . . . .	0,55
Птеридин . . . . .	0,25	6-Окси-4,7-диметилптеридин . .	0,60
6-Оксиптеридин . . . . . 4,7-Диоксиптеридин	0,30	2-Аминоптеридин . . . . . 4-Аминоптеридин 4-Меркаптоптеридин	0,70
6,7-Диоксиптеридин . . . . .	0,35	7-Оксиптеридин . . . . .	0,75
2-Амино-4-оксиптеридин . . . . . Ксантоптерин	0,40	2-Метоксиптеридин . . . . . 2-Метил-4-аминоптеридин 2-Оксиптеридин	0,80
2-Окси-5-аминоптеридин . . . . . 2,4-Диаминоптеридин 4,4-Диокси-6-метилптеридин	0,45	2-Диметиламиноптеридин . . . . .	0,90
4-Окси-7-метилптеридин . . . . .	0,50		

таминовой кислоты, 3%-ный раствор  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (табл. 125); тот же самый растворитель для разделения ряда синтетически полученных птеридинов использовал Альберт и сотрудники [1]. Закржевский и Никол [3], пользуясь 0,1 н. фосфатным буферным раствором с pH 7, разделяли фолиевую кислоту, птероиновою кислоту, аметоптерин и другие вещества антагонистического характера. Для разделения гидрированных производных фолиевой кислоты рекомендуют применять 0,5 М раствор муравьиной кислоты с 1%-ным  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Гринберг и Йенике). Последний растворитель был использован для отделения аметоптерина от других соединений антагонистического характера (Хатчинсон и сотрудники). Для изучения и выделения метаболитов фолиевой кислоты был также применен 0,5%-ный раствор карбоната натрия и 2,5%-ный раствор аммиака (Славик и Матюлкова [1]).

Описанные водные системы растворителей обладают по сравнению с органическими растворителями определенными преимуществами,

Таблица 127

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Кислота	Изоамило- вый спирт, лимонно- кислый аммоний <sup>а</sup> )	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 12 этиленди- аминтетра- ацетат 0,2 $\text{H}_2\text{O}$ (ли- тилл.) до 100 (вес/объем)	0,1 М раствор фосфата (рН 7) <sup>б</sup> )	2-Бутанол, насыщенный 3%-ной ук- сусной кислотой
	Виланд, Хатчингс	Гринберг	Закржевский и Никол	
			[3]	[2]
Птероиновая . . . . .	0,04		0,04 (0,05)	0,10
Птероилглутам- $\alpha$ -глутаминовая	0,17			
Птероилглутаминовая . . . . .	0,19	0,24	0,37 (0,30)	0,25
Птероилглутам- $\gamma$ -глутаминовая . . . . .	0,35			
Птероилглутам- $\gamma$ -глутам- $\gamma$ -глутами- новая . . . . .	0,16		(0,58)	0,20
N <sup>10</sup> -Формилптероилглутаминовая	0,70	0,78	(0,80)	0,45
Лейковорин . . . . .	0,65	0,62	0,74 (0,73)	0,53
Аминоптерин . . . . .			0,16	
4-Амино-10-метилптероиновая . . . . .			0,33	
10-Метилптероиновая . . . . .			0,54	
4-Амино-10-метилптероилглутамино- вая . . . . .			0,55	
10-Метилптероилглутаминовая . . . . .			0,75	
Ризоптерин . . . . .		0,66	(0,62)	0,62
N <sup>5</sup> -Формилтетрагидроптероилдиглу- таминовая . . . . .			(0,83)	0,35
N <sup>5</sup> -Формилтетрагидроптероилтри- глутаминовая . . . . .			0,90 (0,90)	0,22
N <sup>10</sup> -Формилтетрагидроптерилглута- миновая . . . . .		0,54		
Тетрагидроптероилглутаминовая		0,48		

<sup>а</sup>) 5%-ный раствор лимонной кислоты, доведенный аммиаком до рН 9, смешивают с равным объемом изоамилового спирта. Бумагу погружают в обе фазы. Восходящая хроматография.

<sup>б</sup>) Значения  $R_f$ , приведенные в скобках, взяты из данных Гринберга (5%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ).

состоящими в том, что неорганические соли не препятствуют разделению и хроматографирование протекает гораздо быстрее (3—4 час) и, наконец, в том, что слаболетучие органические растворители являются помехой в биоавтографии, в измерении спектров и т. п. Недостатки водных растворителей проявляются при препаративном хроматографировании (анализируемый раствор наносят на бумагу в виде полос), когда зоны, расположенные вблизи фронта растворителя, имеют волнистую форму (гирлянды, ср. рис. 82).

### Устойчивость птерицинов при хроматографировании

Кроме птерицинов с гидрированным пиазиновым циклом, которые ввиду их легкой окисляемости требуют проведения работы в инертной среде, существуют некоторые птерицины, лабильные по отношению

к свету и величине pH (Джукс). Фолиевая кислота и ее конъюгаты частично фотолизируются, если они в течение нескольких часов подвергаются прямому облучению солнечным светом или светом флора-лампы. Лейковорин нельзя хроматографировать в растворителях, pH которых меньше 3, так как происходит быстрая циклизация между  $N_{(5)}$  и  $N_{(10)}$  в ангидролейковорин.

### Препаративное применение и количественный анализ

Для препаративных целей хроматографирование рекомендуется проводить, используя водные растворители на бумаге ватман 3 (Славик и Матюлкова [1]). В качестве одного из таких растворителей с успехом можно применить 2,5%-ный аммиак, который не загрязняет элюат неорганическими солями. При этом следует хорошо насыщать камеру. Элюирование лучше всего проводить с измельченной бумагой в 0,1—5%-ном растворе аммиака. Вымывание путем просасывания растворителя не рекомендуется. Измельченную бумагу можно легко отделить центрифугированием.

Для количественного анализа вымывание можно осуществить точно таким же образом, как и для препаративных целей. Однако при этом калибровку следует проводить со стандартными образцами, разделенными также хроматографическим методом, так как птеридины обычно остаются в известном количестве адсорбированными на бумаге и вымыть их количественно не удастся. Вымытые птеридины можно определять в элюатах флуорометрическим или каким-либо другим методом. Измерение флуоресценции непосредственно на бумаге не дает точных результатов.

## ГРУППА ВИТАМИНА $B_{12}$

### *В. Рабек*

Для группы витамина  $B_{12}$  метод хроматографии на бумаге применяется совместно с биоавтографией при микробиологическом испытании образцов, в которых витамин  $B_{12}$  присутствует вместе с веществами, проявляющими сходную биологическую активность. Метод хроматографии на бумаге применялся при разделении и идентификации различных продуктов расщепления витамина  $B_{12}$ . Вместе с методом электрофореза на бумаге метод хроматографии на бумаге имел решающее значение при открытии новых представителей этой группы и идентификации их «нуклеотидной» составляющей независимо от того, были ли эти факторы получены из природного материала (ил очистных станций, помет животных и т. д.) или искусственно при помощи биосинтеза в присутствии предшественников. В опытах по исследованию выделения и удержания радиоактивного витамина  $B_{12}$  живым организмом метод хроматографии на бумаге играет такую же роль, как и при исследовании содержания радиоактивных веществ в биологическом материале вообще.

### Проявление

Если соединения группы витамина  $B_{12}$  нанесены на бумагу в количестве минимум 10 $\mu$ г (Катбертсон и Смит), то их можно обнаружить визуально по природной окраске; в атмосфере HCN и при применении в качестве растворителя бутанола появляется розовое или карминово-

красное окрашивание, характерное для представителей этой группы, в молекуле которых содержится «нуклеотидный» компонент. При наличии факторов, не содержащих «нуклеотидного» компонента, возникает фиолетовое окрашивание (например, факторы В, J, L). В кислой среде фиолетовое окрашивание факторов переходит в оранжевое, тогда как красное окрашивание остается без изменения.

В том случае, когда концентрация факторов витамина  $B_{12}$  слишком мала, чтобы разделенные вещества можно было обнаружить по их природному окрашиванию, проявляют методом биоавтографии. Примером тому служит анализ сброженных жидкостей и отбросов, когда, согласно нашим данным, можно определять количества, равные 0,0001  $\mu\text{g}$  (*E. coli*).

Из микроорганизмов, которые применяются для определения витамина  $B_{12}$ , наиболее подходящими для биоавтографии являются молочно-кислые бактерии (*Lactobacillus lactis* Dorner ATCC 8000 и *Lactobacillus leichmannii* ATCC 4797 или 7830) и *E. coli* — мутант 113—3 (ATCC 10799).

Биоавтография проводится путем наложения хроматограммы, нарезанной на полоски шириной приблизительно 4 мм, на питательный агар, нанесенный на пластинки соответствующей величины (Д 170). На линию старта хроматограммы наносят от 0,001 до 0,1  $\mu\text{g}$  (максимум) найденного витамина  $B_{12}$  и по истечении одного часа с пластинок снимают полоски. После выдерживания в термостате на пластинках появляются зоны роста, причем они возникают в тех местах, где на бумаге были локализованы пятна факторов роста (согласно Форду и Холдсуор [1], при добавлении в питательную среду хлористого трифенилтетразолия достигается довольно контрастная окраска зон роста).

При использовании молочнокислых бактерий активными факторами роста, кроме витамина  $B_{12}$ , являются и дезоксирибозиды, а при применении *E. coli* зону роста образует метионин. Оба упомянутых микроорганизма реагируют, за небольшим исключением, на целый ряд факторов витамина  $B_{12}$  (табл. 128).

### Системы растворителей

Для разделения витаминов группы  $B_{12}$  путем нисходящей или восходящей хроматографии чаще всего применяют бумагу ватман 1 или ватман 4. Вудруф и Фостер рекомендовали для отделения витамина  $B_{12}$  от витамина  $B_{12a}$  бумагу ватман 1 пропитывать 0,66 н. раствором  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 4,6) с применением *n*-бутанола, насыщенного водой. *n*-Бутанол, насыщенный водой, который Уинстон и Эйген [2] предложили вначале использовать для отделения витамина  $B_{12}$  от дезоксирибозидов, при разделении факторов витамина  $B_{12}$  был заменен 2-бутанолом (Смит и сотрудники; Фантес и сотрудники [2]) или 2-бутанолом с добавкой уксусной кислоты (2-бутанол — вода — ледяная уксусная кислота — 5%-ный KCN в соотношении 100 : 50 : 1 : 0,25) или аммиака (2-бутанол — вода — аммиак (уд. вес 0,88) — 5% KCN в соотношении 100 : 50 : 1 : 0,25; Форд и сотрудники [2]). Добавление KCN к растворителю или насыщение камеры парами KCN имеет преимущество, состоящее в том, что предотвращается переход CN-формы витамина  $B_{12}$  (или его факторов) в ОН-форму под действием света, как указывает Патте [1]. Для отделения антибиотиков, особенно стрептомицина, этот автор [2] рекомендует пропитывать бумагу ватман 1 раствором KCN (1%-ным) и применять изопропанол с 30% воды (камеру насыщают 25 мл 1%-ного KCN и 4 мл 50%-ного  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Специальную систему для хроматографирования на бумаге

Таблица 128

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  ПРИРОДНЫХ ФАКТОРОВ ВИТАМИНА  $B_{12}$ 

Рациональное название (принято сим- позиумом в Гамбурге, 1956 г.)	Название	$R_{B_{12}}$					Воздействие <sup>a)</sup>			
		1	2	3	4	5	<i>E. coli</i>	<i>L. l.</i>	<i>E. Ugl.</i>	<i>Ochr.</i>
	Фактор D (Браун и сотрудники)						0	0	0	0
	Фактор $C_1$ (Форд и сотрудники) [2] Фактор $C_2$ Витамин $B_{12s}$ (Эрикссон и Льюис)	0,2					+++	+	+	0
Аденинцнукобамид <sup>b)</sup>	$\psi$ -Витамин $B_{12}$ $\psi$ -Витамин $B_{12b}$ )			0,42	0,48	0,23	+++	++	+++	0
2-Метиладенинцнукобамид	Фактор A (витамин $B_{12m}$ ) $\psi$ -Витамин $B_{12d}$ $\psi$ -Витамин $B_{12f}$	0,35— 0,45		0,46	0,60	0,31	+++	++	++	0
Гипоксантинцнукобамид	Фактор G			0,41	0,30	0,31	+++	0		0
2-Метилгипоксантинцнукобамид	Фактор H			0,50	0,36	0,36	+++	0		0
5-Оксибензимидазолцнукобамид	$B_{12}$ - фактор III (фактор I)	0,65		0,68	0,63	0,58	+++	++		++
	Фактор F (Браун и сотрудники)	0,77						+++		0 или +
5,6-Диметилбензимидазолцнукоба- мид	Витамин $B_{12}$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	+++	+++	+++	+++

Продолжение табл. 128

Рациональное название (принято сим- позиумом в Гамбурге, 1956 г.)	Название	$R_{B_{12}}$					Воздействие а)			
		1	2	3	4	5	<i>E. coli</i>	<i>L. t.</i>	<i>Eugl.</i>	<i>Ochr.</i>
	Фактор Е	1,35— 1,5					+++	0		0
	Фактор М (Рабек и сотрудники)		1,25				0			
	Фактор J (Рабек и сотрудники)		1,25				0			
	Фактор К (Рабек и сотрудники)		1,49				0			
Корфинамид	Фактор В (витамин $B_{12p}$ )	1,6— 1,7	1,59	1,30	1,00	1,25	+++	0	0	0
	Фактор L (Рабек и сотрудники)		1,76				0			

Системы: 1. 2-бутанол, насыщенный водой (в атмосфере HCN); ватман 3ММ, нисходящая хроматография, 24—48 час при 27° (Браун и сотрудники).  
2. 2-Бутанол—уксусная кислота—вода—насыщенный водой раствор KCN в соотношении 100:1:50:0,25; ватман 3ММ, нисходящая, 20—22° (Рабек и сотрудники).

3. 2-Бутанол, насыщенный водой и  $KClO_4$ +0,01% HCN; ватман 1, восходящая, 24 час при 20—22° (Бернхауер, частное сообщение).

4. 2-Бутанол (100 объемов)—вода (36 объемов)—25%-ный аммиак (14 объемов)—1%-ный раствор HCN (0,52 объема) (Бернхауер, частное сообщение).

5. 2-Бутанол, насыщенный водой+0,5% натриевой соли тетрафенилборной кислоты (ч. д. а.)+0,01%-ный раствор HCN (Бернхауер, частное сообщение).

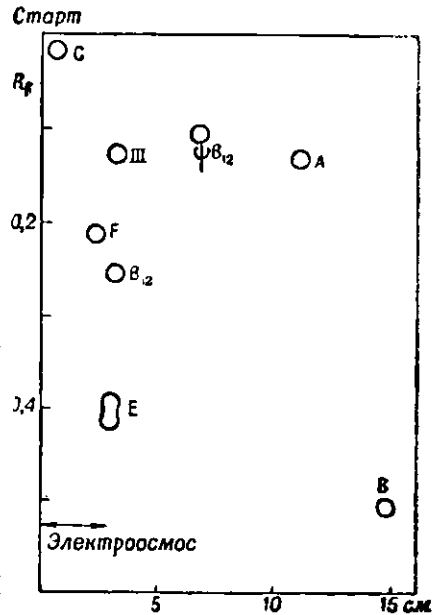
а) Воздействие: *E. coli* на пластинке агара, *Lactobacillus leichmannii*, *Euglena gracilis* и *Ochromonas malhamensis* в качестве турбидиметрического теста.

б) Цианкобамид, очевидно, лучше назвать цианетиокобаламин.

неочищенного экстракта печени рекомендует Богудкая и сотрудники (*n*-бутанол — этанол — бидистиллированная вода, 8 : 10 : 100, при восходящем хроматографировании на бумаге ватман 1, пропитанной 0,66 н. раствором  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Успехи в разделении главным образом тех факторов, которые в 2-бутаноле, насыщенном водой, проявляют малую подвижность, приводящую к неполному их отделению (например, фактор А и  $\psi$ -витамин  $\text{B}_{12}$ ), были достигнуты при добавлении к упомянутым выше растворителям так называемых «хроматотропных» солей (калиевой или натриевой солей тетрафенилборной, камфорсульфоновой, трихлоруксусной и хлорной кислот; Фридрих и Бернхауер [2]; Фридрих и

Р и с. 230. Разделение факторов витамина  $\text{B}_{12}$  при помощи электрофореза и хроматографии на бумаге (Холдсуэр).

Первое направление: электрофорез на бумаге в 1 н. растворе уксусной кислоты, содержащей 0,01% KCN; 16 час при 8 в/см; бумага ватман 4.  
Второе направление: хроматография в системе 2-бутанол — уксусная кислота — вода — 5%-ный раствор KCN (100 : 1 : 49 : 0,5).  
Обозначение факторов в табл. 128.



сотрудники [3]); эти соли снижают скорость малоподвижных веществ и влияют на подвижность веществ с высоким значением  $R_f$  (табл. 128). Согласно данным этих исследователей, указанные соли могут подавлять вредное влияние солей, препятствующих хорошему отделению компонентов, что можно объяснить подавлением «высаливания» водной фазы в месте локализации вредных солей на хроматограмме. Возможность полного разделения всех природных факторов витамина  $\text{B}_{12}$  обеспечивает комбинация метода хроматографии на бумаге (первое направление) с методом ионофореза на бумаге (второе направление), осуществляемая на квадратном листе хроматографической бумаги. Этот способ, предложенный Холдсуэром, удобен для препаративных целей с визуальным наблюдением пятен, поскольку биоавтографическое проявление является довольно сложным и нехарактерным (рис. 230).

### Количественный анализ

1. Вначале рассмотрим случай, когда испытуемый образец не содержит, помимо витамина  $\text{B}_{12}$ , ни одного микробиологически активного фактора этой группы.

При использовании молочнокислых бактерий хроматография необходима, если испытуемый образец, кроме витамина  $\text{B}_{12}$ , содержит еще дезоксирибозиды (например, в экстрактах печени), которые в условиях опыта являются такими же факторами роста, как и витамин  $\text{B}_{12}$ . Согласно данным Шоу и Яковица с сотрудниками, для количественного определе-

ния следует всю хроматограмму разрезать на части длиной 0,5—2 см и каждую часть отдельно промыть в жидкой питательной среде, применяемой для микробиологического определения. Для упрощения работы к образцу, нанесенному на бумагу, можно добавить рибофлавин (Шоу), значение  $R_f$  которого в системе бутанол — вода позволяет разграничить пятна дезоксирибозидов (более высокое значение  $R_f$ ) и витамина  $B_{12}$  (более низкое значение  $R_f$ ); в этом случае вместо биоавтографического проявления хроматограммы достаточно разрезать ее в том месте, где находится рибофлавин (определение в ультрафиолетовом свете), верхнюю часть разрезанной хроматограммы элюировать и провести количественный анализ элюата, пользуясь пластинками с агаром или более чувствительным турбидиметрическим методом.

При количественном анализе с применением *E. coli*, который в настоящее время является наиболее распространенным, в большинстве случаев нет необходимости проводить предварительное хроматографирование, поскольку здесь может мешать определению только метионин (и то приблизительно при 50 000-кратном избытке), который на агаровой пластинке образует зону роста, хорошо различаемую опытным исследователем.

Иначе обстоит дело при определении витамина  $B_{12}$  в неочищенных экстрактах печени, анализ которого на твердых средах весьма неточен, поскольку балластные вещества сильно влияют на диффузию в агаре. Несмотря на то что при применении *E. coli* образец соответствующим образом разбавляется, что позволяет исключить это вредное влияние, некоторые авторы получают неблагоприятные результаты и поэтому вынуждены проводить предварительное хроматографирование (Богущая и сотрудники; Боренштайн).

Утверждение некоторых авторов о том, что подвергнутые хроматографированию образцы имеют незначительно более высокую активность по сравнению с нехроматографированными образцами, находится в противоречии с мнением ряда других авторов, считающих, что при хроматографировании имеют место потери, достигающие 11—14%. На практике можно встретиться с обоими явлениями (Шух, частное сообщение), и это обстоятельство позволяет предположить, что приведенные цифры являются предельными значениями ошибок.

II. С открытием новых факторов витамина  $B_{12}$  возникла проблема анализа образцов, которые содержат наряду с витамином  $B_{12}$  родственные ему факторы, обладающие микробиологической, но не клинической активностью (см. табл. 128). Так как основная часть этих факторов влияет на рост микроорганизмов, применяемых при испытаниях, необходимо использовать метод хроматографии на бумаге как при применении молочнокислых бактерий, так и *E. coli*. В данном случае количественный анализ может быть затруднен менее совершенным разделением в присутствии таких факторов витамина  $B_{12}$ , подвижность которых мало отличается от подвижности витамина  $B_{12}$ , особенно если разделение осложняется, кроме того, присутствием в образце балластных веществ при низком содержании активной составляющей и высоком содержании сухого остатка. Это обстоятельство, усугубляющееся неблагоприятным влиянием адсорбции веществ при вымывании, приводит к неуверенности в правильности результатов, если мы для количественного определения применяем способ вырезания пятна из соответствующего отрезка хроматограммы. Однако в том случае, где имеет место хорошее и четкое разделение отдельных пятен, можно избежать параллельного хроматографирования с последующим элюированием вырезанного участка, если при этом использовать

возможность, которую дает нам фотографирование биоавтограммы, вырезание пятен из фотобумаги, взвешивание их и оценка в сопоставлении с обработанным аналогичным образом пятном стандартного образца (Фантес и О'Каллаган [4]).

Современное направление в развитии количественного метода определения витамина  $B_{12}$  в таких сложных смесях, позволяющее исключить применение биоавтографии, связано со стремлением отыскать микро-организмы-индикаторы, действующие исключительно на витамин  $B_{12}$  (*Ochromonas malhamensis*, *Poteriochromonas stipitata*).

## Аскорбиновая кислота и родственные ей соединения

Ж. Прохазка

Противоцинготный витамин встречается в природе в трех формах: *l*-аскорбиновая кислота (так называемая свободная, восстановленная форма), дегидроаскорбиновая кислота (обратимо окисленная форма) и, наконец, аскорбиген (связанная форма).

### Приготовление образца

При хроматографическом анализе природных растительных соков наличие в образце большого количества коллоидных соединений является помехой. Эти соединения приводят к изменению величины  $R_f$  аскорбиновой кислоты и к деформированию пятна. По этой причине исходный образец рекомендуется разбавлять ацетоном или метанолом (при этом белок, являющийся помехой при анализе, выпадает в осадок) с последующим промыванием бензолом с целью удаления липофильных балластных веществ. Белок можно также осаждать путем добавления метафосфорной или трихлоруксусной кислоты. При высоком содержании витамина С биологический материал (в виде стружки или гомогената) можно непосредственно экстрагировать 2%-ной метафосфорной или трихлоруксусной кислотой, после чего на бумагу наносить отфильтрованный экстракт. При хроматографировании аскорбигена упомянутые кислоты применять не рекомендуется, поскольку в сильно кислой среде аскорбиген неустойчив.

### Техника хроматографирования

Труднее всего работать с *l*-аскорбиновой кислотой, которая весьма легко подвергается всевозможным изменениям, связанным с окислением, особенно при pH более 7 и в присутствии следов металлов (Fe, Cu, Ag и др.). Поэтому некоторые авторы при хроматографическом анализе образцов с невысоким содержанием аскорбиновой кислоты работают в инертной, а иногда и в восстановительной атмосфере. Шамрай с сотрудниками и Ульман проводят хроматографический анализ в токе водорода в специальной стеклянной аппаратуре, позволяющей наносить образец на бумагу в атмосфере водорода. Шмидт и Штаудингер проводят хроматографирование в атмосфере углекислого газа, тогда как Тегетгофф и Иоганнесен хроматографируют в сероводороде. Однако в большинстве случаев,

главным образом при качественном анализе аскорбиновой кислоты в природном материале, можно обойтись без этих мер предосторожности, если соблюдать следующие условия:

а) перед нанесением раствора на бумагу к нему добавляют смесь метафосфорной и уксусной или щавелевой кислот, которая оказывает отчетливое стабилизирующее влияние на *l*-аскорбиновую кислоту и на другие ендиолы;

б) хроматографирование проводится в кислых системах;

в) исключается окислительно-каталитическое действие следов металлов в бумаге, в растворителе и в аппаратуре.

Последнее можно достигнуть несколькими способами: добавкой небольшого количества KCN или  $\text{Na}_2\text{S}$  в кислую водную фазу, находящуюся на дне камеры, или промыванием бумаги раствором комплексообразующего реактива (щавелевая кислота, 8-оксихинолин, комплексон) или анти-окислителем (тиомочевина); эти вещества можно также добавлять в растворитель.

Дегидроаскорбиновую кислоту можно хроматографировать либо как таковую (Ульман, Нисида и др.), либо в виде динитрофенилгидразона (Пачкий и Древол с сотрудниками), что, однако, менее удобно. Дегидроаскорбиновая кислота весьма неустойчива при высоких и очень низких значениях pH. Она наиболее стабильна при pH 2—3 (Шмидт и Штаудингер). Дегидроаскорбиновую кислоту всегда сопровождает продукт ее разложения с более низким значением  $R_f$ , по-видимому, дикетогулоновая кислота. По данным Шмидта и Штаудингера, дегидроаскорбиновую кислоту можно превратить непосредственно на бумаге в *l*-аскорбиновую кислоту действием сероводорода, а затем уже хроматографировать ее как восстановленную форму. Наоборот, Нисида окисляет восстановленную форму непосредственно в образце 0,1 н. раствором йода и хроматографирует затем дегидроаскорбиновую кислоту.

Аскорбинген является значительно более липофильным по сравнению со свободной аскорбиновой кислотой и обладает исключительно высокой чувствительностью по отношению к щелочам. Поэтому для хроматографирования аскорбингена выбирают менее полярные и нейтральные или слабокислые растворители. Аскорбинген устойчив к действию кислорода воздуха даже в присутствии металлов-катализаторов, поэтому для его хроматографирования не требуется специального оборудования.

Все три формы аскорбиновой кислоты чувствительны к действию света. До сих пор в природном материале не было найдено вещество, которое совпадало бы на хроматограмме с аскорбиновой кислотой. Хроматографирование лучше всего проводить в течение короткого времени, причем таким образом, чтобы фронт растворителя располагался всего лишь на 15 см от линии старта. Хейман и сотрудники показали, что все соединения, которые обычно затрудняют определение аскорбиновой кислоты методом титрования, например цистеин, глутатион, редуктон, редуктивная кислота, двухвалентные ионы железа и олова, сульфитный анион и др., имеют при хроматографировании на бумаге отличные от аскорбиновой кислоты значения  $R_f$ .

## Проявление

Проявление свободной аскорбиновой кислоты в большинстве случаев основано на ее сильной восстанавливающей способности. Чувствительность некоторых реактивов для проявления достигает 1 мкг. Наиболее

доступным и в то же время наиболее удобным реактивом является аммиачный раствор азотнокислого серебра (Д 4), раствор дихлорфенолиндифенола (Д 171) и синий йодкрахмальным раствор (Д 172). Для проявления можно также использовать все реактивы, пригодные для восстанавливающих сахаров (см. стр. 262), а также *п*-метокси-2-нитроанилин (синее пятно), хлористый титан(III) (оранжевое пятно), феррицианид калия (фиолетовое пятно на желтом фоне), какотелин (фиолетовое пятно), бромкрезоловый зеленый (желтое пятно на синем фоне), смесь хлорного железа и феррицианида калия (синее пятно), реактив Фолина — Дениса (синее пятно) и контактную фотografiю в ультрафиолетовом свете.

Дегидроаскорбиновую кислоту также можно определять аммиачным раствором азотнокислого серебра, однако проявляется эта кислота после опрыскивания гораздо медленнее, чем восстановленная форма, и только при нагревании, причем цвет пятна имеет более коричневый оттенок. Специфичным реактивом для проявления дегидроаскорбиновой кислоты служит раствор фенолгидразина (Д 173), который образует с этой кислотой и ее открытой формой — дикетоглутоновой кислотой — оранжевые пятна. Еще более специфичным реактивом является, по всей вероятности, раствор *о*-фенилендиамина (Огава), при обработке которым на бумаге возникают пятна с сильной синей флуоресценцией (Д 174).

Специфическим методом проявления аскорбигена является обработка йодкрахмальным реактивом (Д 172) после предварительного кислотного гидролиза на бумаге (Д 175). Если бумага влажная, то при этом на ней возникает светло-розовое пятно на синем фоне, которое после сушки переходит в фиолетовое пятно на белом фоне. Аскорбиген можно также идентифицировать в виде его соединения с индолом, используя для этой цели реактив на производные индола, но этот метод не является специфическим (Прохазка). Наиболее специфичным реактивом на аскорбиген является техническая соляная кислота (содержащая  $\text{FeCl}_3$ ) (Д 175), с которой после сушки в сушильном шкафу аскорбиген образует розовое пятно, а также формальдегидный реактив (Д 156), при обработке которым образуется пятно с оранжевой флуоресценцией.

### Системы растворителей

Для отделения аскорбиновой кислоты используют растворители, аналогичные тем, которые применяли для разделения сахаров, например *сим*-коллидин, фенол, изомасляная кислота и главным образом система *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5), которая наиболее удобна и чаще всего применяется. Однако в этих системах можно хроматографировать и соединения, родственные аскорбиновой кислоте (табл. 129).

Прохазка исследовал большое число растворителей с целью применения их для хроматографирования аскорбигена, причем некоторые из них оказались удовлетворительными (например, эфир, этилацетат, амил-ацетат и др.), но лучше всего зарекомендовал себя бутилацетат, насыщенный водой. Однако перед началом хроматографирования бумагу необходимо в течение нескольких часов выдержать в камере, насыщенной влагой.

### Количественный анализ

При количественном анализе *l*-аскорбиновой кислоты необходимо соблюдать все правила предосторожности, приведенные в начале этой главы. В основном они сводятся к следующему: быстрота работы в инертной

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И РОДСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Соединение	н-Бутанол 4 Уксусная кислота 1 H <sub>2</sub> O 5 <sup>a)</sup>	Фенол, насыщен- ный H <sub>2</sub> O + +1%-ная уксусная кислота <sup>a)</sup>	Колли- дин, на- сыщен- ный водой <sup>a)</sup>	Соединение	н-Бутанол 4 Уксусная кислота 1 H <sub>2</sub> O 5	
					нис- ходя- щая	вос- ходя- щая
					Про- хаз- ка <sup>b)</sup>	Ина- гаки и Соме
					Мапсон и Партридж	
Аскорбиновая кис- лота . . . . .	0,37	0,35	0,40	Аскорбиновая кислота . . . . .	0,35	0,42
Дегидроаскорби- новая кислота	0,41	0,38	0,44	Дегидроаскорби- новая кислота		0,52
Изоаскорбиновая кислота . . . . .	0,38	0,40	0,41	d-Арабоаскорбино- вая кислота . . .		0,43
Редуктиновая кислота . . . . .	0,64	0,78	0,40	3-Метилловый эфир аскорбиновой кислоты . . . . .	0,56	
Окситетроновая кислота . . . . .	0,63	0,62	0,49	Метилловый эфир 2-кетогулоновой кислоты . . . . .	0,31	
Редуктон . . . . .	0,63	0,66	0,46	2-Кето-l-гулоно- вая кислота . . .	0,09	
Диоксинацетон . .	0,39—0,43 <sup>b)</sup>			2,3-Дикето-l-гуло- новая кислота		0,27
				Диацетон-2-кето-l- гулоновая кис- лота . . . . .		0,73
				Ацетонид аскор- биновой кисло- ты . . . . .	0,79	
				Аскорбиген . . . .	0,78 <sup>г)</sup>	

a) Ватман 1, нисходящий способ; на дно камеры в водную фазу системы добавляют немно-  
го KCN.

b) Соотношение 10 : 2 : 5.

в) Неопубликованные данные. 3-Метилловый эфир аскорбиновой кислоты проявлен FeCl<sub>3</sub>  
(сине-фиолетовые пятна), остальные соединения — кислым раствором перманганата (Д 3a).

г) В бутилацетате  $R_f$  аскорбигена 0,44—0,50, аскорбиновой кислоты—0,0.

атмосфере ( $\text{CO}_2$ ), защита от действия света, кислая система растворителей, следы  $\text{HCN}$  в атмосфере камеры, сушка без нагревания. Затем пятна элюируют 0,5–3%-ным раствором щавелевой кислоты, причем элюирование основано или на хроматографическом принципе, или на экстракции нарезанного на кусочки пятна с последующей декантацией. В элюате аскорбиновую кислоту определяют либо колориметрическим методом, используя для этой цели дихлорфенолиндифенол (Чен и сотрудники), либо спектрофотометрически в ультрафиолетовой области при длине волны 245 мμ (Шмидт и Штаудингер). Иоганнесен элюирует пятно непосредственно реактивом, т. е. раствором диазотированного 4-метокси-2-нитроанилина, который в настоящее время является наиболее специфичным реактивом на аскорбиновую кислоту, и после подщелачивания элюата колориметрирует образовавшееся окрашивание (II 135).

Оригинальный метод определения *l*-аскорбиновой кислоты разработал Шанда. Этот метод был апробирован на многих предприятиях Чехословакии и благодаря своей специфичности, точности и простоте принят в качестве специального метода сопоставления. Речь идет здесь о комбинации метода измерения поверхности пятен с методом стандартных добавок (см. рис. 242, а), что позволяет полностью исключить при графических расчетах возможный источник ошибок (см. рис. 242, б и II 136).

Основное преимущество этого метода состоит в том, что нет необходимости проводить работу в инертной атмосфере, поскольку метод является чисто сравнительным, т. е. все возможные изменения аскорбиновой кислоты в нанесенном образце в процессе хроматографирования компенсируются тем, что одновременно на том же месте хроматографируется стандартный образец. Точность метода составляет приблизительно 5%. Однако этот метод не пригоден для анализа материала, содержащего меньше 10 мг% *l*-аскорбиновой кислоты; в этом случае необходимо применять другие методы. Способ хроматографирования, предложенный Шандой, а также другие хроматографические методы дают меньшие значения по сравнению с титрованием. Это обстоятельство объясняется спецификой данных методов.

При определении дегидроаскорбиновой кислоты поступают следующим образом: в одной части образца определяют восстановленную аскорбиновую кислоту, тогда как во второй части перед собственно хроматографическим определением сначала восстанавливают сероводородом дегидроаскорбиновую кислоту и только после этого определяют хроматографически все количество аскорбиновой кислоты точно так же, как в первой части образца. Содержание дегидроаскорбиновой кислоты можно затем рассчитать из разности обеих определений. Иоганнесен, а также Шанда и Давидек проводили восстановление образца сероводородом до нанесения его на бумагу, тогда как Шмидт и Штаудингер восстанавливают уже нанесенный на бумагу невысушенный образец, помещая его на 30 мин в камеру, заполненную сероводородом, и проводят после этого хроматографирование в той же атмосфере. Непосредственное хроматографическое определение дегидроаскорбиновой кислоты на бумаге можно было бы осуществить колориметрическим или флуориметрическим определением пятен, проявленных с помощью динитрофенилгидразина или *o*-фенилендиамина.

Аскорбиген можно также определять методом хроматографирования на бумаге по способу Валенты и сотрудников. К водному элюату пятен аскорбигена объемом около 4,5 мл добавляют 7,5 мл 80%-ной трихлор-

уксусной кислоты и нагревают в течение 7 мин на кипящей водяной бане. Затем смесь охлаждают и через 15 мин измеряют экстинкцию раствора. На основании калибровочной кривой, составленной предварительно для чистого аскорбингена, вычисляют количество аскорбингена, содержащегося в пятне.

Приведенные выше методы хроматографии на бумаге позволяют точно анализировать все три формы аскорбиновой кислоты при совместном их присутствии.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Albert A., Brown D. J., Wood H. C. S., J. Chem. Soc., 1952, 474. [1]  
 Albert A., Brown D. J., Wood H. C. S., J. Chem. Soc., 1953, 1620. [2]  
 Albert A., Brown D. J., Wood H. C. S., J. Chem. Soc., 1954, 3832. [3]  
 Baddiley J., Thain E. M., J. Chem. Soc., 1951, 2251; 1952, 800.  
 Baldantoni A., Spadoni M. A., Tecce G., Quaderni Nutrizione, 11, 327, 330 (1950).  
 Bartley W., Biochem. J., 56, 379 (1954).  
 Basford R. E., Huennekens F. M., J. Am. Chem. Soc., 77, 3878 (1955).  
 Bauer L., Naturwissenschaften, 39, 88 (1952).  
 Beran M., Šícho V., Chem. Listy, 45, 145 (1951).  
 Bergamini C., Sperimentale, Sez. chim. biol., 4, 38 (1953).  
 Blatná J., Krumphanzlová J., Venduláková O., Průmysl Potravin, 5, 391 (1954).  
 Bogucka J., Iwanowska J., Kakol H., Przemysł Chem., 9, 512 (1953).  
 Borensztajn D., Med. doświad. Mikrobiol., 6, 37 (1954).  
 Brante G., Upsala Läkaref. Förh., 53, 301 (1948).  
 Brown F., Biochem. J., 51, 237, 524 (1952).  
 Brown F. B., Cain J. C., Gant D. E., Parker L. F. J., Smith E. Lester, Biochem. J., 59, 82 (1955).  
 Brown G. M., Snell E. E., J. biol. Chem., 198, 375 (1952). [1]  
 Brown G. M., Snell E. E., J. Am. Chem. Soc., 45, 1691 (1953). [2]  
 Brown J. A., Anal. Chem., 25, 774 (1953). [1]  
 Brown J. A., Marsh M. M., Anal. Chem., 24, 1952 (1952). [2]  
 Cacioppo F., La Grutta G., Boll. Soc. ital. Biol. sper., 26, 1011, 1347 (1950), Nutrition Abstr. Rev., 21, 319, 616 (1951).  
 Crammer J. L., Nature, 161, 349 (1948).  
 Crokaert R., Arch. intern. Physiol., 56, 189 (1948).  
 Cuthbertson W. F. J., Smith E. Lester, Biochem. J., 44, v (1949).  
 Černý K., Sborník I. celostát. prac. konference analyt. chemiků. Nakladat. ČSAV, Praha, 1953, crp. 279.  
 Datta S. P., Overell B. G., Biochem. J., 44, xliii (1949); Datta S. P., Overell B. G., Stack-Dunne M., Nature, 164, 673 (1949).  
 De Cicco A., Rendi R., Boll. Soc. ital. Biol. sper., 30, 672 (1954).  
 Drevon B., Nofre C., Cier A., Compt. rend., 243, 607 (1956).  
 Eggitt P. W., Russell, Ward L. D., J. Sci. Food Agric., 4, 176 (1953). [1]  
 Eggitt P. W., Russell, Ward L. D., J. Sci. Food Agric., 4, 569 (1953). [2]  
 Eggitt P. W., Russell, Ward L. D., J. Sci. Food Agric., 6, 329 (1955). [3]  
 Ericson L. E., Lewis L., Arkiv Kemi, 6, 427 (1953); Acta chem. Scand., 7, 703 (1953). [1]  
 Ericson L. E., Widoff E., Bánhidi Z. G., Acta chem. Scand., 7, 974 (1953). [2]  
 Fantes K. H., O'Callaghan C. H., Biochem. J., 59, 79 (1955). [1]  
 Fantes K. H., Page J. E., Parker L. F. J., Smith E. Lester, Proc. roy. Soc. (London), Sec. B 136, 592 (1950). [2]  
 Ford J. E., Holdsworth E. S., Biochem. J., 53, xxii (1953). [1]  
 Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., Biochem. J., 59, 86 (1955). [2]  
 Ford J. E., Kon S. K., Porter J. W. G., Biochem. J., 50, ix (1951); 51, v (1951); 52, viii (1952); Brit. J. Nutrition, 6, 324 (1952). [3]  
 Forrest H. S., Mitchell H. K., J. Am. Chem. Soc., 77, 4865 (1955). [1]  
 Forrest H. S., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1950, 3295. [2]  
 Forter W., Karrer P., Helv. Chim. Acta, 36, 1530 (1953).  
 Friedrich W., Bernhauer K., Angew. Chem., 66, 776 (1954). [1]  
 Friedrich W., Bernhauer K., Z. Naturf., 10b, 6 (1955). [2]

- Friedrich W., Gross G., Bernhauer K., *Mikrochim. Acta*, **1956**, 134. [3]  
 Fujiwara M., Watanabe H., Matsui K., *J. Biochem. (Japan)*, **41**, 29 (1954).  
 Fuller R. C., Grisebach H., Calvin M., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2659 (1955).  
 Gaudiano A., Cingolani E., *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, **30**, 637 (1954). [1]  
 Gaudiano A., Spadoni M. A., Tecce G., *Rendiconti Ist. sup. Sanità*, **16**, 789 (1953). [2]  
 Gaudiano A., Tecce G., *Quaderni Nutriz.*, **11**, 33 (1950). [3]  
 Gaudiano A., Toffoli F., Boccacci M., *Rendiconti Ist. sup. Sanità*, **17**, 498 (1954). [4]  
 Giri K. V., Balakrishnan S., *Anal. Chem.*, **27**, 1178 (1955).  
 Good P. N., Johnson A. W., *Nature*, **163**, 31 (1949).  
 Green J., Marcinkiewicz S., *Nature*, **177**, 86 (1956). [1]  
 Green J., Marcinkiewicz S., Watt P. R., *J. Sci. Food Agric.*, **6**, 274 (1955). [2]  
 Green J. P., *Nature*, **174**, 369 (1954). [1]  
 Green J. P., Dam H., *Acta chem. Scand.*, **8**, 1341 (1954). [2]  
 Greenberg G. R., Jaenicke L., *Biochim. biophys. Acta*, **17**, 589 (1955).  
 Gregory J. D., Lipmann F., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4017 (1952).  
 Harrison J. S., *Analyst*, **76**, 77 (1951).  
 Heimann W., Strohecker R., Matt F., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **97**, 263 (1953).  
 Heyndrickx A., *J. Am. pharm. Assoc., Sci. Ed.*, **42**, 680 (1953).  
 Holdsworth E. S., ref. Ford J. E., Hutner S. H., *Vitamins and Hormones*, **13**, 101 (1955).  
 Huennekens F. M., Sanadi D. R., Dimant E., Schepartz A. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3611 (1953).  
 Hutchinson D. J., Waring G. B., Burchenal J. H., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **83**, 369 (1953).  
 Chen Y. T., Isherwood F. A., Mapson L. W., *Biochem. J.*, **55**, 821 (1953).  
 Inagaki, Soma, *Vitamins (Japan)*, **6**, 568 (1953); *РЖБиохим.*, **1956**, № 2020.  
 Johannesen B., *Pharm. Acta Helv.*, **30**, 22 (1955).  
 Jukes T. H., *Science*, **120**, 324 (1954).  
 Kočent A., *Chem. Listy*, **47**, 652 (1953).  
 Koriček E., Ashby D. R., *Biochem. J.*, **57**, xiii (1954).  
 Komenda J., *Chem. Listy*, **47**, 1877 (1953).  
 Kopecký A., *Průmysl Potravin*, **7**, 267 (1956).  
 Kraut H., Wildeman L., *Biochem. Z.*, **321**, 368 (1951).  
 Lichstein H. C., Christman J. E., *J. Bact.*, **58**, 565 (1949).  
 Lindberg O., Hummel J. P., *Arkiv Kemi*, **1**, № 2, 17 (1949).  
 Mapson L. W., Partridge S. M., *Nature*, **164**, 479 (1949).  
 Marten G., Gassmann B., *Vitamine und Hormone*, **6**, 318 (1954).  
 Matsukawa T., Yurugi S., *Science*, **118**, 109 (1953).  
 Melville D. B., Genghof D. S., Lee J. M., *J. biol. Chem.*, **208**, 503 (1954).  
 Miyaki K., Momiyama H., Hayashi M., *J. pharm. Soc. Japan*, **72**, 688 (1952); *Z. anal. Chem.*, **140**, 60 (1953); *C. A.*, **46**, 9147 d (1952).  
 Netien G., Lacharme J., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 643 (1955).  
 Nishida, *Vitamins (Japan)* **7**, 130 (1953); *РЖБиохим.*, **1956**, № 994.  
 Nunez G., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **36**, 411 (1954).  
 Ogawa S., *J. pharm. Soc. Japan*, **73**, 59 (1953).  
 Patschky A., *Angew. Chem.*, **62**, 50 (1950).  
 Patte F., *Ann. pharm. franç.*, **9**, 660, 747 (1951). [1]  
 Patte F., *Ann. pharm. franç.*, **11**, 37 (1953). [2]  
 Peterson E. A., Sober H. A., Meister A., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 570 (1952).  
 Pierpoint R., Hughes D. E., Baddiley J., Mathias P. A., *Biochem. J.*, **61**, 368 (1955).  
 Pleticha R., *Pharmazie*, **9**, 734 (1954).  
 Procházka Ž., *Chem. Listy*, **47**, 1637 (1953). [1]  
 Procházka Ž., *Chem. Listy*, **47**, 1643 (1953). [2]  
 Pusztai A., *Mag. Kém. Folyóirat*, **60**, 323 (1954).  
 Rábek V. T., Kašík D., Šichová O., Štědrá H., *Biochim. biophys. Acta*, **19**, 191 (1956).  
 Radhakrishnamurty R., Sarma P. S., *Current Sci.*, **22**, 209 (1953); *РЖХим.*, **1954**, 25351.  
 Rauen H. M., Stamm W., Kimbel K. H., *Z. physiol. Chem.*, **289**, 80 (1952).  
 Reed L. J., De Busk B. G., *J. biol. Chem.*, **199**, 873, 881 (1952). [1]

- Reed L. J., De Busk B. G., Homberger C. S., Jr., Gunsalus I. C., J. Am. Chem. Soc., 75, 1271 (1953). [2]
- Reed L. J., De Busk B. G., Johnston P. M., Getzendaner M. E., J. biol. Chem., 192, 851 (1951). [3]
- Rodrigues L. D., Alves da Silva J., Rev. Port. Farm., 5, 75 (1953); C. A., 50, 1264 (1956).
- Rossi A., Di Leva E., Riv. Ist. sieroter. Ital., 26, 258 (1951); cit. Schoen.
- Sakamoto S., Igaku to Seibutsugaku, 17, 58 (1950); C. A., 45, 1187 (1951).
- Sauberlich H. E., J. biol. Chem., 195, 337 (1952).
- Schachter E., Taggart J. V., J. biol. Chem., 203, 925 (1953).
- Schmidt H., Staudinger H. J., Biochem. Z., 326, 343 (1955).
- Schoen C., Acta vitaminol., 7, 151 (1953).
- Serchi G., Albertazzi G., Chimica, 1953, № 3.
- Shaw G. E., J. Pharm. Pharmacol., 1, 695 (1949); Biochem. J., 44, liv (1949).
- Siliprandi D., Siliprandi N., Biochim. biophys. Acta, 14, 52 (1954).
- Slavík K., Matoulková V., Chem. Listy, 48, 765 (1954). [1]
- Slavík K., Slavíková-Matoulková V., Chem. Listy, 50, 1141 (1956). [2]
- Smith E. Lester, Cuthbertson W. F. J., Walker A., Lees K. A., Biochem. J., 45, xii (1949), Federation Proc., 9, 230 (1950).
- Smockiewiczowa A., Acta Polon. pharm., 9, 304 (1952).
- Snell E. E., Brown G. M., Peters V. J., Craig J. A., Wittle E. L., Moore J. A., McGlohon V. M., Bird O. D., J. Am. Chem. Soc., 72, 5349 (1950).
- Snyder J. Q., Wender S. H., Arch. Biochem. Biophys., 46, 465 (1953).
- Spadoni A., Tesce G., Quad. Nutriz., 11, 26 (1950).
- Sproston T., Bassett E. G., Anal. Chem., 25, 552 (1954).
- Stadtman E. R., J. biol. Chem., 196, 535 (1952).
- Svobodová S., Hais I. M., Košťál J. V., Chem. Listy, 47, 205 (1953).
- Шамрай Э. Ф., Гаврилова Е. А., Кравченко В. В., Биохимия, 16, 604 (1951).
- Šanda V., Českoslov. Farm., 3, 79 (1954). [1]
- Šanda V., Davídek J., Českoslov. Farm., 6, 151 (1957). [2]
- Šicho V., Kakáč B., Čas. Lékařů čes., 92, 1372 (1953).
- Шноль С. Е., З. Бюлл. эксп. биол. мед., 39, № 4, 72 (1955).
- Tegethoff B., Z., Naturforschung, 8b, 347 (1953).
- Tschesche R., Barkemeyer H., Chem. Ber., 88, 976 (1955). [1]
- Tschesche R., Korte F., Chem. Ber., 84, 641 (1951). [2]
- Tschesche R., Korte F., Chem. Ber., 84, 801 (1951). [3]
- Tschesche R., Korte F., Chem. Ber., 87, 1713 (1954). [4]
- Tschesche R., Korte F., Heuschkel G., Chem. Ber., 88, 1251 (1955). [5]
- Tschesche R., Schäfer H., Chem. Ber., 88, 81 (1955). [6]
- Ulmann M., Pharmazie, 9, 523 (1954).
- Valenta M., Kutáček M., Icha F., Sborník ČSAZV, rostl. Výr., 29, 193 (1956).
- Viscontini M., Bonetti G., Ebnöther C., Karrer P., Helv. chim. Acta, 34, 1381, 1388 (1951).
- Whitby L. G., Nature, 166, 479 (1950); Biochem. J., 50, 433 (1952).
- Wieland O. P., Hutchings B. L., Arch. Biochem., 40, 205 (1952).
- Wieland T., Maul W., Biochem. Z., 326, 18 (1954).
- Winsten W. A., Eigen E., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 67, 513 (1948). [1]
- Winsten W. A., Eigen E., Federation Proc., 8, 265 (1949); J. biol. Chem., 181, 109 (1949). [2]
- Woodruff H. B., Foster J. C., J. biol. Chem., 183, 569 (1950).
- Wright L. D., Cresson E. L., Skeggs H. R., Peck R. L., Wolf D. E., Wood F. R., Valiant J., Folkers H., Science, 114, 635 (1951). [1]
- Wright L. D., Cresson E. L., Valiant J., Wolf D. E., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., 76, 4163 (1954). [2]
- Wright L. D., Driscoll C. A., J. Am. Chem. Soc., 76, 4999 (1954). [3]
- Yacowitz H., Norris L. C., Heuser G. F., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 71, 372 (1949).
- Yagi K., J. Biochem. (Japan), 38, 161 (1951); C. A., 45, 9097 (1951).
- Zakrzewski S. F., Nichol C. A., J. biol. Chem., 205, 361 (1953). [1]
- Zakrzewski S. F., Nichol C. A., Federation Proc., 14, 311 (1955). [2]
- Zakrzewski S. F., Nichol C. A., J. biol. Chem., 213, 697 (1955). [3]

# АНТИБИОТИКИ

---

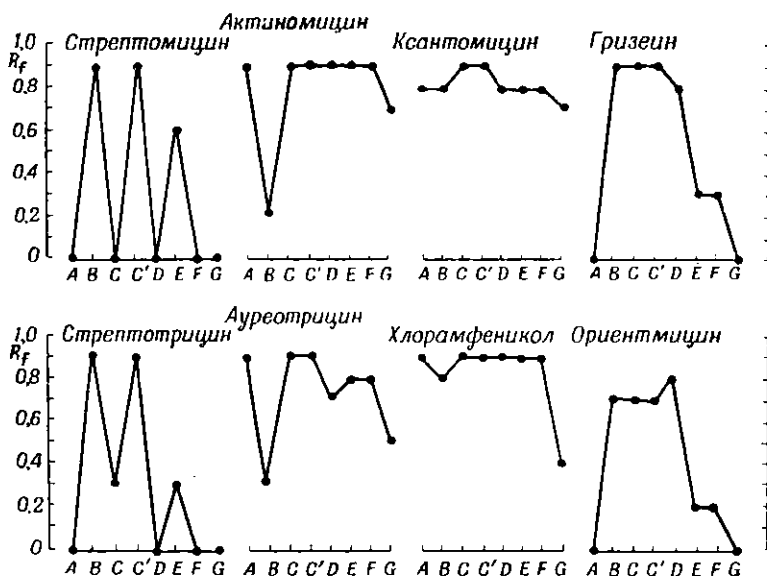
М. Догнал, И. М. Хайс

Подобно витаминам, антибиотики представляют собой биологически вполне определенную, но химически весьма разнородную группу веществ. Ввиду этого и системы растворителей, и способы проявления при их анализе с помощью хроматографии на бумаге приходится рассматривать отдельно для каждой группы. Хлорамфеникол рассмотрен не в этой главе, а вместе с нитросоединениями (стр. 399).

Общим для всех антибиотиков, и притом чрезвычайно характерным, является способ их биологического обнаружения по ингибированию роста микроорганизмов. В принципе возможны два варианта: разрезание хроматограммы на поперечные отрезки и проведение испытаний с этими отрезками (если необходимо, в жидкой среде) или непосредственное наложение хроматограммы на агаровую подложку, засеянную соответствующими микробами. Так как зоны ингибирования легче увидеть, если к пластинке агара приложена лишь полоска бумаги, обычно хроматографирование антибиотиков проводят на полосках, т. е. тем способом, который для других веществ из-за многих недостатков (неравномерное протекание растворителя вдоль краев, особенно если полоска неровно отрезана, неудобство сравнения параллельных опытов) отвергнут в пользу хроматографирования большого числа проб на одном листе бумаги. Альтернативой этому служит нанесение поперечных черточек и вырезание узких полосок из готовой хроматограммы; однако абсолютные количественные определения здесь едва ли возможны. Стивенс и Грейнджер в последнее время хроматографировали и биологически проявляли антибиотики на целых неразрезанных листах. Здесь необходимо упомянуть, что в бумаге присутствуют вещества, стимулирующие рост некоторых микробов (например, *n*-оксибензойная кислота); эти вещества могут ослабить или вообще нарушить пробу на ингибирование в случае малоактивных образцов. В качестве примера приведем стимулирование роста *Mycobacterium tuberc.* (штамм H<sub>37</sub>Rv) в модифицированной жидкой питательной среде Кирхнера (Франц и Хайс, неопубликованные данные). Предпосылкой для получения отчетливых биоавтограмм является однородность хроматографических бумаг.

Ввиду недостатка места не представляется возможным дать в этой книге подробные рецепты питательных сред для всех микробов, применяемых при испытаниях; однако в лабораториях, занимающихся исследованием антибиотиков, как правило, обычные рецепты известны. В качестве примера применения техники биоавтографии мы приводим рецепт питательной среды для *Bacillus subtilis* (Д 176).

Хроматография на бумаге и последующее биоавтографическое определение по ингибирующему действию имеют огромное значение для выявления новых антибиотиков и различения их от уже известных веществ



Р и с. 231. Идентификация некоторых антибиотиков на основе комбинации систем («summarized papergrams», Исида [1, 3], Ямато-дани).

Системы: A — *n*-бутанол, насыщенный водой; B — 3%-ный раствор  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; C — фенол — вода (4 : 1); C' — фенол — вода (4 : 1) в атмосфере аммиака; D — 50%-ный водный ацетон; E — *n*-бутанол — метанол — вода — метилоранж (40 : 10 : 20 мл + 1,5 г); F — *n*-бутанол — метанол — вода (4 : 1 : 2); G — бензидин — метанол (4 : 1) (по-видимому, в оригинале опечатка, вместо «бензидин» следует читать «бензин»).

(Бражникова [1], Чичестер, Исида и сотрудники [2]). В принципе возможны два способа серийного испытания (Миллер и Синклер). В одном из них хроматографируют испытуемые образцы питательных сред в нескольких системах растворителей рядом с большим числом стандартных известных антибиотиков. По другому способу сначала устанавливают  $R_f$  известных до сих пор антибиотиков во многих системах, полученные данные (наряду с прочими данными, например антибактериальным спектром, стойкостью к различным реагентам) наносят на перфокарты; затем хроматографические и прочие данные исследуемого образца механически сравнивают с данными на перфокартах. Очевидное преимущество второго способа состоит в экономии стандартных веществ, недостатком же является малая воспроизводимость значений  $R_f$ ; как компромисс можно хроматографировать наряду с исследуемым образцом хотя бы обычные антибиотики и выражать положение относительным числом ( $R_x$ ). Исида [1, 3] для графического изображения комбинации систем предложил название «summarized papergrams» (рис. 231).

## Пенициллины

В анализе пенициллинов хроматография на бумаге до настоящего времени занимает совершенно особое положение, поскольку других быстрых методов обнаружения значительного числа химически индивидуальных веществ в смеси пенициллинов практически не существует. Хроматографически можно доказать наличие примесей в бензилпенициллине (G), который является желательной составной частью препаратов, вырабатываемых промышленностью. При хроматографировании нет необходимости работать в стерильных условиях.

Как при распределительной хроматографии на колонках силикагеля, так и при хроматографии на бумаге буферные неподвижные фазы впервые были применены в случае пенициллинов (Гудолл и Леви), которые в качестве органических кислот в незабуференных нейтральных средах образуют пятна с размытыми «хвостами», а в средах с предельными значениями рН неустойчивы.

### Тип и форма бумаги, размеры образцов

Для распределительной хроматографии пенициллинов чаще всего рекомендуют использовать бумагу ватман 1 или 4. Полоски берут шириной 0,5—1,8 см. Обычно наносят максимально 3 МЕ в 3  $\mu$ л на бумагу, пропитанную фосфатным буфером (1 МЕ=0,6  $\mu$ г пенициллина G).

### Проявление

Аве и сотрудники химически проявляют пенициллин при помощи йодазидной реакции. После опрыскивания реактивом сразу же опрыскивают раствором крахмала (Д 1636).

Для биоавтографии большинство авторов пользуются *Staphylococcus aureus*, некоторые предпочитают непатогенный *Bacillus subtilis* (Д 176).

Полоски бумаги после высушивания накладывают в больших чашках Петри или пластинках (рис. 232) на засеянную питательную среду (необходима равномерная толщина слоя) и оставляют для впитывания и инкубации в помещении с равномерной температурой (в литературе указываются различные температуры и время экспозиции; наиболее подходящими являются 37° и 15 час). Для пенициллина оказалось непригодным снимать бумажную полоску и продолжать инкубацию в течение определенного времени без нее, как это удобно делать в случае стрептомицина. Стивенс и Грейнджер повышают четкость биоавтограмм с помощью метода отпечатков: биоавтограмму смачивают 1%-ным раствором метиленового голубого, содержащим 1% фенола, избыток снимают бумагой и затем делают отпечаток на бумаге. Повышения контрастности можно также достичь с помощью окрашивания микроорганизмов или питательной среды.

### Системы растворителей

Для эфира в качестве подвижной фазы в литературе приводится значительное число вариантов фосфатного буфера с рН 6,1—6,7 и концентрациями от 2,5 до 30%. Мы рекомендуем 2,5%-ный раствор фосфорно-

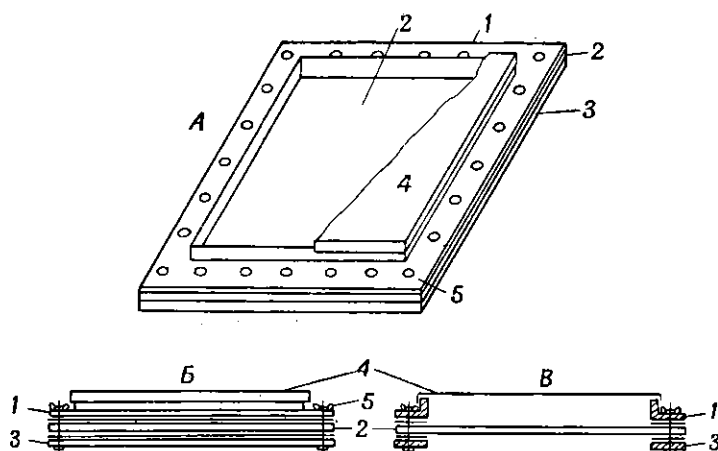
кислого калия. Ионы калия оказались более пригодными, нежели ионы натрия. Фардиг и Брид пропитывают бумагу новокаиново-цитратным буфером до половины длины. Как и следует ожидать, низкие значения  $R_f$  способствуют повышению величины  $R_f$  (Карновский и Джонсон). Для амилацетата в качестве подвижной фазы Уинстон и Спарк [4] пользуются фосфатом с pH 5. Для этилацетата Хейл и сотрудники применяют пропитку ацетатным буфером с pH 5,4 (для разделения более гидрофильных веществ). Следить за продвижением фронта эфира легче, если к последнему прибавить судан III (Джонсон, Ключер).

Затруднения при хроматографии пенициллина на бумаге связаны, с одной стороны, с летучестью органического растворителя (эфира), с другой стороны, с тем, что разделение проводится в неравновесных в смысле насыщения бумаги влагой условиях: бумага пропитана раствором фосфата, а для насыщения атмосферы пользуются водой. Поэтому необходимо тщательно герметизировать камеру и точно придерживаться указаний о способе увлажнения бумаги. Образец камеры показан на рис. 233. Камера может быть как металлической, так и стеклянной. Для лучшего насыщения атмосферы стенки камеры выложены влажной бумагой. Для серийных анализов удобнее увлажнять бумагу прямо в камере для хроматографии, нежели предварительно увлажнять ее в другом сосуде. В камеру помещают специальную чашку, наполненную водой с эфиром; эфир достаточно насыщается водой. Время разделения составляет всего несколько часов. Для получения воспроизводимых результатов необходимо поддерживать постоянную температуру, абсолютное значение которой не играет роли. Можно работать при комнатной температуре.

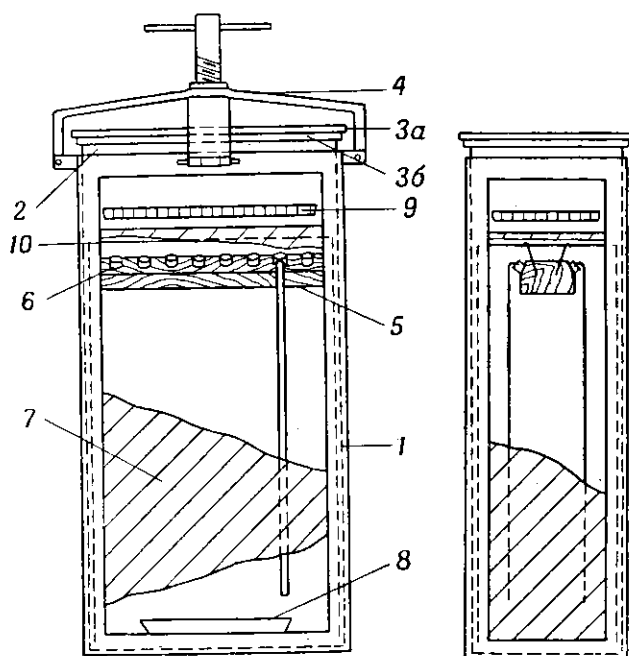
Чередование пенициллинов при распределительной хроматографии приведено в табл. 130. Легко видеть, что величина  $R_f$  понижается при гидроксировании и введении двойной связи, но повышается при удлинении алифатического остатка. Интересно, что значения  $R_f$  ароматически замещенных пенициллинов низки в сравнении с алифатически замещенными. Присоединение заместителя через эфирный кислород повышает липофильность (V в сравнении с G).

Из пенициллинов и родственных им антибиотиков, более гидрофильных, чем пенициллин X, лучше всего охарактеризован цефалоспорин N (по-видимому, тождественный синнематину B, Эйбрахам и сотрудники). При гидролизе его наряду с другими продуктами образуется *d*- $\alpha$ -аминоадипиновая кислота, охарактеризованная с помощью двумерной хроматографии (Ньютон и Эйбрахам [1]), образующаяся также при гидролизе цефалоспорина C, который, однако, отличается от собственно пенициллинов некоторыми химическими и биологическими свойствами. Цефалоспорин C можно отделить от цефалоспорина N, используя для хроматографирования сухой метанол на бумаге, пропитанной 1 M раствором фосфата натрия (pH 6) или 0,05 M раствором цитрата натрия (pH 5); он обладает еще меньшим значением  $R_f$ , нежели цефалоспорин N (Ньютон и Эйбрахам [2]). Пенициллин V (феноксиметилпенициллин), который имеет практическое значение для перорального введения, близок по своему значению  $R_f$  к  $\Delta^2$ -пентенилпенициллину, но отличается от последнего большей устойчивостью к гидролизу (Стивенс и Грейнджер).

Хупер пользуется системами растворителей, разделение в которых основано на совершенно ином принципе, по-видимому, на высаливании; он разделяет с помощью 40%-ного цитрата натрия, в котором пентенил- и пентилпенициллины движутся быстрее, нежели бензил- и гептилпенициллины.

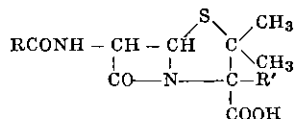


Р и с. 232. Рамка для отливки твердой питательной среды для биоавтографии крупных хроматограмм (Догнал).  
А — вид сверху; Б — вид спереди; В — поперечный разрез. 1, 3 — стальные рамки; 2 — стекло, вложенное между резиновыми прокладками; 4 — алюминиевая крышка; 5 — стяжные болты (могут быть заменены зажимами).



Р и с. 233. Шкаф для хроматографии пенициллина (Догнал).  
1 — стальная рама; 2 — стеклянный сосуд (аккумуляторная банка); 3а — стеклянная крышка, вставленная в стальную раму; 3б — прокладка из пластмассы; 4 — затягивающее устройство; 5 — деревянный держатель с пробирками, укрепленный на штативе 10; 6 — пробирки; 7 — фильтровальная бумага для увлажнения; 8 — сосуд для насыщающего раствора (вода — эфир); 9 — чашка для эфира, находящаяся на вставке из нержавеющей стали, расположенной на штативе 10 (вставка на чертеже не показана); 10 — штатив из нержавеющей стали для деревянного держателя 5.

Таблица 130

ПОЛОЖЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ ПЕНИЦИЛЛИНА НА ХРОМАТОГРАММЕ<sup>а)</sup>

Прежнее обозначение	Строение		Автор	б) $R_G$
	R	R'		
Синнематин А				
Цефалоспорин С	$d\text{-HOOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}$ $\quad\quad\quad  $ $\quad\quad\quad \text{NH}_2$	ОН	Ньютон и Эйбрахам [2]	
Цефалоспорин N		Н	Ньютон и Эйбрахам [1], Эйбрахам и сотрудники	
Синнематин В				
Пенициллин W			Хейл и сотрудники	
Пенициллин X	$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 -$	Н		0,17
Пенициллин VI			Гудолл, Леви	
Пенициллин G	$\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 -$	Н		1,00
	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2 -$	Н	Тайра	1,52
Пенициллин F <sup>в)</sup>	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2 -$	Н		1,62
Пенициллин V <sup>в)</sup>	$\text{C}_6\text{H}_5 - \text{O} - \text{CH}_2$	Н	Стивенс и Грейнджер	
Пенициллин, дигидро-F (d)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 -$	Н		2,18
Пенициллин VII			Гудолл, Леви	
Пенициллин K	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 -$ $\quad\quad\quad - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 -$	Н		3,10

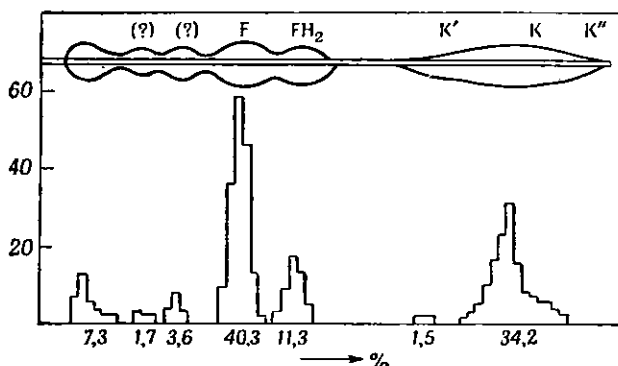
а) Таблица составлена на основании сравнения литературных данных, полученных для антибиотиков в подобных системах.

б) По отношению к пенициллину G (буфер с pH 5,6, эфир, насыщенный водой), Ямагодани.

в) Взаимное положение пенициллинов F и V не было установлено.

### Количественное определение

Количественную оценку производят по диаметру отчетливых зон ингибирования, отсчитывая значения по калибровочной кривой (0,25—3 МЕ). Форма этих зон не играет роли, хотя может быть у всех зон такая же, как и на хроматограмме метчиков. На полулогарифмической бумаге



Р и с. 234. Сравнение биоавтографии *in situ* и ростовых проб отдельных вырезок из хроматограмм для определения пенициллина (Карновский и Джонсон).

Половина бумажной полоски помещена на агар, засеянный *Bacillus subtilis* (верху). Вторая половина разрезана на четыре части, и содержание пенициллина установлено по радиусу ингибированных зон. Ступенчатая диаграмма указывает концентрации в миллиединицах, как функцию  $R_f$  (внизу). Следовательно, точность определения по ширине зон неразрезанной полосы вполне достаточна.

(диаметр зоны — логарифм числа единиц) точки ложатся на прямую, угол наклона которой следует время от времени проверять. Погрешность метода составляет 5—10%. Другой способ определения приведен в подписи к рис. 234.

### Хроматография гидроксамовых кислот

Помимо собственно пенициллинов, можно также хроматографировать гидроксамовые кислоты, получаемые при действии гидроксилами на  $\beta$ -лактамный цикл пенициллинов (П. Бейкер и сотрудники): 10—40 мг пенициллина растворяют в смеси равных объемов 4 н.  $\text{NH}_2\text{OH}$  и 3 н. едкого натра. Проявляют хлорным железом и после элюирования определяют колориметрически, предварительно переводя окрашенные комплексы в бутанол (П 137). Чувствительность невелика (ниже 100  $\mu\text{g}$ ), так что метод непригоден для неочищенных экстрактов и питательных сред. Бумагу ватман 4 пропитывают 0,1 М раствором кислого фталата калия, нижнюю треть листа — буферным раствором с pH 6,2. Подвижной фазой служит смесь диизопропилового эфира, изопропилового спирта и 0,1 М раствора кислого фталата калия (85 : 15 : 2,4). Для того чтобы атмосфера была вполне насыщена, по стенкам камеры, выложенным бумагой, непрерывно пропускают смесь обеих фаз, которую со дна вновь перекачивают вверх.

## Группа стрептомицина

При производстве стрептомицина задачей хроматографии на бумаге является главным образом отделение стрептомицина от маннозидострептомицина в пробах, отбираемых на различных стадиях производства,

а также отделение стрептомицина от дигидрострептомицина, особенно во время регенерации и на конечной стадии производства.

### Обнаружение

Для микробиологического обнаружения пользуются *Staphylococcus aureus* (Уинстон и Эйген [2]) или *Bacillus subtilis* (Хорн и Поллард). Присутствие некоторых неорганических солей в пробах повышает чувствительность контролирующего микроорганизма. Интересна возможность наблюдения на одной и той же биоавтограмме ростовых и ингибирующих зон, если применять специально адаптированный организм, для которого стрептомицин является необходимым фактором роста, а некоторые его производные — ингибиторами (Уинстон [1]); в питательной среде находится минимальное количество стрептомицина для того, чтобы ингибированные зоны были отчетливыми.

Для химического проявления пользуются модифицированным реактивом Сакагути (Д 104) или диацетильной пробой (Д 177) на гуанидиновую группу, реакцией Элсона — Моргана (Д 47) на N-метилглюкозаминовую группу.

### Системы растворителей

Наиболее распространенным является раствор 2% пиперидина и 2% *n*-толуолсульфокислоты в *n*-бутаноле, насыщенном водой (Уинстон и Эйген [2]). Разделение проводят в течение по крайней мере 48 час. С помощью этой системы, помимо стрептомицина, дигидрострептомицина и маннозидострептомицина, были охарактеризованы также оксистрептомицин (Бенедикт и сотрудники, Гранди), бис- $\alpha$ -оксистрептомициламин (Соломонс и Ренья) и N-алкилстрептомициламины (Уинстон [1, 3]). По Петерсону и Рейнке, хроматографирование можно ускорить примерно на 17 час, не вводя пиперидин; мы, однако, для более основательного разделения рекомендуем вводить хотя бы 1% пиперидина. Исида [2] разделял различные антибиотики актиномицетов смесью *n*-бутанол — метанол — вода — *n*-толуолсульфокислота (10 мл : 40 мл : 20 мл : 1 г) (табл. 131).

Таблица 131

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  СТРЕПТОМИЦИНОВ И РОДСТВЕННЫХ  
АНТИБИОТИКОВ (ИСИДА И СОТРУДНИКИ [2])  
*n*-Бутанол — метанол — вода — *n*-толуолсульфокислота  
(10 мл : 40 мл : 20 мл : 1 г)

Соединение	$R_f$	Соединение	$R_f$
Стрептомицин . . . . .	0,49	Стрептотрицин I . . . . .	0,27
Маннозидострептомицин . . . . .	0,10	Стрептотрицин II . . . . .	0,16
Дигидрострептомицин . . . . .	0,40	Стрептотрицин III . . . . .	0,22
Оксистрептомицин . . . . .	0,41	Неомицин В . . . . .	0,41
		Неомицин С . . . . .	0,53

Значительно менее распространены системы, предложенные Хорном и Поллардом и основывающиеся на ином принципе. Такой системой является смесь пиридина с хлористым аммонием или с 3%-ным раствором хлористого аммония; на хроматограмме возникает градиент концентрации и стрептомицин уносится в область с концентрацией  $\text{NH}_4\text{Cl}$  около 0,5%. Вытеснительное влияние различных катионов было исследовано Берти [1].

Хроматографически было охарактеризовано вещество, нарушающее эффект, вызываемый стрептомицином, которое выделяет *Pseudomonas aeruginosa* (Лайтбоун).

### Антибиотики группы тетрациклина

На практике часто оказывается необходимым различать тетрациклин, окситетрациклин (террамицин) и хлортетрациклин (ауреомицин). Смесь тетрациклина и хлортетрациклина или окситетрациклина образуется в ферментационной среде при производстве антибиотиков, подобная же смесь получается при полном восстановлении в тетрациклин. Смесь всех трех антибиотиков необходимо принимать во внимание также в готовых препаратах.

Для микробиологического обнаружения обычно пользуются *Bacillus subtilis* (Догнал и Бяла); Хики и Филлипс применяли *Sarcina lutea*. Физический способ обнаружения основывается на наблюдении желтой флуоресценции в ультрафиолетовом свете. С 2%-ным раствором *n*-диметиламинобензальдегида в 1,2 н. соляной кислоте ауреомицин и тетрациклин дают грязно-желтое окрашивание, а террамицин — сине-зеленое; окрашивание появляется спустя 5—8 час (Сокольский и сотрудники [1]). Фишбах и Левин проявляют хроматограммы 5%-ным раствором хлорного железа в метаноле.

Таблица 132

ТЕТРАЦИКЛИНЫ И НЕКОТОРЫЕ АНТИБИОТИКИ ДРУГИХ ГРУПП

Антибиотик	н-Бутанол 2 Уксусная 1 кислота 1 Вода 1	3%-ный арсенит натрия	Антибиотик	н-Бутанол 2 Уксусная 1 кислота 1 Вода 1
	Хики и Филлипс	Берти и Чима		Хики и Филлипс
Хлортетрациклин (ауреомицин) . . . . .	0,77 <sup>a)</sup>	0,05—0,09	Амицетин . . . . .	0,23
Тетрациклин . . . . .		0,13—0,17	Нетропсин . . . . .	0,16
Окситетрациклин (террамицин) . . . . .	0,70	0,65—0,71	Стрептомицин . . . . .	0,06
			Стрептогтрицин . . . . .	0,06
			Неомицин . . . . .	0,006

<sup>a)</sup> Бромтетрациклин в этой системе имеет подобное же значение  $R_f$  (Сенси и сотрудники).

В табл. 132 приводятся значения  $R_f$  в некоторых системах. Наиболее часто используют систему *n*-бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5 (Догнал, Бяла; Ренъя, Соломонс) или 2 : 1 : 1 (Хики, Филлипс). Фишбах и Левин в качестве особенно быстрой рекомендуют систему бутилацетат — метилизобутилкетон — *n*-бутанол — вода (5 : 15 : 2 : 22), к органическому слою которой после отделения добавлено 2 части муравьиной кислоты; предварительно бумагу умеренно насыщают водой. В системе этилацетат — вода (1 : 1) на бумаге, пропитанной фосфатом с pH 3 (60 г КОН, 70 мл концентрированной  $H_3PO_4$ , вода до объема 1000 мл), по Берду и Пью, антибиотики движутся в следующем порядке: хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин.

## Пептидные антибиотики

Легкая и сравнительно точная биологическая проба, основанная на подавлении роста микроорганизмов, позволила в группе антибиотиков выделить большее число индивидуальных пептидов, нежели в других группах соединений. Хотя эти антибиотики, за малым исключением (граммицидин S, аэроспорин, актиномицин С), в дальнейшем не нашли широкого применения в терапии, они представляют значительный теоретический интерес как благодаря некоторым интересным химическим свойствам, так и с общебиологической точки зрения.

### РАЗДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Как и в случае пенициллинов, для большинства пептидных антибиотиков существуют группы индивидуальных веществ, которые удается различать с помощью хроматографии на бумаге. К таким группам относятся полимиксины (включая аэроспорин и циркулин), бацитрацины, грамицидины и тироцидины, лихениформины, актиномицины, геомицины, латероспорины, нисины, стрептолины, энниатины.

Для разделения полимиксинов оказалось удобным пропитывать бумагу 0,2 *M* раствором гликокола, pH которого с помощью соляной кислоты доводят до 2,5 (II 133); хроматографируют в бутаноле. Значения  $R_f$  следующие: 0,18 (A), 0,38 (D), 0,54 (E), 0,56 (B). Проявляют биоавтографически с *Brucella bronchi septic* (Нэш и Смэши). Мистретта рекомендует смесь *n*-бутанол — вода — дипропиламин (125 : 60 : 4), в которой B имеет  $R_f$  0,43, а D — 0,23; менее удобен *n*-бутанол с уксусной кислотой и водой.

Цереин был получен хроматографированием на бумаге ватман 3 в смеси *трет*-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 5 : 20) (Боровский и сотрудники).

С точки зрения механизма хроматографии представляет интерес разделение стрептолинов (Ларсон и сотрудники). Бумагу пропитывают смесью 0,95 *M* раствора сульфата натрия и 0,05 *M* раствора бисульфата натрия; подвижной фазой служит 75%-ный этанол, в котором сульфат натрия практически нерастворим, так что последний выполняет функцию катионита. Основной антибиотик обменивается с катионами натрия в сульфате и образует сульфат стрептолина, трудно растворимый в протекаю-

щем спирте. В подвижной фазе содержится также хлористый натрий (концентрация не указывается), который благодаря обмену с сульфатом стрептолина выделяет антибиотик в раствор (хлорид стрептолина растворим). По этой же причине можно добавлять хлористый натрий и в питательную среду при биоавтографии.

### Актиномицины

В разделении индивидуальных хромопептидов из группы актиномицина значительные успехи были сделаны школой Брокмана; при этом пользовались предпочтительно круговой (секторной) хроматографией, а для препаративных целей — хроматопаком. Бумагу обычно сначала увлажняли неподвижной фазой, содержащей гидротропный агент. На еще влажную бумагу наносили образец и начинали вводить подвижную фазу.

В табл. 133 приведен обзор некоторых систем, а также данные о содержании аминокислот, полученные хроматографическим анализом на бумаге в модификации Буассона. В сравнении с системами, которые Брокман применял для противоточного извлечения тех же веществ, для хроматографических систем коэффициент распределения сдвинут в сторону неподвижной фазы. Грегори и сотрудники считают, что из различных растворителей наиболее пригодна смесь *n*-дибутиловый эфир — этилацетат — 2%-ный водный раствор нафталин-2-сульфокислоты (3 : 1 : 4 для круговой, 1 : 1 : 2 для обычной хроматографии). Кроме того, Вайнинг и сотрудники используют нейтральные системы, содержащие *o*-крезотинат натрия, и смесь циклогексан — метанол — бензол — пропиленгликоль (1 : 1 : 1 : 1) для восходящей хроматографии. Как и Брокман, более полярной фазой системы они пропитывают бумагу. Руссос и Вайнинг обозначают актиномицины из главных производящих штаммов (А, В, С, Х) индексами в зависимости от положения их в системе *сим*-тетрахлорэтан — *n*-дибутиловый эфир — 10%-ный водный раствор *o*-крезотината натрия (1 : 2 : 3), например для составной части  $D_{IV} : I$  0,27;  $II$  0,40;  $III$  0,56;  $IV$  1,0;  $V$  1,35;  $VI$  1,55—1,67. Главные составные части выделяли на колонке с порошкообразной целлюлозой (вышеприведенная система растворителей в соотношениях 1 : 4 : 5) и с помощью хроматографии на бумаге после гидролиза устанавливали содержание аминокислот. Однако не было показано, какие из этих актиномицинов тождественны веществам, выделенным Брокманом и сотрудниками.

### СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Хотя хроматографическая идентификация аминокислот после гидролиза чистого образца антибиотика со значительной вероятностью указывает на то, что исследуемое вещество является пептидом, однако она не всегда служит свидетельством типичного пептидного характера; другие вещества также могут при расщеплении выделять аминокислоты; например, из пенициллина образуется *d*-β-меркаптовалин (пеницилламин), а из пуромидина — *n*-метоксифенилаланин (Б. Бейкер и сотрудники). Еще рискованнее говорить о пептидном характере, если подвергнутый гидролизу антибиотик не был совершенно чист.

Что касается хроматографического разделения аминокислот, сопшемся на главу, посвященную последним; здесь же необходимо отметить,

Таблица 133

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ  
НЕКОТОРЫХ АКТИНОМИЦИНОВ**

Подвижность при круговой хроматографии выражена относительным значением  
в сравнении с актиномицином С<sub>2</sub>  
Содержание аминокислот в гидролизате установлено количественной  
хроматографией на бумаге (Брокман и сотрудники [2])

Система	Бумага увлажнена водным раствором соли	Подвижная фаза	Автор
A	10%-ный нафталин-1,6-ди-сульфонат натрия	<i>n</i> -Дибутиловый эфир	Брокман и Грёне [4]
B	10%-ный <i>m</i> -крезотинат натрия	<i>n</i> -Дибутиловый эфир 3 <i>n</i> -Бутанол 2	Брокман и Грёне [5]
C	10%-ный <i>m</i> -крезотинат натрия	<i>n</i> -Дибутиловый эфир 1 Бутилацетат 3	Брокман и Грёне [5]

Название <sup>а)</sup>	<i>R</i> <sub>C<sub>2</sub></sub> в системе			<i>l</i> -Тр б)	Сар- козин	<i>l</i> -Про	<i>d</i> -Вал	<i>l</i> -Ме- Вал	<i>d</i> -алло- ил
	A	B	C						
Группа С <sub>0</sub>	0,16	0,13	0,10						
С <sub>1</sub> (I <sub>1</sub> )=A	0,62	0,72	0,56	0,9	1,5	1,7	1,9	1,7	—
С <sub>2</sub> (I <sub>2</sub> )	1,0	1,0	1,0	1,4	1,4	1,9	0,9	1,9	0,9
С <sub>3</sub> (I <sub>3</sub> )	1,69	1,39	1,61	1,2	1,4	2,1	—	2,0	2,0
X <sub>0a</sub>		0,14	0,17						
X <sub>0</sub>		0,14	0,39						
X <sub>1</sub> =B <sub>1</sub>		0,48	0,53	0,9	1,9	2,1	1,9	1,9	—
X <sub>1a</sub>			0,71						
X <sub>2</sub>		0,72	0,92	0,7	2,1	1,1	2,1	2,1	—
X <sub>3</sub>		0,93	1,49						
X <sub>4</sub>		1,11	1,90						
I <sub>0</sub>		0,49	0,27						

<sup>а)</sup> Актиномицины, обозначения которых приведены в скобках, хроматографически не отличаются от актиномицинов, приводимых перед ними.

<sup>б)</sup> Значения для треонина занижены вследствие потерь при гидролизе.

что пептидные антибиотики содержат многие необычные аминокислоты, например  $\alpha,\gamma$ -диаминомасляную,  $\alpha,\beta$ -диаминопропионовую,  $\beta,\epsilon$ -диаминокапроновую кислоты, лантионин, метиллантионин, N-метиламинокислоты (см. табл. 133), геамин (производное 2-аминоимидазолина). Некоторые из них были выделены на колонке с порошкообразной целлюлозой при помощи системы *трет*-бутанол — уксусная кислота — вода (2 : 1 : 1) (Картер), например  $\beta,\epsilon$ -диаминокапроновая кислота. Во многих антибиотиках были найдены *d*-формы обычных аминокислот; при определении конфигурации применяли опрыскивание оксидазой *d*-аминокислот (Джонс, Льюис и Снелл, Синг).

Брокман и Франк [3] исследовали ход гидролиза актиномицина при помощи хроматографирования в смеси *n*-дibuтиловый эфир — бутанол (1 : 1) на бумаге, увлажненной 10%-ным водным раствором *m*-крезотината натрия, содержащим 1% 10 н. аммиака. Общей окрашенной составной частью актиномицинов является 3-амино-1,8-диметилфеноксазон (2)-4,5-дикарбоновая кислота (Брокман и сотрудники) [1].

Весьма интересным антибиотиком является советский препарат альбоминин, содержащий железо (Бражникова [2]).

Строение пептидных цепей изучалось методами, среди которых хроматография на бумаге также играла важную роль (см. стр. 465); пригодность этих методов сначала была изучена на советском препарате — грамицидине С, который обладает сравнительно простым строением (Конден и сотрудники).

## Прочие антибиотики

**Амицетин.** Для биоавтографии Хинмен и сотрудники используют *Mycobacterium avium*; они указывают, что в 90%-ном водном *n*-бутаноле его значение  $R_f$  составляет 0,22, а в *n*-бутаноле, насыщенном водой, — 0,46. См. также табл. 132.

**Антимицины** хроматографически можно разделить на составные части А, В и С (Шнайдер и сотрудники).

**Азасерин.** Для разделения азасерина (N-диазоацетил-*l*-серина), продуктов его расщепления и изомеров пригодна смесь *трет*-амиловый спирт — ацетон — вода (9 : 2,5 : 7,2; Фузари и сотрудники); на колонке с целлюлозой, промытой оксихинолином, применяли смесь *трет*-бутанол — уксусная кислота — вода (2 : 1 : 1).

**Циклосерин** или **оксамицин** (*d*-4-амино-3-изоксазолидон) был идентифицирован (в моче обезьян, которым он был введен) с помощью двумерной хроматографии в системах: I — *трет*-бутанол — *n*-бутанол (1 : 1), насыщенные 0,8 н. аммиаком ( $R_f$  0,82), II — *трет*-бутанол — 0,8 н. аммиак (1 : 1) ( $R_f$  0,11). Хроматограммы проявляли нитропруссидом натрия (синее пятно на светлом фоне) или нингидрином (желто-коричневое пятно; Конзелмен). Можно пользоваться и другими системами растворителей, пригодными для аминокислот.

**Эритромицин** удалось отличить от эритромицина В хроматографией на бумаге в системе метанол — ацетон — вода (19 : 6 : 75) и выделить на целлюлозной колонке, причем в последнем случае подвижной фазой служил 0,01 н. аммиак, насыщенный метилизобутилкетон (Петтинга). Сокольский [2] отделил эритромицин на бумаге в системе пропиловый спирт — четыреххлористый углерод — пропанол (75 : 75 : 2), в которой

наблюдались следующие значения  $R_f$ ; антибиотик из штамма *Nocardia gardneri*, выделяющего проактиномицин, — 0,19, эритромицин — 0,27, карбомицин — 0,71, метимицин — 0,56.

*Флавеолин* в бутаноле, насыщенном водой, имел  $R_f$  0,74 (Такахаси).

*Форомацидины А—D* — вещества, химически родственные эритромицину и карбомицину (магнамицину). Их можно проявить на хроматограмме 15%-ной фосфорной кислотой при нагревании до 100°; они дают сине-зеленое окрашивание и оранжевую флуоресценцию (Корбац и сотрудники). Форомацидины были подвергнуты разделению методом Брокмана — Грене [5], т. е. круговым хроматографированием в смеси дибутиловый эфир — уксусная кислота (1 : 3), насыщенного раствором *м*-крезотината натрия.

*Группа неомицина*. Неомицин хроматографически был охарактеризован в системе *n*-бутанол, насыщенный водой, с добавкой 2% *n*-толуолсульфокислоты (моногидрата); проявление с помощью *Bacillus subtilis*. Продукт его расщепления, неамин А (идентичный неомицину А), реагирует с нингидрином и отделяется в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (2 : 1 : 1, Ляч [1—2]). Сайто разделил неомицины и сопровождающие их антибиотики в системе метанол — 3%-ный раствор хлористого натрия (2 : 1); порядок расположения на хроматограмме по возрастанию значений  $R_f$  таков: неомицин С, неомицин В, фрамицетин, неомицин А, катенулин.

*Рамнацин* в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) имел величину  $R_f$  0,92; для биоавтографии применяли *Bacillus subtilis* (Ахмад и Ислам).

*Группа родомицина*. Сюда относятся оранжево-красные родомицины, в качестве хромофора содержащие родомициноны, и карминовые изородомицины, содержащие изородомициноны. Все нерастворимые в воде окрашенные компоненты полиоксиксантрахинонового характера были открыты в питательной среде *Streptomyces purpurascens* также и в свободном виде, что существенно облегчило исследование их строения. Из фракции гидролизата, растворимой в воде, была выделена диметиламинодезоксиальдоза — родозамин (Брокман и Шполер [8]). Для круговой хроматографии родомицинов, изородомицинов и родомицинонов Брокман и Патт [6] пользовались бумагой, увлажненной 0,2 *М* фосфатным буфером с pH 5,8; на еще влажную хроматограмму наносили образец и хроматографировали в *n*-бутаноле, насыщенном этим же буферным раствором. Порядок возрастания значений  $R_f$  следующий: изородомицин А, родомицин А, изородомицин В, родомицин В; родомициноны движутся с фронтом растворителя. Одномерная хроматография не дает удовлетворительных результатов. Для разделения фракции А пользовались *n*-бутанолом, насыщенным 10%-ной уксусной кислотой; для фракции В удобнее пользоваться бумагой, увлажняемой водной фазой смеси формамид — бутанол (1 : 1, вода добавляется до расслоения фаз), в качестве подвижной фазы служил бутанольный слой смеси. Для препаративных целей хроматоapak (в бутаноле, насыщенном 10%-ной уксусной кислотой) давал лучшее разделение и был более экономичен в отношении затраты растворителей, нежели противоточное разделение или хроматография на целлюлозной колонке (растворитель — бутанол, фосфатный буфер).

Родомициноны и изородомициноны можно разделить в системе с водным формамидом в качестве неподвижной и бензолом в качестве подвижной фазы (Брокман и Патт [7]). Обозначение их буквами греческого алфавита соответствует возрастанию значений  $R_f$ .

*Стрептомицин* Хуксема и сотрудники охарактеризовали в нескольких системах растворителей. В смеси вода — бутанол (96 : 4) он имел  $R_f$  0,8; добавление 2% *n*-толуолсульфокислоты понижало  $R_f$  до 0,65.

*Ксантоциллины* следует наносить на хроматограмму непосредственно перед разделением и предохранять хроматограмму от действия света, так как иначе возможно разложение (Канисс). В системе ксилол — 95%-ный этанол — уксусная кислота (77 : 21 : 2) они разделяются (перечислены в порядке возрастания величин  $R_f$ ) на ксантоциллин Z (сине-зеленая флуоресценция, со щелочью розовое окрашивание), ксантоциллин Y (сине-зеленая флуоресценция, со щелочью желто-коричневое окрашивание) и ксантоциллин X (сине-фиолетовая флуоресценция, со щелочью желтое окрашивание и флуоресценция).

## ЛИТЕРАТУРА

- Abraham E. P., Newton G. G. F., Olson B. H., Schuurmans D. M., Schenck J. R., Hargie M. P., Fisher M. W., Fusari S. A., *Nature*, **176**, 551 (1955).
- Ahmad K., Islam M. F., *Nature*, **176**, 646 (1955).
- Awe W., Neuwald F., Ulex G. A., *Naturwissenschaften*, **41**, 528 (1954).
- Baker B. R., Joseph J. P., Williams J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2838 (1954).
- Baker P. B., Dobson F., Martin A. J. P., *Analyst*, **75**, 651 (1950).
- Benedict R. G., Stodola F. H., Shotwell O. L., Bowd A. M., Lindenfelser L. A., *Science*, **112**, 77 (1950).
- Berti T., *Arch. intern. Pharmacodyn.*, **82**, 23 (1950). [1]
- Berti T., Cima L., *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, **30**, 1123 (1954); *Boll. Ist. sieroterap. milanese*, **33**, 643 (1954). [2]
- Bird H. L., Jr., Pugh C. T., *Antibiotics and Chemotherapy*, **4**, 750 (1954).
- Boissonas R. A., *Helv. chim. Acta*, **33**, 1957 (1950).
- Borowski E., Kryński S., Kurylo-Borowska Z., Wasielewska D., *Acta biochim. polon.*, **2**, 389 (1955).
- Бражникова М. Г., *Успехи современной биологии*, **29**, 360 (1950). [1]
- Бражникова М. Г., Ломакina Н. Н., Муравьева Л. И., *ДАН СССР*, **99**, 827 (1954). [2]
- Brockmann H., Bohnsack G., Franck B., Gröne H., Muxfeldt H., Süling C., *Angew. Chem.*, **68**, 70 (1956). [1]
- Brockmann H., Bohnsack G., Gröne H., *Naturwissenschaften*, **40**, 223 (1953). [2]
- Brockmann H., Franck B., *Chem. Ber.*, **87**, 1767 (1954). [3]
- Brockmann H., Gröne H., *Naturwissenschaften*, **40**, 222 (1953). [4]
- Brockmann H., Gröne H., *Chem. Ber.*, **87**, 1036 (1954). [5]
- Brockmann H., Patt P., *Naturwissenschaften*, **40**, 221 (1953). [6]
- Brockmann H., Patt P., *Chem. Ber.*, **88**, 1455 (1955). [7]
- Brockmann H., Spöhler E., *Naturwissenschaften*, **42**, 154 (1955). [8]
- Carter H., Clark R. K., Jr., Kohn P., Rothrock J. W., Taylor W. R., West C. A., Whitfield G. B., Jackson W. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 566 (1954).
- Consdon R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Syngé R. L. M., *Biochem. J.*, **41**, 596 (1947).
- Conzelman G. M., Jr., *Antibiotics and Chemotherapy*, **5**, 444 (1955).
- Corbaz R., Ettlinger L., Gäumann E., Keller-Schierlein W., Kradolfer F., Kyburz E., Neipp L., Prelog V., Wettstein A., Zähler H., *Helv. chim. Acta*, **39**, 304 (1956).
- Dohnal M., Bialá J., *Chem. Listy*, **48**, 1261 (1954).
- Fardig O. B., Breed N. D., *Federation Proc.*, **8**, 196 (1949).
- Fischbach H., Levine J., *Antibiotics and Chemotherapy*, **5**, 640 (1955).
- Fusari S. A., Haskell T. H., Frohardt R. P., Bartz Q. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2881 (1954).
- Goodall R. R., Levi A. A., *Nature*, **158**, 675 (1946); *Analyst*, **72**, 277 (1947).
- Gregory F. J., Vining L. C., Waksman S. A., *Antibiotics and Chemotherapy*, **5**, 409 (1955).

- Grundy W. E., Whitman A. L., Hanes M. E., Sylvester J. C., *Antibiotics and Chemotherapy*, 1, 309 (1951).
- Hale C. W., Miller G. A., Kelly B. K., *Nature*, 172, 545 (1953).
- Hickey R. J., Phillips W. F., *Anal. Chem.*, 26, 1640 (1954).
- Hinman J. W., Caron E. L., De Boer C., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 5864 (1953).
- Hoeksema H., Bergy M. E., Jackson W. G., Shell J. W., Hinman J. W., Fouken A. E., Boyack G. A., Caron E. L., Ford J. H., Devries W. H., Crum G. F., *Antibiotics and Chemotherapy*, 6, 143 (1956).
- Hooper I. R., Johnson D. L., Taylor H. D., *Federation Proc.*, 8, 207 (1949).
- Horne R. E., Jr., Pollard A. L., *J. Bact.*, 55, 231 (1948).
- Chichester D. F., *Drug Trade News*, 25, 29 (1950); Routien J. B., Finlay A. C., *Bacteriol. Revs.*, 16, 51 (1952).
- Ishida N., Miyazaki J., *J. Antibiotics (Japan)*, 5, 481 (1952). [1]
- Ishida N., Miyazaki J., Omachi K., Okamoto S., *J. Antibiotics (Japan)*, 6, 1 (1953). [2]
- Ishida N., Shiratori T., Okamoto S., Miyazaki J., *J. Antibiotics (Japan)*, 4, 505 (1951). [3]
- Johnson M. J., *J. clin. Invest.*, 28, 1039 (1949).
- Jones T. S. G., *Biochem. J.*, 42, lix (1948).
- Kaniss N., *Pharmazie*, 9, 203 (1954).
- Karnovsky M. L., Johnson M. J., *Anal. Chem.*, 21, 1125 (1949).
- Kluener R. G., *J. Bact.*, 57, 101 (1949).
- Larson L. M., Sternberg H., Peterson W. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 2036 (1953).
- Leach B. E., DeVries W. H., Nelson H. A., Jackson W. G., Evans J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 2797 (1951). [1]
- Leach B. E., Teeters C. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 2794 (1951). [2]
- Lewis J. C., Snell N. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 4812 (1951).
- Lightbown J. W., *Nature*, 166, 356 (1950).
- Miller R. P., Sinclair A. C., *ref. Chem. and Eng. News*, 32, 3940 (1954).
- Mistretta A. G., *Antibiotics and Chemotherapy*, 6, 196 (1956).
- Nash H. A., Smashey A. R., *Arch. Biochem.*, 30, 237 (1951).
- Newton G. G. F., Abraham E. P., *Nature*, 172, 395 (1953); *Biochem. J.*, 58, 103 (1954). [1]
- Newton G. G. F., Abraham E. P., *Nature*, 175, 548 (1955); *Biochem. J.*, 62, 651 (1956). [2]
- Peterson D. H., Reineke L. M., *J. biol. Chem.*, 181, 95 (1949); *J. clin. Invest.*, 28, 1053 (1949).
- Pettinga C. W., Stark W. M., Van Abele F. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 569 (1954).
- Regna P. P., Solomons I. A., *Annals New York Acad. Sci.*, 53, 229 (1950).
- Roussos G. G., Vining L. C., *J. Chem. Soc.*, 1956, 2469.
- Saito A., Schaffner C. P., 3e Congrès intern. Biochim. Bruxelles (1955); *ref. Angew. Chem.*, 67, 666 (1955).
- Sensi P., De Ferrari G. A., Gallo G. G., Róland G., *Farmaco (Pavia)*, Ed. Sci., 10, 337 (1955); *C. A.*, 49, 13597h (1955).
- Schneider H. G., Tener G. M., Strong F. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 37, 147 (1952).
- Sokolski W. T., Koffler H., Tetrault P. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 43, 236 (1953). [1]
- Sokolski W. T., Ullmann S., Koffler H., Tetrault P. A., *Antibiotics and Chemotherapy*, 4, 1057 (1954). [2]
- Solomons I. A., Regna P. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2974 (1950).
- Stephens J., Grainger A., *J. Pharm. Pharmacol.*, 7, 702 (1955).
- Synge R. L. M., *Biochem. J.*, 44, 542 (1949).
- Takahashi B., *J. Antibiotics (Japan)*, Ser. A, 6, 11 (1953); *C.*, 1955, 8415.
- Vining L. C., Gregory F. J., Waksman S. A., *Antibiotics and Chemotherapy*, 5, 417 (1955).
- Winsten W. A., *J. clin. Invest.*, 28, 850 (1949). [1]
- Winsten W. A., Eigen E., *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 3333 (1948). [2]
- Winsten W. A., Jarowski C. I., Murphy F. X., Lazier W. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 3969 (1953). [3]
- Winsten W. A., Spark A. H., *Science*, 106, 192 (1947). [4]
- Yamatodani S., *J. Antibiotics (Japan)*, 3, 400 (1950). [1]
- Yamatodani S., *Hemmstoffe — в книге Linskens H. F. (red.): Papierchromatographie in der Botanik*, Springer, Berlin 1955, S. 181. [2]

# ИНСЕКТИЦИДЫ

---

**В. Батора**

Успехи, достигнутые в химическом и биологическом исследовании инсектицидных веществ, были обусловлены развитием новых методов анализа этих веществ. Физико-химические, биологические и ферментативные методы, которые обычно используются для анализа чистых веществ, в данном случае ввиду их неспецифичности оказались непригодными. Получение надежных результатов стало возможным лишь благодаря использованию хроматографии на бумаге и ее комбинации с новейшими физико-химическими методами.

Применяемые в настоящее время инсектициды можно разделить на три основные группы: пиретрины (природные и синтетические), хлорированные углеводороды и органические соединения фосфора.

## ПИРЕТРИНЫ

Экстракты цветов растения *Crysanthemum cinerariaefolium* содержат смесь биологически активных сложных эфиров и их стереоизомеров. Речь идет о так называемых хризантемовых эфирах («пиретрины I»), получаемых из циклопропанмонокарбоновой (хризантемовой) кислоты, и пиретриновых эфирах («пиретрины II»), получаемых из монометилового эфира циклопропандикарбоновой (пиретриновой) кислоты. Обе кислоты этерифицированы смесью кетоспиртов пиретролона и синеролонa. Хроматографию на бумаге очень часто используют при исследовании метаболизма и состава природных экстрактов. До сих пор не удавалось разделить все биологически активные эфиры, особенно стереоизомеры. Удастся осуществить лишь групповое разделение компонентов экстракта на хризантемовые и пиретриновые эфиры.

### Обнаружение

Из химических методов чаще всего используют метод обнаружения двойной связи этих соединений. Лорд и сотрудники применяют при проявлении перманганат калия в комбинации с формальдоксимовым реакти-

вом Дениже (Д 178). Уинтерингем и сотрудники [2] используют в этом случае комбинацию перманганата калия с бензидином (Д 179). Бергамини и Версорезе использовали для проявления реактив Дениже (Д 180). Из физических методов для обнаружения можно использовать радиометрические или автордиографические методы определения радиоактивного углерода  $C^{14}$ . Для идентификации сложных эфиров, обладающих различной биологической активностью, Уинтерингем [1] испытывал действие этих эфиров на мухах (*Musca domestica* L.).

### Системы растворителей

Согласно сообщению Уинтерингема [1], разделение пиретринов и синтетического аллетрина можно осуществить на бумаге, пропитанной 3%-ным эфирным раствором вазелина, используя в качестве подвижной фазы систему аммиак — вода — этанол (5 : 50 : 45). Это разделение проводили в атмосфере азота. В указанном случае было осуществлено отделение «пиретринов I» от «пиретринов II». По данным Лорда и сотрудников, для разделения этих веществ можно также использовать адсорбционную хроматографию на бумаге, пропитанной гидроокисью алюминия (II 5). В качестве подвижного растворителя была использована смесь бензола с петролейным эфиром. «Пиретрины I» перемещаются на хроматограмме впереди «пиретринов II». При хроматографировании 2,4-динитрофенилгидразонов не было получено достаточно хорошего разделения (Лорд и сотрудники).

Для отделения неизмененных сложных эфиров от продуктов ферментативного расщепления Уинтерингем и сотрудники [2] рекомендуют использовать повторное хроматографирование при пониженном давлении. В качестве первого растворителя был использован петролейный эфир (т. кип. 35—60°), насыщенный 10%-ным водным раствором соляной кислоты; в качестве второго растворителя — петролейный эфир, насыщенный аммиаком (уд. вес 0,9).

Бергамини и Версорезе хроматографировали экстракты, содержащие пиретрины, после их щелочного гидролиза. Хроматографирование вели методом круговой хроматографии в системе *n*-пропанол — вода — аммиак (4,5 : 1 : 0,5).

## ХЛОРИРОВАННЫЕ УГЛЕВОДОРОДЫ

При изучении этой группы веществ с помощью хроматографии на бумаге приходится иметь дело со сложной задачей обнаружения активного компонента в присутствии большого числа неактивных или менее активных изомеров или веществ с различным числом атомов хлора.

### Обнаружение

Для обнаружения веществ этой группы на бумаге чаще всего переводят хлор, связанный с органическим соединением, в ион хлора, присутствие которого устанавливают с помощью азотнокислого серебра (Д 181; Митчелл [3], Бриджес и сотрудники). Мойнихан и О'Колла осуществляют проявление с помощью каталитического дегидрохлорирования солями металлов (Д 182). Лишь для препарата «дилан», как считает Митчелл [3], необходимо использовать цветную реакцию с сероокислым

закисным железом (Д 183). С помощью этой реакции можно обнаружить нитробутановую и нитропропановую части молекулы. Кроме того, для обнаружения инсектицидов, меченных радиоактивным атомом углерода, можно использовать радиометрические методы (Уинтерингем и сотрудники [3]).

### Системы растворителей

Хлорированные инсектициды обладают ярко выраженным гидрофобным характером. Поэтому для их хроматографирования необходимо использовать системы с неподвижной полярной органической фазой либо обращенные фазы.

Для первого типа систем наилучшие результаты были получены Митчеллом [2, 3] в том случае, когда в качестве неподвижной фазы он использовал 10–25%-ный раствор диметилформамида в эфире. Для разделения изомеров ДДТ и гексахлорциклогексана (ГХГ) наиболее пригодными подвижными фазами при температуре хроматографирования до 25° оказались *n*-гексан и петролейный эфир, при температуре выше 25° — бесцветное минеральное масло, содержащее 3% диметилформамида. Системы, в которых в качестве неподвижной фазы использовали ацетангидрид, оказались недостаточно хорошими (Мойнихан и О'Колла; Митчелл [3]), хотя их и применяли (например, О'Колла) для количественного анализа.

Для систем с обращенными фазами Митчелл [3] рекомендует брать бумагу, пропитанную 1%-ным раствором соевого масла в эфире, а в качестве подвижного растворителя использовать смесь ацетон — диоксан или ацетонитрил. Хроматографирование в 75%-ном ацетоне приводило, например, к разделению смесей ГХГ — ротан — ДДТ и ротан — ДДТ — метоксихлор, хроматографирование в 60%-ном ацетонитриле — к разделению смеси алдрин — диэлдрин — эндрин — изодрин. Используя бумагу, пропитанную 2,5%-ным раствором вазелина в эфире, и систему этанол — вода — аммиак (80 : 15 : 5), Уинтерингему и сотрудникам [3] удалось отделить  $\text{Br}^{82}$ -аналог ДДТ от его этиленового метаболита (ДДЭ). Аналогичным образом разделяли изомеры ГХГ Бриджес и сотрудники. Бумагу они пропитывали 5%-ным раствором вазелина в эфире, а в качестве подвижного растворителя использовали 70%-ный этанол.

В табл. 134 показан ход разделения некоторых соединений в указанных системах растворителей.

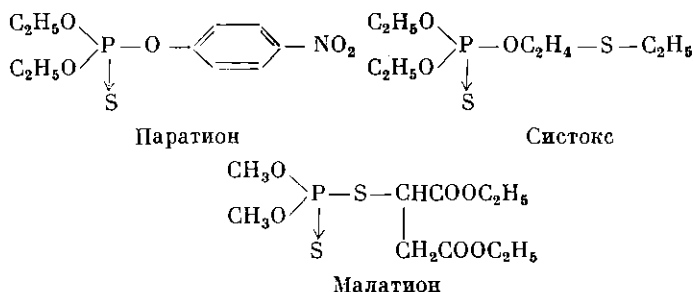
Таблица 134

ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ХЛОРИРОВАННЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ  
НА БУМАГЕ

Неподвижная фаза/подвижная фаза	Порядок возрастания $R_f$
Ацетангидрид/гексан	ГХГ-β; -ε; -δ; -γ; -α; смесь гептахлор- и гексахлорциклогексанов
Диметилформамид/ <i>n</i> -гексан	ГХГ-β; -δ; -γ; -α; <i>n,n'</i> -ДДТ; <i>o,n'</i> -ДДТ
Вазелин/этанол — вода — аммиак (80 : 15 : 5)	ГХГ-β; -α; -γ; -δ
Соевое масло/60%-ный ацетонитрил	ДДТ, ДДЭ (метаболит)
Соевое масло/75%-ный ацетон	Алдрин, изодрин, диэлдрин, эндрин
	ДДТ, ротан, метоксихлор
	ДДТ, ротан, ГХГ

## ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ ФОСФОРА

Среди современных инсектицидов весьма важное место занимают фосфорорганические соединения, высокая биологическая активность которых объясняется ингибированием активности холинэстеразы. За последние три года хроматография на бумаге стала одним из важнейших методов химического и особенно биохимического изучения фосфорорганических соединений. Здесь речь идет главным образом о производных тиофосфорной и дитиофосфорной кислот.



Изучение различных производных методом хроматографии на бумаге привело к некоторым выводам относительно связи между строением и хроматографическим поведением разделяемых веществ. При распределении веществ между полярной неподвижной фазой и неполярной подвижной фазой решающее влияние на величину  $R_f$  оказывает характер связи серы с фосфором. Наибольшие значения  $R_f$  имеют те соединения, в которых сера участвует в тионовой связи (семиполярная связь  $\text{P} \rightarrow \text{S}$ ), в то время как сера, участвующая в тиоловой связи ( $\text{P}-\text{S}-$ ), приводит к снижению величины  $R_f$ . При этом следует отметить, что S-алкильные изомеры имеют более высокие значения  $R_f$ , чем S-арильные изомеры. Обычно замена серы кислородом уменьшает величины  $R_f$ . Это наблюдается независимо от того, в каком положении находится заменяемая кислородом сера. Замена водорода галогеном приводит к увеличению  $R_f$ . Уменьшение величин  $R_f$  в большей степени зависит от числа кислородных функциональных групп, чем от их положения.

## Обнаружение

Соединения, не имеющие хромогенных групп, способны легко гидролизаться (например, октаметилпирофосфорамид). Для проявления таких соединений Марч и сотрудники [2] использовали молибдатный реактив (Д 45). Для остальных веществ, гидролиз которых происходил медленно и не до конца, этот реактив оказался непригодным. В таких случаях Оттер рекомендует перед непосредственным проявлением молибдатным реактивом опрыскивать бумагу уксусным раствором N-бромсукцинимидом, который способствует ускорению и более полному протеканию гидролиза.

Для соединений, молекулы которых содержат серу, Кук [1] предлагает использовать для проявления N-бромсукцинимид и флуоресцеин (Д 184). Ряд недостатков этого метода отметил Оттер, но все же метод нашел применение при ориентировочном проявлении известных компонентов анализируемых смесей.

Хлорированные фосфорорганические соединения типа диптерекс или диметил-2,2-дихлорвинилфосфата (ДДВФ) можно обнаруживать после проведения щелочного гидролиза с помощью азотнокислого серебра (Д 185).

Для обнаружения *n*-нитрофенильной группы Гейдж рекомендует использовать обработку анализируемого образца едким кали. С помощью такой обработки *n*-нитрофенильную группу переводят в ион нитрофенолята, обладающий интенсивным желтым цветом. Примером может служить проявление паратиона. Эти вещества можно также обнаруживать с помощью родамина В (Д 16). Для обнаружения пиримидиновой части молекулы Винь и сотрудники рекомендуют использовать видоизмененный реактив Драгендорфа (Д 144). Такой способ проявления был, например, использован для обнаружения диазинона.

Для проявления веществ типа систокс Мюльман и Тиц рекомендуют использовать йодоплатинат калия (Д 84). Батора для проявления систокса, малатиона и продуктов их изомеризации рекомендует использовать аммиачный раствор азотнокислого серебра (Д 181а). В качестве специфичного реактива для обнаружения изосистокса и его гомолога метилизосистокса Батора использовал хлористый трифенилтетразолий (Д 5). Из других реактивов укажем перманганат калия (Д 3) или его комбинацию с бензидином (Д 179).

Из нехимических методов Марч и сотрудники [2] рекомендуют использовать автордиографические и радиометрические методы. Эти методы были использованы ими при исследовании обмена веществ, содержащих меченые атомы фосфора или серы. Меткаф и Марч рекомендуют ферментативные методы обнаружения инсектицидов путем измерения ингибирования активности холинэстеразы. Кук [2] применял удобный метод визуального ферментативного обнаружения *in situ*. Менее точен биологический метод обнаружения, при котором определяют токсичность при контактом действии соответствующих веществ на некоторые виды насекомых или их личинки (Койке).

### Системы растворителей

Из систем с неподвижными полярными органическими растворителями Гейдж рекомендует систему, в которой в качестве неподвижной фазы использован пропиленгликоль (П 96), а в качестве подвижной фазы — смесь петролейного эфира с бензолом (4 : 1). С помощью такой методики был подтвержден переход паратиона в его кислородный аналог параоксон. Марч и сотрудники для разделения изомеров систокса использовали смесь петролейного эфира (т. кип. 60—80°) с толуолом (4 : 1) и бумагу, пропитанную пропиленгликолем. Наилучшие результаты при разделении компонентов октаметилпирофосфорамида были получены этими авторами при использовании системы  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -трихлортолуол — толуол — четыреххлористый углерод (1 : 1 : 1) и бумаги, пропитанной 50%-ным раствором этиленгликоля в этаноле. Батора установил, что для исследования продуктов синтеза и превращений паратиона лучше всего использовать бумагу, пропитанную 25%-ным раствором формамида в ацетоне, а в качестве подвижной фазы — петролейный эфир (т. кип. 69—100°) или смесь петролейного эфира с 2% толуола (рис. 235).

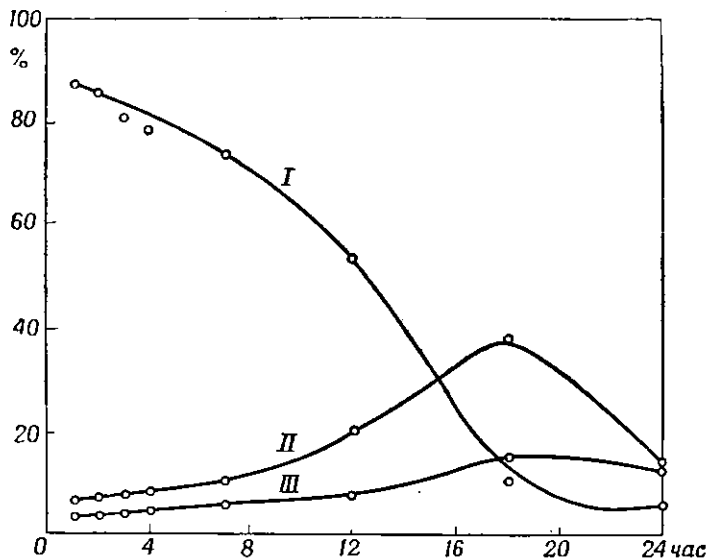
Другим типом систем являются системы с обращенными фазами. Так, Меткаф и Марч пропитывали бумагу силиконом (П 11), а хроматографирование вели смесью этанола с водой и хлороформом. Однако

разделение сульфоксидных и сульфоновых метаболитов веществ типа систокс в этой системе происходит плохо. Позднее Марч и сотрудники [1] использовали для хроматографирования на бумаге, пропитанной силиконом, систему *n*-бутанол — вода — пропионовая кислота (10 : 10 : 1). Таким образом они разделяли малатион и его продукты обмена. Кук [1], а затем и Марч и сотрудники [1] стали пропитывать бумагу 4%-ным эфирным раствором минерального масла. В этом случае для разделения малатиона и его продуктов обмена наилучшим растворителем оказалась система *n*-бутанол — вода — уксусная кислота (10 : 10 : 1). Батора для пропитки бумаги использовал 2,5—10%-ный раствор оливкового масла в толуоле. Для хроматографирования веществ, родственных паратиону, он применял смесь этанола с уксусной кислотой и водой (1 : 3 : 4) или 35—55%-ный водный раствор этанола.

Системы, в которых в качестве неподвижной фазы используют воду, применяют редко. Мюльман и Тиц для разделения веществ типа систокс использовали систему *n*-бутанол — вода (84 : 14). Другие системы используют еще реже.

### Количественный анализ

Меткаф и Марч для количественного анализа паратиона использовали спектрофотометрический метод. Элюирование пятен осуществляли



Р и с. 236. Количественное исследование термической изомеризации паратиона (Батора).

Зависимость состава продукта термической изомеризации от продолжительности нагревания. Ось абсцисс: продолжительность нагревания паратиона до 140°. I — паратион; II — S-этилпаратион; III — параоксон.

после предварительного проведения щелочного гидролиза. Полученный элюат анализировали спектрофотометрически. Лучшие результаты мы получили при полярографическом анализе элюата (рис. 236). В данном случае перед элюированием предварительного гидролиза не проводилось.

Для количественного анализа также весьма удобны радиометрические методы, которые пригодны для исследования инсектицидов, содержащих меченые атомы.

## ЛИТЕРАТУРА

- Bá t o r a V., Disertace, Bratislava, 1955.  
Bergamini C., Versorese W., Sperimentale, Sez. chim. biol., 5, 6 (1954).  
Bridges R. G., Harrison A., Winteringham F. P. W., Nature, 177, 86 (1956).  
Cook J. M., J. Assoc. off. agr. Chem., 37, 984, 987, 989 (1954). [1]  
Cook J. W., J. Assoc. off. agr. Chem., 38, 150 (1955). [2]  
Gage J. C., Biochem. J., 54, 426 (1953).  
Koike H., Oyo-Kontyu, 9, 77 (1953); ref. C. A., 48, 3618 (1954).  
Lord K. A., Ward J., Cornelius J. A., Jarvis M. W., J. Sci. Food Agric., 9, 449 (1952).  
March R. B., Fukuto T. R., Metcalf R. L., Maxon M. G., J. econ. Entomol., 49, 185 (1956). [1]  
March R. B., Metcalf R. L., Fukuto T. R., J. agric. Food Chem., 2, 732 (1954). [2]  
Metcalf R. L., March R. B., Science, 117, 527 (1953); J. econ. Entomol., 46, 288 (1953).  
Mitchell L. C., J. Assoc. off. agr. Chem., 35, 920 (1952). [1]  
Mitchell L. C., J. Assoc. off. agr. Chem., 36, 1183 (1953). [2]  
Mitchell L. C., J. Assoc. off. agr. Chem., 37, 216, 530, 996 (1954). [3]  
Moynihan P., O'Colla P., Chemistry and Industry, 1951, 407.  
Mühlmann R., Tietz H., Höfchen-Briefe, 2, 116 (1956).  
O'Colla P., J. Sci. Food Agric., 3, 130 (1952).  
Otter I. K. H., Nature, 176, 1078 (1955).  
Vigne J. P., Tabau R. L., Fondarai J., Bull. Soc. chim. France, 1955, 1282.  
Winteringham F. P. W., Science, 116, 452 (1952). [1]  
Winteringham F. P. W., Harrison A., Bridges P. M., Biochem. J., 61, 359 (1955). [2]  
Winteringham F. P. W., Harrison A., Bridges R. G., Nature, 166, 999 (1950); 168, 153 (1951); Analyst, 177, 19 (1952). [3]

# СИНТЕТИЧЕСКИЕ КРАСИТЕЛИ

---

*Я. Франц*

Для разделения красителей методом хроматографии использовали или колоночную хроматографию, или так называемый капиллярный анализ. С помощью последнего метода Гоппельсредер разделял красители на фильтровальной бумаге еще во второй половине прошлого века. Однако широкое применение хроматографии на бумаге в этой области относится лишь к последним годам.

Хроматографическое исследование красителей обычно объясняется необходимостью определения загрязнений, которые ухудшают качество выкраски, или необходимостью идентификации примесей, которые были использованы для изменения оттенка красителя.

Широкому развитию хроматографии на бумаге в этой области препятствует то обстоятельство, что многие красители являются субстантивными, т. е. они сильно адсорбируются целлюлозным волокном бумаги, что весьма часто приводит к образованию пятен вытянутой формы. С другой стороны, некоторые красители плохо хроматографируются из-за своей незначительной растворимости во всех обычных растворителях. Таким примером могут служить кубовые красители. В этом случае для хроматографического разделения красителей нужно использовать их лейкоформы, а само разделение проводить в инертной атмосфере.

## СВЯЗЬ МЕЖДУ СТРОЕНИЕМ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ ПОВЕДЕНИЕМ КРАСИТЕЛЕЙ

Вопрос о связи между строением и хроматографическим поведением красителей обсуждался неоднократно. К сожалению, большинство имеющихся в настоящее время сведений не носит общего характера. Причиной этого является то обстоятельство, что сами красители имеют иногда очень сложное строение, при котором решающую роль играют не только число и характер отдельных заместителей, но также и их пространственное расположение. Но все-таки можно привести несколько основных правил.

1. Чем больше число азогрупп, тем ниже величина  $R_f$ .

2. Красители, содержащие нафталиновое ядро с заместителем в  $\beta$ -положении, имеют меньшие значения  $R_f$ , чем аналогичные красители с заместителем в  $\alpha$ -положении.

3. Красители с сульфогруппой или оксигруппой имеют меньшие значения  $R_f$ , чем красители, не имеющие этих групп.

4. Красители, имеющие в качестве заместителей галогены, обычно обладают большими значениями  $R_f$ , чем красители без таких заместителей.

5. Если в основном строение молекулы красителей одинаковое, но заместители находятся в различных положениях, то наибольшей скоростью перемещения по бумаге будут обладать молекулы тех красителей, которые имеют наименьшее значение дипольного момента.

6. Указанные выше закономерности не имеют места, если в молекуле образуется внутренняя водородная связь. Значения  $R_f$  таких красителей обычно больше, чем красителей, молекулы которых не имеют водородных мостиков.

Некоторые авторы (Исида и сотрудники) считают, что величина молекулы красителя также должна влиять на результаты разделения. Однако этот фактор не считают решающим (Тильден).

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА

С приготовлением образцов для анализа приходится иметь дело главным образом в случае окрашенных продуктов питания. Для получения образцов преимущественно используют экстракцию. Красители, растворимые в липоидных веществах, экстрагируются пентаном или петролейным эфиром, а красители, растворимые в воде, экстрагируются хинолином или ацетатным буферным раствором с рН 3 (Мотье и Поттерат). Другие авторы используют для экстракции метилциклогексанон, бензиловый спирт, эфир или изоамиловый спирт. Экстракцию лучше проводить при повышенной температуре.

Для получения образцов чернил для авторучек и большинства штемпельных красок с разных документов обычно используют воду. Для получения образцов чернил для шариковых ручек Колдуэлл использовал смесь глицерина, ацетона, уксусной кислоты и воды (2,6 : 3 : 2,5 : 10). В этой смеси можно растворить даже нерастворимые в воде штемпельные краски. Автор получил хороший результат при растворении чернил путем накапывания этого растворителя с помощью небольшого шприца на исследуемый текст. После растворения красителя образец переносят другим шприцем на бумагу для хроматографирования.

Красители, применяемые для крашения текстильных волокон, обычно доступны в виде исходных веществ.

#### ОБНАРУЖЕНИЕ

Обнаружение красителей упрощается тем, что сами пятна являются окрашенными. В этом случае сравнивают лишь оттенок окрашивания со стандартом или изменение этого оттенка после опрыскивания хроматограммы растворами соляной и серной кислот, оснований или нитрита. Иногда удобно использовать рассматривание хроматограммы в ультрафиолетовом свете. Идентичность красителя со стандартом можно также установить по спектрам поглощения, полученным после элюирования (Колдуэлл). Изучение спектра можно также проводить непосредственно

на прозрачной бумаге, как это делал Гоппельсредер в капиллярном анализе.

Исключение представляют оксиантрахиноны, проявление которых проводят путем опрыскивания хроматограммы 0,5%-ным спиртовым раствором ацетата магния (Сибата).

### СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

#### Красители, применяемые в пищевой промышленности

Наиболее широкое применение хроматография на бумаге получила при идентификации красителей, используемых в пищевой промышленности, фармации и косметике. Так, с помощью хроматографии на бумаге можно легко установить, какие красители были использованы для окрашивания продуктов питания. Иногда случается, что используют токсичные красители, которые по внешнему виду похожи на нетоксичные.

Тильден приводит составы 24 систем растворителей, пригодных для разделения красителей, применяемых в пищевой промышленности. Было установлено, что отделение трифенилметановых красителей от красителей остальных типов лучше всего проводить в смеси метанола с муравьиной кислотой и водой (95 : 2 : 3); отделение азокрасителей — в смесях с повышенным содержанием фенола, например в системах фенол — вода (8 : 2), фенол — вода — уксусная кислота (150 : 48 : 2), фенол — вода — этилацетат (8 : 2 : 1). Систему фенол — вода — этилацетат в некоторых случаях можно с успехом заменить смесью *n*-бутанола с янтарной кислотой (100 мл *n*-бутанола, насыщенной водой, +3 г янтарной кислоты).

Исида также использовал для разделения системы, состоявшие преимущественно из фенола и воды (8 : 2); иногда он добавлял к ним этанол (фенол — этанол — вода; 40 : 25 : 40).

Монзелизе и Миранда используют для разделения красителей бумагу, пропитанную карбонатом кальция. Выделение красителей для анализа они проводили с помощью многократной адсорбции на шерсти, которую затем промывали аммиаком. После подкисления шерсти проводили хроматографирование в смеси этанола с водой (9 : 1). Талер и сотрудники [1, 2] для разделения красителей, получаемых из продуктов переработки каменноугольной смолы, рекомендуют применять водные растворы аммиака и едкого кали или едкого натра. Однако лучше использовать аммиачный раствор, поскольку раствор щелочи вызывает набухание бумаги. Добавление солей приводит к уменьшению величин  $R_f$ . Для этой цели используют карбонат натрия, хлорид натрия, сульфат аммония и т. п., т. е. такие соли, прибавление 2%-ного раствора которых уже вызывает полное высаливание. Красители в этом случае остаются на линии старта.

Дешуссе и Десбаумс в ряде работ используют насыщенный метил-изобутилкетон 2%-ный аммиак или смесь ацетона с водой и соляной кислотой (50 : 40 : 1).

#### Чернила

Хроматографию на бумаге часто используют для идентификации чернил и печатных красок.

Колдуэлл исследовал более 100 образцов печатных красок и чернил для авторучек и шариковых ручек. Для разделения красителей он использовал 8 различных систем растворителей. Наилучшие результаты были

получены для систем *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5), фенол — вода (8 : 2) и фенол — вода — уксусная кислота (150 : 48 : 2). Брэкетт и Брэдфорд рекомендуют использовать в этом случае смесь бутанола с аммиаком. При хроматографическом исследовании синих, сине-черных и черных чернил Саннье и Молостер использовали смесь пропанола с уксусной кислотой (8 : 2), а при исследовании красных, зеленых и желтых чернил — систему бензол — пиридин — этанол (8 : 5 : 20).

### Индикаторы

Ледерер проводил разделение 16 различных образцов индикаторных красителей в трех системах растворителей, состоящих из смесей изопропанола, *n*-бутанола (или *n*-амилового спирта) с водным раствором аммиака (табл. 135).

### Красители для текстильного волокна

Вполне естественно, что хроматография на бумаге нашла широкое применение для разделения красителей, используемых для крашения шерстяных, хлопчатобумажных и синтетических волокон.

Цан при разделении красителей для шерсти методом восходящей хроматографии использовал 80%-ный этанол (табл. 135), 80%-ную изомасляную кислоту, 80%-ный гликоль или смесь изобутанола с уксусной кислотой и водой. Нерастворимые в воде целлюлозные красители ему удалось разделить в 60%-ном гликоле.

Для разделения некоторых трифенилметановых красителей Потер использовал метод хроматоapak (см. стр. 210) с подвижной фазой, состоящей из смеси *n*-бутанола, этанола и воды (4 : 1 : 5). Рао и сотрудники для разделения различных смесей кислых, основных и прямых красителей использовали в качестве подвижных растворителей воду, пиридин и метилцеллозольв.

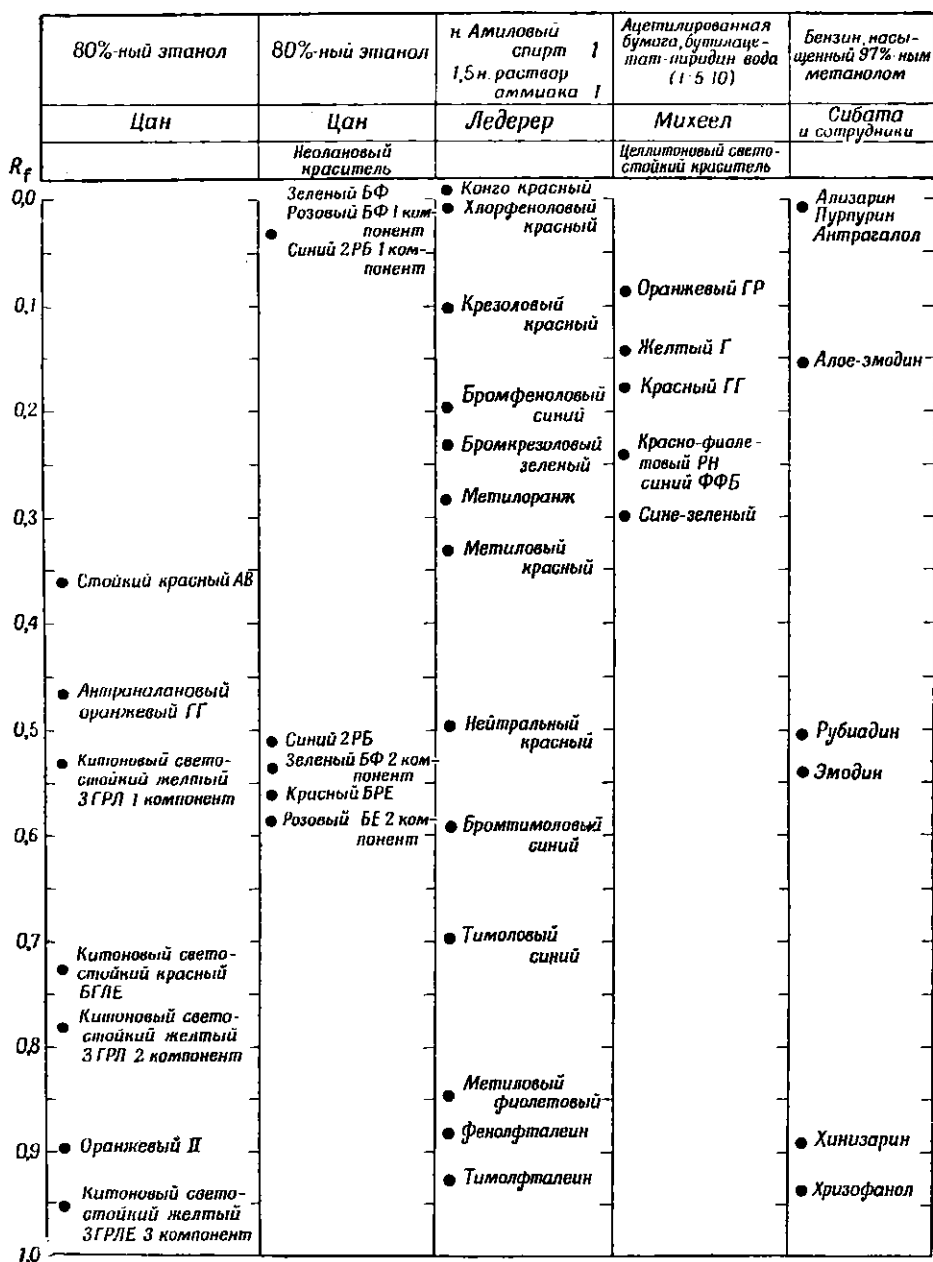
По данным Грейхена, разделение флуоресцеиновых красителей лучше всего проводить методом двумерной хроматографии, причем в первом направлении хроматографирование следует вести аммиаком, насыщенным амиловым спиртом (1 : 99), а во втором — смесью *n*-бутанола с водой, аммиаком и этанолом (100 : 44 : 1 : 20).

Разделение азокрасителей, образовавшихся при реакции азосочетания 1-нафтола с диазотированными ариламинами, было осуществлено Залокаром. Для хроматографирования последний использовал или 0,1 н. раствор едкого натра, или те же системы, что и Ледерер при разделении индикаторов. Наилучшие результаты были получены при использовании амилового спирта, насыщенного 10%-ным раствором аммиака.

Для разделения нерастворимых в воде красителей, которые используют для крашения ацетатного волокна, Михеель брал ацетилованную бумагу. В качестве подвижной фазы он использовал смесь бутилового эфира уксусной кислоты с пиридином и водой (1 : 5 : 10). Найденные величины  $R_f$  приведены в табл. 135.

Сибата и сотрудники для разделения природных и синтетических антрахиноновых красителей использовали хроматографию на бумаге. Ими было установлено, что наиболее пригодной подвижной фазой является бензин (т. кип. 45—70°), насыщенный 97%-ным метанолом (табл. 135). При разделении антроновых производных Брэдли и Уоллер брали эти вещества в лейкоформе. Хроматографирование проводили в щелочном растворе гидросульфита.

Таблица 135

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ

Митчелл разделял некоторые растворимые в воде антрахиноновые красители (как сульфированные, так и несulfированные). Образцы, растворенные в диметилформамиде, были нанесены на бумагу, пропитанную соевым маслом. Для хроматографирования была использована смесь метилцеллозольва с водой (4:1).

Труднее всего осуществить разделение кубовых красителей ввиду их нерастворимости во всех обычных растворителях. Сначала кубовые красители необходимо переводить в лейкоформу. Хроматографический процесс должен протекать в инертной атмосфере. В связи с трудностями, связанными с очисткой кубовых красителей химическими методами, весьма желательно, чтобы был разработан удобный хроматографический метод.

Впервые разделение красителей этого типа было осуществлено Рао и сотрудниками. В качестве подвижного растворителя был использован раствор гидросульфита натрия, а вместо обычной добавки едкого натра использовали этиленпентамин. Клингсберг по аналогии использовал смесь гидросульфита натрия с тетраэтиленпентамином (10 г гидросульфита натрия в 100 мл 10%-ного водного раствора тетраэтиленпентамина). Процесс хроматографирования он проводил в узких цилиндрах, заполненных азотом.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Количественным анализом красителей на хроматограмме занимались лишь небольшое число исследователей. Это связано, очевидно, с тем, что обычно бывает достаточно качественной оценки. Залокар для проведения количественного анализа азокрасителей элюировал их пятна 1 н. раствором едкого натра. Полученные при этом окрашенные растворы он подвергал колориметрическому анализу. Однако ему удавалось обнаружить не более 80% от нанесенного количества. Намного лучшие результаты были получены Клингсбергом. Клингсберг для элюирования пятен кубовых красителей использовал диметилформамид. Концентрацию красителей в полученных растворах он определял спектрофотометрическим методом. По его данным точность метода составляет около  $\pm 2\%$ .

### ЛИТЕРАТУРА

- Brackett J. W., Bradford L. W., J. crim. Law crim. Police Sci., 43, 530 (1952).  
Bradley W., Waller J., J. Chem. Soc., 1954, 563.  
Coldwell B. B., Analyst., 80, 68 (1955).  
Deshusses J., Desbaumes P., Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 43, 501 (1951); 44, 500 (1953); 47, 15 (1956).  
Goppelsröder F., Dingler's polytechn. J., 164, 242 (1864).  
Graichen C., J. Assoc. off. agric. Chem., 34, 795 (1951).  
Ishida Y., Inagaki N., Shiota A., Watanabe R., J. pharm. Soc. Japan, 73, 736 (1953).  
Klingsberg E., J. Soc. Dyers Col., 70, 563 (1954).  
Lederer M., Science, 112, 504 (1950).  
Michael F., Eröffnungs- und Vortragstagung vom 21—23. Oktober 1953 Leipzig, Deutsch. Verl. der Wissenschaften, Berlin, 1954, str. 68.  
Mitchell L. C., J. Assoc. off. agr. Chem., 36, 943 (1953).  
Monselise J. J., Miranda D., Inds. agr. et Aliment. (Paris), 71, 223 (1954).  
Mottier M., Potterat M., Mitt. Lebensm. Hyg., 43, 118 (1952).  
Poter W. L., Anal. Chem., 23, 412 (1951).  
Rao N. R., Shah K. H., Venkataraman K., Current Sci. (India), 19, 149 (1950); 20, 66 (1951).  
Sannié Ch., Moloster Z., Rev. Criminol. Police Technol., 6, 154 (1952).  
Shibata S., Takito M., J. Am. Chem. Soc., 72, 2789 (1950).  
Thaler H., Sommer G., Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch., 97, 345 (1954). [1]  
Thaler H., Scheler R., Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch., 93, 286 (1951); 95, 1 (1952). [2]  
Tilden D. H., J. Assoc. off. arg. Chem., 37, 812 (1954); 35, 423 (1952); 36, 802 (1953).  
Zahn H., Textil Praxis, 6, 127 (1951).  
Zalokar M., J. Am. Chem. Soc., 74, 4243 (1952).

# НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА

---

**Б. Какач**

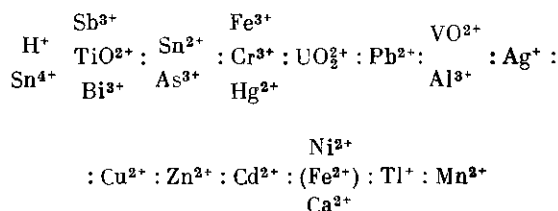
Первыми хроматограммами «осадочного типа» являются «картины», помещенные в книге Рунге «Der Bildungstrieb der Stoffe» (см. рис. 1 и 2, за стр. 24). В этом случае, правда, нельзя еще говорить о хроматографии в современном смысле этого слова.

Общепризнанным основоположником капиллярного анализа неорганических веществ является Шенбейн. Шенбейн обратил внимание на то, что если полоску бумаги погрузить в воду, в которой растворены неорганические соли, то вода вместе с этими солями будет подниматься по капиллярам бумаги, причем фронт жидкости будет перемещаться быстрее, чем содержащиеся в ней ионы. Последователь Шенбейна Гоппельсредер наряду с органическими веществами изучал образование зон при анализе смесей неорганических веществ. Е. Фишер и Шмидмер впервые использовали этот метод для количественного определения веществ. Они осуществили разделение смеси хлоридов бария и стронция на колонке, составленной из шести отдельных трубочек фильтровальной бумаги, плотно прижатых друг к другу.

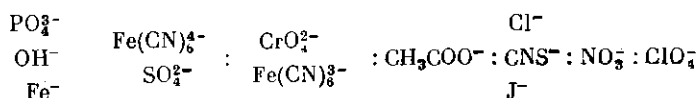
Первые работы по применению адсорбционного хроматографического анализа Цвета в неорганической химии появились в то время, когда в области органической химии его применяли уже широко. Шваб и Джокерс [2] на примере катионов, а Шваб и Даттлер [1] на примере анионов показали, что окись алюминия пригодна также и для разделения неорганических солей.

Флуд [1, 2] для разделения неорганических веществ использовал картон, пропитанный цеолитом, окисью алюминия или алюминатом натрия. На обработанной таким образом бумаге он разделил Cu, Cd и Ni. Концентрация каждого из этих веществ в растворе составляла менее 1 мкг. Последовательность катионов, за редким исключением, остается такой же, как и для колонок, заполненных химически родственными материалом. Эта последовательность (от наименьшей подвижности к наи-

большей), по данным Шваба и Джокерса [2], имеет следующий вид:



При пропитке бумаги перед проведением хроматографирования сильной кислотой (хлорной, азотной) удавалось осуществить разделение некоторых анионов (приводимая последовательность анионов также соответствует изменению их подвижности от наименьшей к наибольшей):



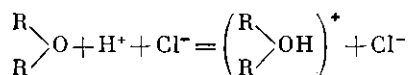
Одновременно с Флудом над проблемой использования хроматографии на бумаге для разделения неорганических веществ работали Гото и Какита. Они использовали упрощенный метод пропитки бумаги, при котором ее лишь погружали в суспензию гидроокиси алюминия, а затем высушивали. Хопф применял точно такой же способ пропитки бумаги гидроокисью алюминия с той только разницей, что перед обработкой он пропитывал бумагу различными органическими веществами. При разделении щелочных металлов Хопф вместо окиси алюминия использовал для пропитки бумаги крахмал и виолуровую кислоту.

Ока и Мурата изучали влияние различных факторов на ширину зон на бумаге, пропитанной гидроокисью алюминия. Они установили, что ширина зоны пропорциональна количеству разделяемого вещества и зависит от характера кислотного остатка. Кроме того, было найдено, что сульфаты, как правило, образуют более узкие зоны, чем нитраты и хлориды.

В 1948—1949 гг., уже после того, как Консен, Гордон и Мартин разработали метод распределительной хроматографии на бумаге, начали появляться работы, в которых описывали разделение некоторых неорганических солей на чистой (непропитанной) бумаге с использованием систем, содержащих органический растворитель. При разделении неорганических веществ с помощью хроматографии на бумаге могут иметь место те же основные процессы, что и для органических веществ, а именно распределение, адсорбция, ионный обмен и осаждение. В большинстве случаев хроматографическое разделение неорганических веществ на чистой бумаге основывается на принципе распределения, понимаемом в самом широком смысле слова. Сюда относится как распределение твердого вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами, так и его распределение между подвижной жидкой фазой и гелем, использующимся в качестве неподвижной фазы. Для случая распределения вещества между двумя несмешивающимися жидкостями можно было бы считать целлюлозу инертным носителем; вода же, которую удерживает целлюлоза, представляет собой жидкую фазу. Хейнс и Ишervуд считают, что впитанные бумагой молекулы воды соединены в цепочку. Эта цепочка образуется

за счет связывания одной части молекул воды друг с другом, а другой части — с гидрофильными группами молекул целлюлозы. В результате образуется какой-то водно-целлюлозный комплекс. Ввиду своего гидрофильного характера молекулы твердого вещества конкурируют с молекулами воды при образовании этого комплекса. Кроме того, они могут быть связаны с молекулами воды, уже вошедшими в комплекс. Относительная способность вхождения ионов в водно-целлюлозный комплекс или в органический растворитель выражается коэффициентом распределения между обеими фазами. Использование полярного органического растворителя будет оказывать сильное влияние на коэффициент распределения, так как этот растворитель может заместить воду в водно-целлюложном комплексе.

Если мы считаем, что имеем дело с распределительной хроматографией, то необходимо обязательно допустить существование растворимости неорганических солей (во многих случаях значительной) в органических растворителях, однако в то же время их считают намного лучше растворимыми в воде. В том же случае, когда в воде вещество растворимо намного лучше, при его распределении между водной и органической фазами равновесие будет сдвинуто в сторону водной фазы так сильно, что разделение в этом случае практически осуществить нельзя. При определенных условиях это равновесие может быть сдвинуто для неорганических веществ в сторону органического растворителя. Такая возможность была показана в ряде работ, в которых определение неорганических веществ производили методом экстракции (например, работы Ирвинга или Кузнецова). Хотя выводы этих работ и нельзя переносить без изменения на распределительную хроматографию на бумаге, все же некоторые явления можно считать в обоих случаях одинаковыми. Так, например, образование оксониевых солей в кислой среде происходит аналогично образованию солей аммония из аминов:



причем известно, что оксониевые соли менее стабильны, чем соли аммония, и их образованию и стабильности благоприятствует среда концентрированной кислоты. Действительно, большинство использовавшихся на практике систем растворителей содержало довольно концентрированные кислоты. Однако нельзя утверждать, что единственной причиной образования оксониевой соли является кислота, содержащаяся в системе растворителя. Для проведения экстракции необходима определенная оптимальная кислотность, которая способствует не только образованию оксониевой соли, но и возникновению хорошо экстрагирующегося аниона соответствующего элемента. Экстрагирующая способность растворителя по отношению к одним и тем же элементам будет изменяться при изменении его кислотности.

Некоторые факты, наблюдающиеся при экстракции неорганических веществ, используются при хроматографии на бумаге. Так, например, такие комплексные металлгалогенные кислоты, как  $\text{HFeCl}_4$  и  $\text{HAuCl}_4$ , которые хорошо экстрагируются эфиром, при распределительной хроматографии на бумаге имеют величины  $R_f$ , близкие к 1,0, если в качестве органической фазы взять эфир или кетон и если использовать достаточно концентрированную кислоту. Другой пример: алюминий, который не экстрагируется из растворов, подкисленных соляной кислотой, при хро-

матографировании с использованием обычно применяемых систем растворителей в большинстве случаев имеет сравнительно низкое значение  $R_f$ . Условия, которые, как показал Ирвинг, необходимы для образования оксониевых солей, имеют значение и для процессов хроматографического разделения. Эти условия перечислены ниже.

1. Растворитель должен содержать кислород, связанный с углеродом. Углеводороды, не содержащие заместителей, а также хлорированные и нитрованные углеводороды не пригодны.

2. Хорошо экстрагирующие растворители имеют группу CO (например, кетоны, альдегиды, эфиры), и, кроме того, в них нет длинных углеводородных цепей и ароматических колец.

3. Для каждого растворителя и каждого элемента оптимальная кислотность имеет сравнительно высокое значение (5—15%).

Другим способом сдвига распределительного равновесия неорганических веществ в сторону органической фазы является образование нормальных и комплексных солей с органическими веществами. Аналитическое разделение неорганических веществ путем перевода их в органический растворитель с помощью комплексообразователей стали использовать после сообщения Фишера о комплексах металлов с дитизоном и их способности переходить в органический растворитель. С этого времени явление растворимости комплексных соединений металлов в органических растворителях стали постоянно использовать как для разделения отдельных элементов, так и для концентрирования элементов, находящихся в очень незначительных количествах. Кроме дитизона, для образования растворимых в органических растворителях комплексов с металлами главным образом применяли диэтилдитиокарбамат натрия, диметилглиоксим, нитрозоафтол, купферон, хинализарин, ацетилацетон, бензоилацетон и 8-оксихинолин. Три последних вещества нашли в хроматографии на бумаге особенно широкое применение. Распределение образующихся комплексов между органической и водной фазами является результатом их способности растворяться в обеих этих фазах. Образование внутренних комплексов препятствует гидратации ионов металлов, что, естественно, приводит к снижению их растворимости в воде. В некоторых случаях образование комплексов приводит к тому, что эти ионы становятся практически нерастворимыми в воде (осаждающие органические реактивы).

Наряду с указанными комплексообразователями можно с успехом использовать растворители, которые сами по себе способны образовывать комплексы с неорганическими ионами. Такая способность образовывать комплексы с ионами металлов была доказана Поллардом и сотрудниками [6] на примере пиридина и коллидина, которые были использованы ими для разделения неорганических веществ методом хроматографии на бумаге. Комплексообразователи находят разнообразное применение при разделении неорганических веществ методом хроматографии на бумаге. В некоторых случаях бумагу пропитывают этими комплексообразователями, в других случаях их прибавляют к системе растворителей. Иногда комплекс наносят на бумагу уже в приготовленном виде.

О том, какой принцип лежит в основе разделения неорганических веществ методом хроматографии на бумаге, до сих пор нет единого мнения. Наряду с распределительным принципом (обычно речь идет о разделении вещества между органической и водной фазами) принимают также во внимание возможность разделения за счет явлений поверхностной адсорбции и обмена ионов. Зоммер, например, пытался доказать, что о распределительной хроматографии нельзя говорить в том случае, когда

использующийся органический растворитель смешивается с водой (например, метанол). Однако такой довод нельзя считать достаточно серьезным, поскольку в этом случае можно говорить о распределении между метанолом, содержащимся в целлюлозном комплексе (неподвижная фаза), и метанолом протекающей подвижной фазы. Кроме того, Зоммер считает, что при наличии одного лишь распределения тип используемой бумаги не должен оказывать влияния на величину  $R_f$ , что не соответствует действительности. Однако следует заметить, что распределительный механизм разделения неорганических веществ (так же, как и органических веществ, см. стр. 73) вовсе не подразумевает абсолютной инертности носителя.

С целью объяснения процессов, протекающих при хроматографическом разделении неорганических веществ на бумаге, Елисеева проверила применимость основного уравнения распределительной хроматографии

$$R_f = \frac{1}{1 + \alpha \frac{q_H}{q_P}},$$

где  $R_f$  — относительная скорость передвижения вещества,  $q_H$  и  $q_P$  — объемы неподвижной и подвижной фаз в используемом растворителе,  $\alpha$  — коэффициент распределения хроматографируемого вещества между обеими фазами. Для нескольких неорганических соединений на основании экспериментально найденных значений  $R_f$  и отношений  $q_H/q_P$  были вычислены коэффициенты распределения  $\alpha$ . Затем вычисленные значения были сравнены с опытными. Результаты такого сравнения являются весьма обнадеживающими. Эти результаты приведены в табл. 136 (данные Елисеевой). Елисеева считает, что полученные ею результаты являются

Таблица 136

ЗНАЧЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТОВ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ВЕЛИЧИН  $R_f$   
НЕКОТОРЫХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Соединение	Подвижная фаза	Коэффициент распределения		Величина $R_f$	
		найден хроматографически	найден экспериментально	экспериментальная	теоретическая
HSCN	Этилацетат <sup>а)</sup> . . . . .	0,11	0,096	0,965	0,97
HgBr <sub>2</sub>	Бензол <sup>а)</sup> . . . . .	0,76	0,88	0,80	0,78
HgCl <sub>2</sub>	н-Бутанол, насыщенный HCl	1,18	0,897	0,72	0,77
CuCl <sub>2</sub>	н-Бутанол, насыщенный HCl	42,50	37,50	0,067	0,075
LiCl	Изоамиловый спирт <sup>а)</sup> . . . . .	252,00	260,00	0,012	0,011

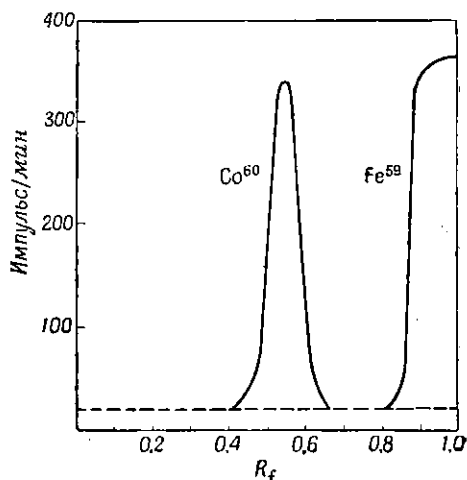
<sup>а)</sup> Органический растворитель насыщен водой.

достаточным доказательством того, что основным принципом хроматографического разделения неорганических веществ на бумаге является их распределение между неподвижной и подвижной фазами, т. е. какой-то непрерывный процесс экстракции из водной фазы органическими растворителями.

Опыты с радиоактивными изотопами кобальта, железа и кальция показали, что при их хроматографическом разделении не происходит потерь вещества в результате адсорбции, несмотря на то, что приходилось

работать с весьма разбавленными растворами. В этих же опытах было обнаружено, что каждому катиону принадлежит на хроматограмме строго определенное место (рис. 237).

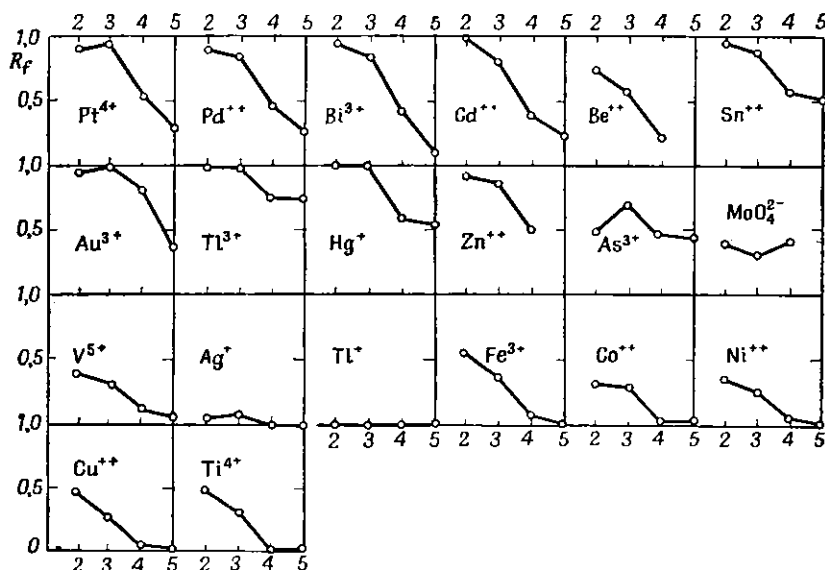
Чокли и Уильямс, исследовавшие механизм хроматографического разделения неорганических веществ на колонках, заполненных целлюлозой, пришли к выводу, что они имели дело с распределительной хроматографией. При исследовании условий отделения  $\text{Fe}^{3+}$  ими были использованы в качестве неподвижной фазы разбавленная соляная кислота, а в качестве подвижной фазы смесь эфира с этанолом. Они считали, что если на целлюлозе происходит адсорбция, то ионы  $\text{Fe}^{3+}$  должны адсорбиро-



Р и с. 237. Хроматографическое разделение радиоактивного кобальта и железа (Елисеева).

Система: ацетон с 5 % воды и 8 %  $\text{HCl}$ . Вид зон свидетельствует об отсутствии адсорбции.

ваться на ней и в случае протекания водной фазы, но они не должны перемещаться с фронтом растворителя. В специальном опыте с использованием ряда водных растворителей было установлено, что, если



Р и с. 238. Влияние числа атомов углерода в молекуле спирта хроматографической системы на величину  $R_f$  некоторых катионов (Ледерер).

По оси ординат отложены величины  $R_f$ .

кислотность растворителя достаточно высока, чтобы препятствовать образованию  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , катион железа будет проходить через слой целлюлозы

весьма близко от фронта растворителя. Это свидетельствует о том, что если адсорбция и имеет место, то ее влияние весьма незначительно. По данным вышеуказанных авторов, а также по данным Елисейевой величина  $R_f$  зависит от экстрагирующей способности растворителей. Экстрагирующая способность растворителей, являющихся членами одного гомологического ряда, уменьшается в направлении от низших гомологов к высшим (рис. 238).

## Катионы

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Приготовление образцов производится обычным способом, использующимся в качественном и количественном анализе неорганических веществ. Поскольку речь обычно идет об определении следов катионов, загрязняющих чистые соли металлов, то достаточно растворить соответствующее количество этих солей в разбавленной кислоте, которую предварительно очистили от следов металлов с помощью катионообменников. При проведении анализа образцов сплавов, сталей, руд и т. п. эти образцы растворяют в соответствующих кислотах или их смесях. Анализ веществ, содержащихся в органическом или биологическом материале, проводят после минерализации анализируемых образцов. Минерализацию осуществляют или путем сжигания образцов в тигле, или путем их обработки смесью серной и азотной кислот.

Присутствие некоторых анионов оказывает неблагоприятное влияние на разделение катионов. В таких случаях эти анионы перед проведением хроматографического анализа необходимо удалить. При анализе тартратов, оксалатов, формиатов, ацетатов и цитратов образец достаточно смешать с половинным по весу количеством безводного карбоната натрия, а затем эту смесь прокалить в тигле до температуры красного каления. Анионы указанных веществ при прокаливании образцов будут разлагаться. В случае присутствия солей аммония последние также будут разлагаться с выделением аммиака. Если в образцах содержатся фосфаты, бораты и подобные им соединения, анионы которых устойчивы и нелетучи, то для удаления анионов этих соединений необходимо использовать катионообменники. Поллард и Мак-Оми [2] рекомендуют использовать для этой цели зеокarb 215, предварительно промытый 1 н. раствором соляной кислоты. Элюирование катионов проводили 5 н. раствором соляной кислоты. После того как катионы сконцентрированы в малом объеме, их можно наносить на бумагу. Этот способ нельзя использовать для разделения ионов  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$  и  $\text{Pb}^{2+}$ . Сульфаты и фосфаты могут избирательно адсорбироваться на окиси алюминия. В качестве универсального метода замещения всех анионов ацетатным ионом Зейлер и сотрудники [2] рекомендуют использовать пропускание анализируемого раствора через колонку, заполненную анионитом в ацетатной форме.

Интересный способ удаления мешающих анионов был предложен Гордоном и Хевелом. Они осаждали анионы в виде свинцовых солей непосредственно на бумаге. Авторы наносили на край полосы бумаги две капли раствора уксуснокислого свинца, а затем на это же место наносили каплю анализируемого раствора. В месте соприкосновения обоих растворов образуется белый осадок. Затем полоску бумаги

погружают в воду и дают воде возможность подняться на высоту 6—7 см. После этого избыток воды удаляют с помощью фильтровальной бумаги. Место, которого достигла вода, отмечают карандашом в качестве линии старта. Некоторым неудобством этого метода является то, что на хроматограмме после хроматографирования и проявления всегда имеется сравнительно большое пятно свинца. Таким образом, этот способ можно использовать лишь в тех случаях, когда присутствие свинца не мешает осуществлению процесса разделения.

## ТЕХНИКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

При разделении неорганических веществ методом хроматографии на бумаге в большинстве случаев используют бумагу ватман 1 и 4. Для неорганических веществ разделение будет особенно сильно зависеть от содержания катионов в бумаге. Мнения различных исследователей по этому вопросу различны. Некоторые предполагают, что предварительная очистка бумаги не является обязательной, особенно при качественном анализе. Другие исследователи рекомендуют проводить очистку в каждом случае. Для количественного анализа бумагу большей частью промывают тем же растворителем, который используют при хроматографировании в качестве подвижной фазы. Поллард и сотрудники [8] при количественном определении Ca, Sr, Ba и Mg помещали бумагу перед проведением разделения на несколько дней в разбавленную соляную кислоту. Лакур и сотрудники [10] при определении Al, Ti и Fe бумагу не подвергали предварительной очистке, но при проведении колориметрического анализа этих элементов в качестве стандартного раствора использовали элюат, полученный из бумаги, на которую не наносили образцов анализируемого раствора. В последнее время бумагу, предназначенную для хроматографического разделения неорганических веществ, перед выпуском в продажу предварительно промывают кислотой (см. стр. 107).

Раствор анализируемого вещества наносят на бумагу обычным способом с помощью микропипетки. Большинство исследователей придает особое значение тщательному высушиванию перед разделением нанесенного на бумагу образца. Высушивание не рекомендуют проводить при слишком высокой температуре. Оптимальная температура высушивания составляет около 40°. Для получения таких температур обычно используют лампы инфракрасного излучения или фен.

При хроматографическом разделении неорганических веществ на бумаге так же, как и в других случаях применения хроматографии на бумаге, удастся использовать все методы проведения процесса. В последние годы все большее распространение получает метод восходящей хроматографии, при котором используют самые разнообразные виды аппаратов. Для проведения быстрых ориентировочных качественных измерений чрезвычайно удобен метод круговой хроматографии. Этот метод отличается большой простотой. Метод восходящей хроматографии на бумаге, имеющей прорези, позволяет осуществлять быстрый анализ большого количества образцов одновременно.

## ОБНАРУЖЕНИЕ

Обнаружение неорганических веществ проводят различными способами. В большинстве случаев используют неорганические и органические

реактивы, которые хорошо известны из обычного качественного анализа и чувствительность которых достаточна для обнаружения малых количеств отдельных катионов, нанесенных на бумагу. Использование цветной реакции удобно в тех случаях, когда отдельные зоны или пятна достаточно хорошо разделены. Если этого не наблюдается, следует проводить последовательное опрыскивание несколькими реактивами или же маскировать мешающие проведению анализа катионы и т. п.

При проявлении бумагу обычно опрыскивают соответствующими реактивами или подвергают действию их паров (сероводород). Используемые для проявления реактивы можно в основном разделить на три группы: вещества, реагирующие с большим числом катионов; избирательно действующие вещества, реагирующие с определенными группами катионов, и, наконец, специфически действующие вещества, дающие характерные реакции с одним или небольшим числом катионов. Использование таких специфических реактивов во многих случаях проблематично. Их используют главным образом тогда, когда хотят узнать, содержится ли вообще тот или другой элемент в анализируемом образце. При хроматографическом анализе неизвестных смесей более удобно использовать универсальные реактивы или их комбинации, которые бы позволили быстро получить представление о количестве катионов, содержащихся в смеси. Применение таких реактивов и знание величин  $R_f$  дает возможность быстро идентифицировать разделенные вещества.

Реакции между некоторыми реактивами и катионами приводят не только к образованию окрашенных пятен, но и к флуоресценции пятен под действием ультрафиолетового света. В других случаях, наоборот, под действием ультрафиолетового света происходит гашение флуоресценции. Некоторые реактивы дают пятна, окрашенные только в видимом свете. В первом случае чувствительность реактивов, как правило, выше, чем во втором случае. Это можно видеть на примере сравнения чувствительности проявления сероводородом и смесью койевой кислоты с 8-оксихинолином. Данные, на основании которых проводится это сравнение, получены Поллардом и сотрудниками [8] (табл. 137).

Таблица 137

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПРОЯВЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ КАТИОНОВ С ПОМОЩЬЮ  
СЕРОВОДОРОДА И СМЕСИ КОЙЕВОЙ КИСЛОТЫ С 8-ОКСИХИНОЛИНОМ  
(Поллард и сотрудники [6])

Реактив	Количество катионов, $\mu\text{г}$											
	Pb	Cu	Cd	Al	Fe	Zn	Co	Mn	Ca	Mg	K	Na
$\text{H}_2\text{S}$	0,5	0,5	2,5	—	0,03	—	0,03	—	—	—	—	—
Флуоресценция	0,05	0,03	0,05	0,03	0,03	0,10	0,03	0,03	2,50	0,03	5,0	5,0

Неудобство применения реактивов, вызывающих флуоресценцию, состоит в том, что в большинстве случаев довольно трудно охарактеризовать оттенок флуоресценции. В тех случаях, когда цвет недостаточно хорошо выражен, например при взаимодействии цинка, кальция или алюминия с 8-оксихинолином, применение этих реактивов нецелесообразно.

## Общие реактивы

Наиболее часто используемым реактивом является 8-оксихинолин, который обычно применяют в виде 0,5%-ного раствора в 60%-ном этаноле. Ривс и Крумплер сравнили цветные реакции некоторых катионов в видимом и ультрафиолетовом свете при использовании 8-оксихинолина, дифенилтиокарбазона и резорцина (табл. 138).

Вейс и Фаллаб для проявления ряда катионов использовали 0,2%-ный раствор кверцетина в этаноле (табл. 138).

Таблица 138

РЕАКЦИИ НЕКОТОРЫХ КАТИОНОВ С РАЗЛИЧНЫМИ РЕАКТИВАМИ

Катион	0,5%- ный ди- фенил- тиокар- базон <sup>а)</sup>	1%-ный резор- цин <sup>а)</sup>	Кверцетин <sup>б)</sup>				0,5%-ный 8-оксихино- лин <sup>в)</sup>		
			нейтральная среда		с аммиаком		нейтраль- ная среда	с аммиаком	
			види- мый свет	УФ	видимый свет	УФ		види- мый свет	УФ
Ag			с.	с.	с. к.	тм. ф.	б.	ж. з.	тм.
Al	кр.	—	ж. з.	з.	ж.	о.	ж. з.	ж. з.	ж. з. <sup>г)</sup>
Ba			—	ж. з.	—	—	б.	б.	син. з.
Bi	о.	—	—	ж. з.	ж. к.	с. ф.	б.	ж. з.	тм.
Ca			—	ж. з.	св. к.	тм. к.	б.	б.	з.
Cd	ж. к.	—	—	—	ж.	ж.	ж. з.	ж. з.	ж.
Co	ф.	к.	—	с. к.	с. к.	тм. ф.	ж. к.	ж. к.	тм.
Cr <sup>3+</sup>			з. з.	с.	с.	с.	ж. з.	ж. з.	тм.
Cu	з.	кр.	—	—	с.	ф.	ж. з.	ж. з.	тм.
Hg <sup>2+</sup>	кр.	з.	—	—	с.	ф.	ж. з.	ж. о.	тм.
Hg <sup>+</sup>			—	ж.	—	—	ж. з.	кр.	тм.
K			—	ж.	—	—	—	—	—
Fe <sup>3+</sup>	з.	—	с. з.	тм. ф.	к.	тм. ф.	кр.	кр.	тм.
Mg			—	ж. з.	ж.	—	б.	ж. з.	син. з.
Mn			—	с. ж.	тм. к.	тм. ф.	ж. з.	св. к.	тм.
Na			—	св. ж.	—	—	—	—	—
Ni	кр.	син.	—	—	ж.	тм. ф.	ж. з.	ж. з.	тм.
Pb			—	—	о.	тм. ф.	ж. з.	ж. з.	тм.
Pd <sup>2+</sup>			—	—	—	—	ж. к.	ж. з.	тм.
Pt <sup>4+</sup>			—	—	—	—	ж. з.	—	тм.
Sb <sup>3+</sup>			св. ж.	з.	ж. к.	тм. ф.	б.	ж. з.	тм.
Sn <sup>2+</sup>			ж. з.	з.	ж. о.	о.	ж. з.	ж. з.	ж. <sup>г)</sup>
Sn <sup>4+</sup>			св. ж.	св. з.	ж.	ф.	ж. з.	ж. з.	ж. <sup>г)</sup>
Sr			—	св. ж.	ж.	—	б.	б.	син. з.
UO <sub>2</sub>			—	—	св. к.	тм. ф.	ж. к.	ж. к.	тм.
Tl			—	—	—	—	б.	ж. з.	тм.
Zn	кр.	—	—	с. з.	ж.	з.	ж. з.	ж. з.	ж. <sup>г)</sup>

а) По данным Ривса и Крумплера.

б) По данным Вейса и Фаллаба.

в) По данным Полларда и сотрудников [2].

г) Флуоресценция не изменяется после опрыскивания уксусной кислотой.

Поллард и Мак-Оми [2] приводят ряд реакций 8-оксихинолина с катионами на дневном свете в нейтральной среде и после обработки хрома-

тограммы парами аммиака, а также флуоресценцию в ультрафиолетовом свете после обработки хроматограммы парами аммиака (табл. 138).

Койевая кислота была использована Поллардом и сотрудниками [6] в виде 0,1%-ного раствора в этаноле, а также в комбинации с 8-оксихинолином. Флуоресценцию дают Ag, Hg, Ca, Sr, Ba. Большинство других катионов вызывает гашение флуоресценции.

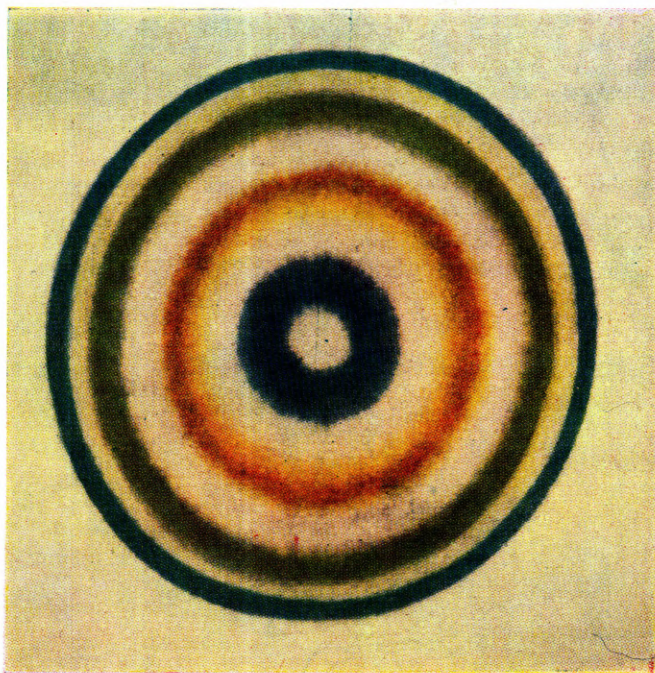
Из обычных используемых для проявления реактивов, дающих цветную реакцию на дневном свете, чаще всего используют насыщенный раствор ализарина в этаноле. Ализарин реагирует с большим числом катионов, окрашивая хроматограмму в различные цвета, начиная от фиолетового и кончая красным. Окрашивание бумаги, возникшее в результате воздействия паров аммиака на хроматограмму, которая была предварительно опрыскана соответствующим реактивом, исчезает при нагревании или после дополнительного опрыскивания хроматограммы ледяной уксусной кислотой. Удобство указанного выше реактива состоит в том, что в этом случае с помощью соответствующей маскировки из реакции можно исключить некоторые группы катионов. Благодаря этому достигается частичная избирательность действия реактива. Окрашивание дают Ag, Hg, Pb, Cu, Cd, Bi, Fe, Cr, Zn, Mn, Co, Ni, Ca, Ga, In, Be, Zr, Ti, редкие земли, Ce, Sc, Th, Pd, Pt и U. С помощью 30%-ной перекиси водорода удается маскировать Pb, U, Zn, Mn, Co, Ni. Насыщенный водный раствор фтористого натрия маскирует Zr, Ti, Be, Sc, Fe, редкие земли, Ce, Y, Ca, Al. 10%-ный водный раствор цианида калия маскирует Ag, Hg, Zn, Co и Ni.

Хорошим общим реактивом является также 0,5%-ный раствор рубеноводородной кислоты в 96%-ном этаноле, хотя этот реактив взаимодействует с меньшим числом катионов. Реактив используют в основном для обнаружения группы тяжелых металлов, например Cu, Ni, Co, Bi, Mn, Fe, Pb, Hg и т. п. (см. рис. 240). Воздействие паров аммиака на хроматограмму, опрысканную этим реактивом, приводит к образованию хорошо различных окрашенных зон.

### Избирательные реактивы

К этой группе можно отнести те реактивы, для которых характерно взаимодействие с определенными группами катионов. Берсталл и сотрудники [1] предложили применять для обнаружения аналитической группы IIa 0,05%-ный раствор дитизона в хлороформе или тетрахлорметане. Этот реактив пригоден также для обнаружения групп I и IIIa. Значительной избирательности в отношении групп I и IIa удается достигнуть при обработке дитизоном хроматограммы, которую предварительно опрыскали 2 н. раствором цианида калия. Высокая избирательность связана в этом случае с тем, что раствор цианида калия маскирует все катионы, за исключением Pb,  $Hg^+$  и  $Hg^{2+}$ . Для определения катионов группы IIIa Берсталл разрезал хроматограмму вертикально на две части. Одну половину хроматограммы он опрыскивал спиртовым раствором ализарина и затем обрабатывал ее парами аммиака. После кратковременного нагревания хроматограммы появлялась красная полоса, соответствующая алюминию, и пурпурная полоса, соответствующая железу. На другой половине хроматограммы определяли хром с помощью бензидинового реактива (Д 186).

Для обнаружения катионов группы IIIb Берсталл [1] предлагает использовать растворы ализарина, рубеноводородной кислоты и сали-



Р и с. 240. Круговая хроматография катионов (Какач).

Система: ацетон — 20%-ная соляная кислота (88 : 12). Проявление осуществляли смесью рубеоно-водородной кислоты с аммиаком. После сушки хроматограмму опрыскивали раствором ферроцианида калия. Катионы расположены от середины круга в следующем порядке: Ni — Co — Cu — Fe

цидальдоксима в этаноле. При проявлении находящихся в смеси катионов групп IIIa и IIIb Какач опрыскивал хроматограмму сначала 0,1%-ным раствором рубеоноводородной кислоты в этаноле, а затем 0,1%-ным раствором метилтимолового синего в этаноле. Последний реактив был использован Кёрблом и Пршбилем в качестве индикатора при комплексометрическом титровании. Опрыскивание метилтимоловым синим не изменяет первоначального окрашивания, которое появляется в результате обработки хроматограммы рубеоноводородной кислотой, но оно приводит к появлению синей полосы марганца, сине-фиолетовой полосы железа и синей полосы цинка. Эти полосы являются яркими. Окрашивание становится особенно интенсивным после опрыскивания хроматограммы насыщенным раствором уротропина в смеси вода — ацетон (1 : 1).

Для проявления катионов IV группы чаще всего применяют ализарин (для кальция) и 0,1%-ный водный раствор родизоната натрия (для бария и стронция). Для обнаружения щелочных металлов лучше всего использовать 0,1%-ный водный раствор виолуровой кислоты (Эрленмейер и сотрудники [11]). При нагревании хроматограммы, опрысканной этим раствором, до 60° появляются фиолетовые полосы натрия и калия и красно-фиолетовая полоса лития. Кроме щелочных металлов, с этим реактивом взаимодействуют щелочноземельные металлы и некоторые тяжелые металлы.

Весьма чувствительным реактивом, использующимся для проявления благородных металлов (Pt, Au, Pd и Rh), является смесь хлорида олова (II) с йодидом калия (*D 187*) или 0,03%-ный раствор *n*-диметиламинобензилиденроданина в этаноле.

Поллард и сотрудники [7] предложили комбинацию реактивов, позволяющую осуществлять систематический анализ. По сравнению с классическим аналитическим методом их метод имеет то преимущество, что он освобождает от необходимости проведения длительных операций осаждения и фильтрования при отделении катионов отдельных групп. Кроме того, для проведения анализа в этом случае требуется весьма незначительное количество вещества. Схема метода, предложенного Поллардом и сотрудниками, приведена на примере 24 исследованных ими катионов (см. табл. 152).

### Специфические реактивы

Трудно указать определенно, какие реактивы должны входить в эту группу. К ней можно отнести лишь некоторые реактивы, являющиеся специфичными только после маскирования катионов, мешающих обнаружению открываемых катионов. В качестве примера такого реактива можно привести 5%-ный водный раствор хромотроповой кислоты, с которой реагирует ряд катионов. Однако последующая обработка хроматограммы 1 н. раствором серной кислоты приводит к исчезновению окрашивания для всех катионов, за исключением титана. Для никеля специфическим реактивом является 1%-ный раствор диметилглиоксима в этаноле. Обнаружению никеля в этом случае может помешать только  $\text{Fe}^{2+}$ . 2%-ный водный раствор тиомочевины является специфическим реактивом для рутения (синее окрашивание) и осмия (красное окрашивание).

Кроме уже упоминавшихся, в литературе описан еще целый ряд реактивов, использующихся в аналогичных случаях. Наиболее употребительные из них приведены в табл. 139.

Таблица 139

НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ПРИМЕНЯЕМЫЕ СПОСОБЫ ПРОЯВЛЕНИЯ  
НЕКОТОРЫХ КАТИОНОВ

Катион	Реактив (чувствительность)	Окрашивание	Примечания
Ag	1) 0,03%-ный раствор <i>n</i> -диметиламинобензиденроданина в этаноле (0,12 $\mu$ г)	кр.	После опрыскивания 5%-ным раствором KCN окрашивание исчезает для всех катионов, кроме Ag <sup>+</sup>
	2) 1%-ный раствор K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> в воде 3) 0,05%-ный раствор дитизона в CCl <sub>4</sub> (0,1 $\mu$ г)	кр. ф. кр.	После опрыскивания раствором KCN цвет становится желтым
Hg <sup>+</sup>	1) 0,03%-ный раствор <i>n</i> -диметиламинобензиденроданина в этаноле	кр.	Обесцвечивается 5%-ным раствором KCN В нейтральной или слабощелочной среде Также после предварительного опрыскивания KCN
	2) Насыщенный раствор дифенилкарбазона в этаноле	син. ф.	
	3) 0,05%-ный раствор дитизона в CCl <sub>4</sub>	роз.	
	4) Желтый сульфид аммония, разбавленный водой в соотношении 1:1	ч.	
Pb <sup>2+</sup>	1) 0,05%-ный раствор бензидина в 10%-ной CH <sub>3</sub> COOH + NH <sub>3</sub> (2,0 $\mu$ г)	син.	Также после предварительного опрыскивания KCN
	2) 0,05%-ный раствор дитизона в CCl <sub>4</sub> (0,1 $\mu$ г)	кр. ф.	
	3) 1%-ный раствор K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> в воде	ж.	
Hg <sup>2+</sup>	1) 0,05%-ный раствор дитизона в CCl <sub>4</sub>	роз.	Также после предварительного опрыскивания KCN
	2) Насыщенный раствор дифенилкарбазона в этаноле	син. ф.	
	3) Желтый сульфид аммония, разбавленный водой в соотношении 1:1	ч.	
Cu	1) 0,1%-ный раствор рубеноводородной кислоты в 60%-ном этаноле	з.	В атмосфере NH <sub>3</sub>
	2) 5%-ный раствор K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> в воде	к.	В нейтральной или слабокислой среде
	3) Насыщенный раствор дифенилкарбазона в этаноле (0,1 $\mu$ г)	ф. кр.	
Cd	1) 1%-ный раствор дифенилкарбазида в этаноле (4 $\mu$ г)	ф. кр.	После обработки парами NH <sub>3</sub>
	2) 0,05%-ный раствор дитизона в CCl <sub>4</sub>	ф. кр.	После обработки KCN появляется желто-коричневое окрашивание
	3) 0,5%-ный раствор 8-оксихинолина в 60%-ном этаноле + пары NH <sub>3</sub>	ж.	Флуоресценция в ультрафиолетовом свете

Продолжение табл. 139

Катион	Реактив (чувствительность)	Окрашивание	Примечания
Bi	1) КJ-цинхонин (Д 188) (0,5 $\mu$ г) 2) 2%-ный раствор тиацетамида в 1 н. HCl 3) 0,05%-ный раствор дитизона в CCl <sub>4</sub>	о. ж. кр. ф.	После обработки KCN появляется желто-коричневое окрашивание
As	1) 2%-ный раствор гидросульфита натрия в воде 2) 5%-ный раствор SnCl <sub>2</sub> в 5 н. HCl	тм. к. ч.	Только As <sup>3+</sup> После нагревания до 35° только As <sup>3+</sup>
Sb	1) Желтый сульфид аммония, разбавленный водой в соотношении 1:1 2) 2%-ный раствор гидросульфита в воде 3) 0,01%-ный раствор роданида В в воде	ж. о. тм. к. кр. ф.	Только для Sb <sup>5+</sup> ; Sb <sup>3+</sup> нужно окислять NaNO <sub>2</sub>
Sn	1) 0,05%-ный раствор дитизона в CCl <sub>4</sub> 2) 0,5%-ный раствор 8-оксихинолина в 60%-ном этаноле + пары NH <sub>3</sub>	кр. ф. ж.	Только для Sn <sup>2+</sup> Флуоресценция в ультрафиолетовом свете (Sn <sup>3+</sup> и Sn <sup>4+</sup> ) не изменяется после опрыскивания CH <sub>3</sub> COOH
Fe <sup>3+</sup>	1) 1%-ный раствор KCNS в воде 2) 5%-ный раствор K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> в воде 3) 0,1%-ный раствор тирона в воде + пары NH <sub>3</sub>	кр. син. кр.	Окрашивание спустя некоторое время исчезает Мешают F <sup>-</sup> и PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
Al	1) Аллюминон (аммониевая соль ауриптрикарбоновой кислоты), 0,1%-ный раствор в 1%-ном растворе ацетата аммония (1,0 $\mu$ г) 2) 0,5%-ный раствор 8-оксихинолина в 60%-ном этаноле + NH <sub>3</sub> 3) Насыщенный раствор ализарина в этаноле + NH <sub>3</sub>	кр. ж. з. кр. ф.	После подкисления HCl Не исчезает после опрыскивания CH <sub>3</sub> COOH (в ультрафиолетовом свете)
Cr	1) 1%-ный раствор дифенилкарбазида в этаноле 2) 5%-ный раствор хромотроповой кислоты в воде 3) 2 н. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> и 20%-ная H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1:1)	ф. кр. син.	В кислой среде после окисления в хромат Только в виде CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Неустойчивый

Катион	Реактив (чувствительность)	Окрашивание	Примечания
V	1) 1%-ный раствор KCNS в воде 2) 1%-ный раствор $K_2CrO_4$ в воде 3) 2 н. $H_2SO_4$ и 20%-ная $H_2O_2$ (1:1)	син. кр. о. к. кр.	Постепенное появление
Ti	1) 5%-ный раствор хромотроновой кислоты в воде 2) 10%-ный раствор галлотаннина в воде 3) 2 н. NaOH и 20%-ная $H_2O_2$ (1:1)	к. кр. кр. о. о.	Не исчезает после опрыскивания 1 н. $H_2SO_4$ После опрыскивания 2 н. $CH_3COOH$
Mo	1) 5%-ный раствор пирогаллола в этаноле 2) 1%-ный раствор дифенилкарбазида в этаноле (6 $\mu g$ ) 3) 5%-ный раствор $K_4Fe(CN)_6$ в воде	кр. ф. тм. к.	(Карлесон) В присутствии минеральной кислоты
Zn	1) 0,1%-ный раствор м-тимолового синего в этаноле 2) 1%-ный раствор дифенилкарбазида в этаноле 3) $CuSO_4$ и $(NH_4)_2[Hg(CNS)_4]$ (Д 189)	син. ф. кр. ф. ф.	После опрыскивания насыщенным раствором уротропина в 50%-ном ацетоне (Карлесон)
Mn	1) 0,1%-ный раствор м-тимолового синего в этаноле 2) 0,05%-ный раствор бензидина в 10%-ной $CH_3COOH + NH_3$ (2 $\mu g$ )	син. син.	После опрыскивания насыщенным раствором уротропина в 50%-ном ацетоне
Co	1) 0,1%-ный раствор рубеановодородной кислоты в 60%-ном этаноле + $NH_3$ 2) Насыщенный водный раствор KCNS с ацетоном (1:1; 2,0 $\mu g$ ) 3) 0,05%-ный раствор бензидина в 10%-ной $CH_3COOH + NH_3$	ж. к. син. син.	Ацетон в случае Co повышает интенсивность Маскируется предварительным опрыскиванием KCN
Ni	1) 0,1%-ный раствор рубеановодородной кислоты в 60%-ном этаноле + $NH_3$ 2) 1%-ный раствор диметилглиоксима в этаноле	син. кр.	В нейтральной или аммиачной среде
Ca	1) Насыщенный раствор ализарина в этаноле + пары $NH_3$ 2) 1%-ный раствор галлацетофенона в 50%-ном этаноле 3) 0,5%-ный раствор 8-оксихинолина в 60%-ном этаноле + пары $NH_3$	ф. кр. ф. ж. з.	Окрашивание фона исчезает при нагревании или опрыскивании $CH_3COOH$ (Поллард) Флуоресценция в ультрафиолетовом свете

Катион	Реактив (чувствительность)	Окрашивание	Примечания
Sr	1) 0,1%-ный раствор родизоната натрия в воде	кр.	При опрыскивании смесью 2 н. HCl и 2 н. CH <sub>3</sub> COOH происходит обесцвечивание
	2) 0,1%-ный раствор койевой кислоты в воде + пары NH <sub>3</sub>	ж.	(Поллард [4,5]), флуоресценция в ультрафиолетовом свете
	3) 0,1%-ный раствор виолуровой кислоты в воде	кр. ф.	(Эрленмейер и сотрудники), особенно чувствительна для ацетатов
Ba	1) 0,1%-ный раствор родизоната натрия в воде	кр.	При опрыскивании смесью 2 н. HCl и 2 н. CH <sub>3</sub> COOH происходит обесцвечивание
	2) 0,1%-ный раствор койевой кислоты в воде + пары NH <sub>3</sub>	ж.	(Поллард [4,5]), флуоресценция в ультрафиолетовом свете
	3) 0,1%-ный раствор виолуровой кислоты в воде	кр.	(Эрленмейер и сотрудники), особенно чувствительна для ацетатов
Mg	1) 0,01%-ный раствор хинализарина в этаноле + NH <sub>3</sub>	син.	(Карлесон)
	2) 1%-ный раствор дифенилкарбазида в этаноле	ф. кр.	После обработки парами NH <sub>3</sub>
	3) 0,1%-ный раствор виолуровой кислоты в воде	ж. роз.	(Эрленмейер и сотрудники), особенно чувствительна для ацетатов
Na	1) 0,1%-ный раствор виолуровой кислоты в воде	ф.	(Эрленмейер и сотрудники), особенно чувствительна для ацетатов
	2) Уксуснокислый уранилциник (насыщенный раствор в 2 н. CH <sub>3</sub> COOH)	ж.	В ультрафиолетовом свете
K	1) 10%-ный раствор кобальтинитрита натрия в 5%-ной CH <sub>3</sub> COOH	ж.	(Стил)
	2) 1%-ный раствор дицикриламина в воде	о.	
	3) 0,1%-ный раствор виолуровой кислоты в воде	ф.	(Эрленмейер и сотрудники), особенно чувствительна для ацетатов
Cs, Rb	1%-ный раствор дицикриламина в воде	кр.	
Li	0,1%-ный раствор виолуровой кислоты в воде	кр. ф.	(Эрленмейер и сотрудники), особенно чувствительна для ацетатов
Au	1) 0,03%-ный раствор <i>n</i> -диметиламинобензилденпропандина в этаноле	кр.	
	2) SnCl <sub>2</sub> · 2KJ (Д 187) (0,1 мг)	ч.	(Кембер, Уэлс [1])

Продолжение табл. 139

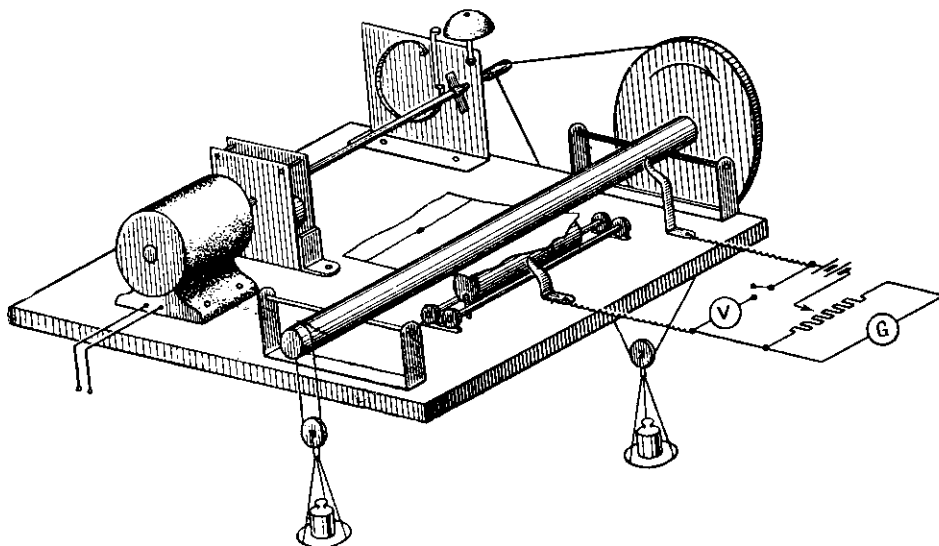
Катион	Реактив (чувствительность)	Окрашивание	Примечания
Pt	1) Цинхонин + KJ (Д 188) 2) Желтый сульфид аммония, разбавленный водой в соотношении 1 : 1	роз. кр. к.	
Pd	1) Желтый сульфид аммония, разбавленный водой в соотношении 1 : 1 2) 0,03%-ный раствор <i>n</i> -диметиламинобензилиденпропанамина в этаноле	к. кр.	
Ru	2%-ный раствор тиомочевины в 1 н. HCl	син.	
Os	2%-ный раствор тиомочевины в 1 н. HCl	кр.	
UO <sub>2</sub>	5%-ный раствор K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> в воде	к.	
Редкие земли	Насыщенный раствор ализарина в 96%-ном этаноле	кр. ф.	(Поллард и Мак-Оми)
Be	0,05%-ный раствор хинализарина в 0,1 н. NaOH (0,7 мкг)	син.	
Ga	0,1%-ный раствор алюминона в этаноле	кр.	(Карлесон)
In	Насыщенный раствор ализарина в 96%-ном этаноле	кр. ф.	(Е. Ледерер и М. Ледерер)
Ce	1) Смесь аммиака (уд. вес 0,88) и 20%-ной H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 : 1) 2) 5%-ный раствор пирогаллола в этаноле	ж. кр.	(Карлесон)
Th <sup>4+</sup> Zr <sup>4+</sup>	0,05%-ный раствор пирокатехинового фиолетового в этаноле	син.-пурп.	(Мацек и Моравек)

#### Другие методы проявления

Интересный способ проявления использовал Отосаи при разделении щелочных и щелочноземельных элементов. Этот метод основан на электролизе. В процессе электролиза на катоде образуется гидроокись. Фенол-фталейн, которым опрыскивают хроматограмму, в присутствии гидроокиси приобретает красный цвет. При электролизе используют угольные

электроды; напряжение при электролизе составляет 6 в, время электролиза 5 сек.

Де-Фриз и Ван-Дален использовали при проявлении щелочных металлов их различную подвижность в электрическом поле. Проявление они проводили непосредственно на бумаге. Полоску бумаги с разделенными катионами перемещали между двумя цилиндрами со скоростью 0,25 мм/сек. Между обоими цилиндрами была приложена постоянная разность потенциалов, которую выбирали равной 4–80 в. Силу тока измеряли с помощью зеркального гальванометра (1 деление — 0,01  $\mu$ а).



Р и с. 239. Устройство для проявления ионов, основанное на принципе проводимости (Де-Фриз и Ван-Дален).

Сухую хроматограмму передвигают между стальными цилиндрами, к которым приложена разность потенциалов 4–80 в. Верхний цилиндр прижимается к нижнему с помощью двух грузов по 1,5 кг, которые прикреплены к его концам. Верхний цилиндр приводится во вращение синхронным моторчиком. Каждые 3 сек раздается звонок и с помощью гальванометра измеряется сила тока (шкала гальванометра градуирована в сотых долях  $\mu$ а).

Сила тока остается постоянной. В момент прохождения катиона по участку бумаги, расположенному между цилиндрами, сила тока возрастает. Таким образом, максимальное отклонение зайчика гальванометра будет соответствовать прохождению катиона. Измерения проводят через каждые 3 сек по сигналу звонка (рис. 239). Чувствительность этого метода для Li в присутствии значительного избытка K и Na составляет около 0,5  $\mu$ г, для Na — меньше 3  $\mu$ г и для K — меньше 5  $\mu$ г. Небольшие количества K в присутствии значительного избытка Na этим методом определить нельзя.

Лангер для непосредственного проявления Co, Cd, Tl и Pb на бумаге использовал полярографический метод. В качестве катода был использован амальгамированный золотой спиральный электрод, а в качестве анода — насыщенный каломельный электрод. Увлажненную хроматограмму передвигают между диском с амальгамированной золотой спиралью и цилиндром, смоченным раствором хлорида калия. Получаемые при анализе кривые регистрируются самописцем полярографа. В целом эта методика проста (см. рис. 101), и ее можно также использовать для полук количественного анализа катионов.

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Выбор системы растворителей для целей хроматографического разделения неорганических веществ на бумаге до настоящего времени проводили главным образом эмпирически. Это связано с необходимостью принимать во внимание большое число факторов, что затрудняет теоретическое предсказание пригодности растворителя. В основном для указанных целей используют полярные растворители: спирты, простые и сложные эфиры, кетоны. Лишь в небольшом числе случаев было описано использование других растворителей, например хлороформа, который легко растворяет ковалентные комплексы клешневидного типа. Из основных типов растворителей приведем следующие:

1) Простые эфиры: этиловый и метиловый эфиры, диоксан и некоторые циклические эфиры (тетрагидросильван, тетрагидропиран, тетрагидрофуран).

2) Кетоны: ацетон, метилэтилкетон, метил-*n*- и метилизопропилкетон, ацетилацетон.

3) Эфиры органических кислот: метилацетат и этилацетат.

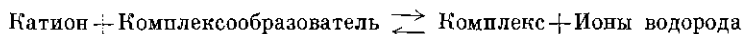
4) Спирты: метанол, этанол, *n*-пропанол, *изо*-пропанол, *n*-, *изо*-, *трет*-бутанолы и амиловый спирт.

5) Органические основания: пиридин и коллидин.

6) Органические кислоты: муравьиная и уксусная.

7) Хлороформ.

Кроме этих растворителей (насыщенных водой или безводных, с большим или меньшим содержанием минеральных или органических кислот), Поллард и сотрудники [6] предложили использовать ряд систем, состоящих из смесей растворителей с комплексообразующими веществами (табл. 140). Поллард и Мак-Оми [2] считают, что при хроматографическом разделении лучше прибавлять комплексообразователь к системе растворителей, чем использовать заранее приготовленные комплексы. Кроме того, известно, что образование комплексных соединений в определенной мере зависит от pH среды. Если, например, в качестве исходного материала для хроматографического разделения использовать комплексное соединение катиона с 8-оксихинолином, то в большинстве случаев, когда в растворителе содержится кислота, под ее влиянием будет происходить расщепление этого комплекса и образование хлорокомплексов, как видно из следующего уравнения:



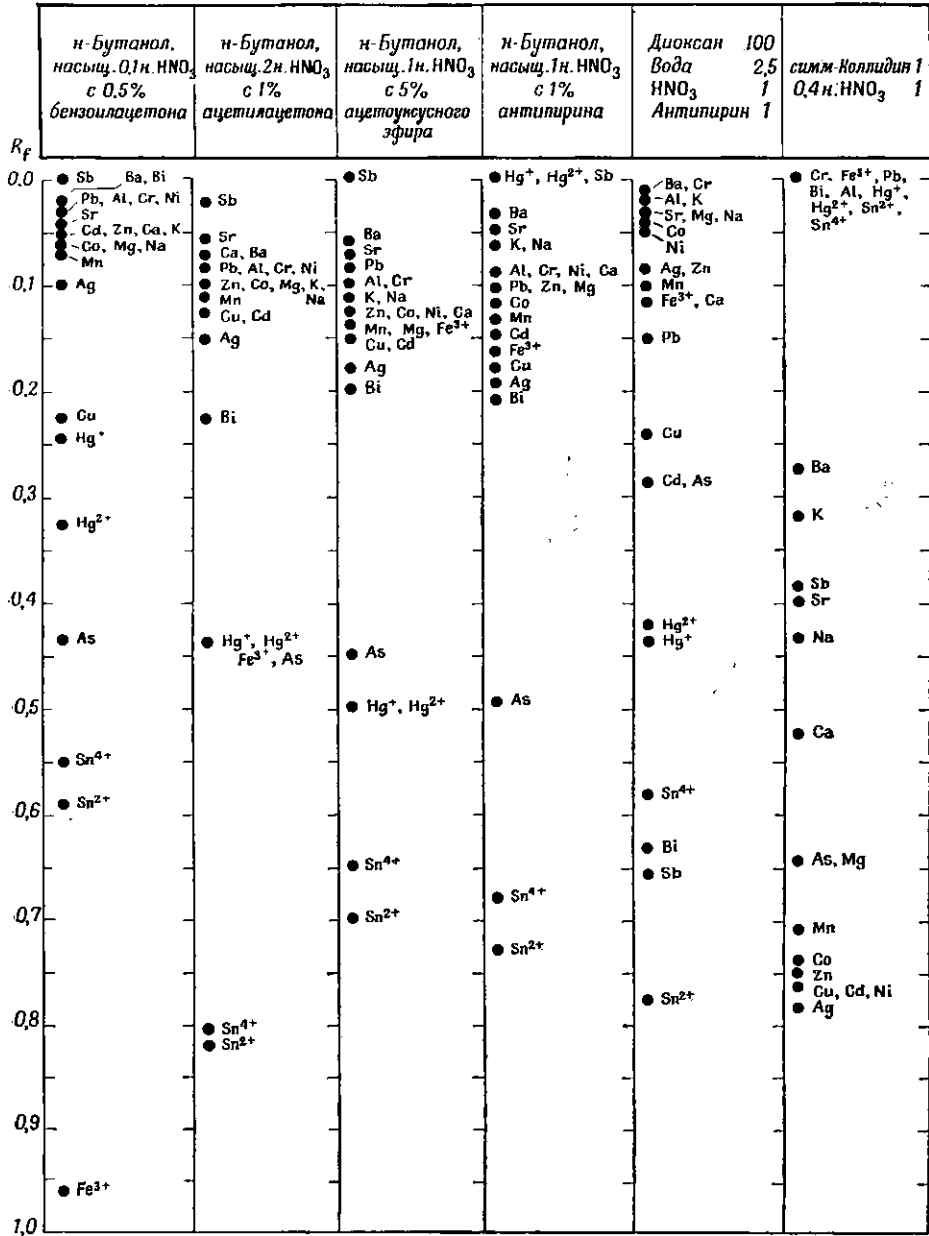
Таким образом, по бумаге будет перемещаться не только соответствующий оксинат, но и хлорокомплекс. Прибавление комплексообразователя к смеси растворителей приводит к смещению равновесия. Если комплекс растворен в подвижной фазе, равновесие смещается вправо. Это дает гарантию того, что на бумаге перемещается действительно требуемый комплекс.

## Минеральная кислота

Кислоты являются необходимой составной частью всех систем растворителей. Единственным, по-видимому, исключением является случай разделения щелочных металлов, при котором используют абсолютный метанол и некоторые системы с пиридином и коллидином. Кислота играет большую роль. Она препятствует гидролизу соли; с помощью кислоты

Таблица 140

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ КАТИОНОВ В СИСТЕМАХ  
С КОМПЛЕКСООБРАЗОВАТЕЛЯМИ  
(поллард и сотрудники [6])



изменяют рН среды таким образом, чтобы стало возможным образование комплекса при прибавлении комплексобразователя; кислота переводит хлориды в хлорокомплексы ( $\text{Au}$ ); она оказывает влияние на относительное расстояние двух фронтов системы растворителя. Кислота увеличивает

сродство целлюлозы к воде. Последнее объясняется тем, что кислота вследствие своей большей полярности адсорбируется на целлюлозе. Величина  $R_f$  зависит не только от вида кислоты, но и от ее содержания в растворе (табл. 141).

Таблица 141

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  КАТИОНОВ И ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МИНЕРАЛЬНОЙ КИСЛОТЫ

$R_f$	н-Бутанол насыщенный			Метил-н-пропилкетон		Ацетон
	1н. HCl	2н. HCl	3н. HCl	15% 8н. HCl	25% 8н. HCl	10% 6н. HCl
	Сибата			Карлесон		Сибата
0,0	● Ag, Pb ● Sr, Ba ● Ca, Sr ● Ni, Co, Mn, Al ● Fe <sup>3+</sup> , Cu	● Ag, Pb ● Ba ● Ca, Sr ● Al ● Cr, Ni ● Co ● Mn ● Cu ● Fe <sup>3+</sup>	● Ag, Pb ● Ba ● Sr ● Ca	● Sn <sup>4+</sup> ● Cr, Al, Ca ● Ni ● Mg ● Mn	● Sn <sup>4+</sup> ● Ba ● Al, Cr, Ni, Ca	● Al, Cr, Sr, Ca ● Ba
0,1						● Ni
0,2			● Al ● Cr ● Co, Ni ● Mn ● Cu	● Pb ● Co	● Pb ● Mn	● Mn
0,3	● Cd			● Cu ● Ag		
0,4	● Bi, As		● Fe <sup>3+</sup>			● Co
0,5	● Zn	● As ● Bi		● Zn ● Cd	● Bi	
0,6	● Sb ● Sn <sup>4+</sup> ● Sn <sup>2+</sup>	● Ca ● Sb, Zn ● Sn <sup>4+</sup> , Sn <sup>2+</sup>	● As ● Bi	● As ● Bi	● Ag, Cu	● Pb, Cu ● As
0,7		● Hg <sup>2+</sup>	● Zn ● Sb ● Sn <sup>4+</sup> , Sn <sup>2+</sup> ● Hg <sup>2+</sup>	● Hg <sup>2+</sup> ● Hg <sup>+</sup>	● Co	● Fe <sup>3+</sup> ● Zn ● Cd, Sb ● Bi, Sn <sup>4+</sup> , Sn <sup>2+</sup>
0,8	● Hg <sup>2+</sup>		● Hg <sup>+</sup>	● Fe <sup>3+</sup>	● Zn ● Hg <sup>2+</sup> ● Cd ● Sn <sup>2+</sup> ● Hg <sup>+</sup> ● Sb ● Fe <sup>3+</sup>	● Hg, Hg <sup>2+</sup>
0,9		● Hg <sup>+</sup>				
1,0	● Hg <sup>+</sup>					

Минеральная кислота, прибавляемая к растворителю, должна всегда иметь тот же анион, что и анион хроматографируемого вещества. Хотя различия в величинах  $R_f$  и не слишком велики (за исключением уксусной кислоты), однако может происходить значительное увеличение пятен, что особенно нежелательно в количественном анализе. В процессе проявления соли  $A^+B^-$  подвижной фазой, содержащей анион  $C^-$ , способный замещать анион  $B^-$ , будет иметь место равновесие  $AB + C^- \rightleftharpoons AC + B^-$ . Образование  $AC$  зависит от относительного сродства  $C^-$  и  $B^-$  к  $A^+$ , от относительной концентрации  $B$  и  $C$ , а также от  $pK$  кислот  $HB$  и  $HC$ . Поллард и сотрудники [9] показали, что образование двух зон происходит, например, в том случае, если для проявления нанесенных нитратов или хлоридов используют смесь водного раствора бутанола с уксусной кислотой. Одна из зон образована нитратом (или хлоридом), другая — уксуснокислой солью. Образование двух зон происходит, однако, и при использовании растворителей с комплексообразователями. Таким примером может служить случай хроматографирования нитрата меди, при котором в качестве подвижной фазы была использована смесь водного раствора бутанола с бензоилацетоном. На образование комплексов влияют два фактора: концентрация комплексообразователя и концентрация азотной кислоты, содержащейся в подвижной фазе. При определенных значениях  $pH$  и концентрации бензоилацетона происходит образование двух зон, из которых одна соответствует нитрату или монобензоилацетонному комплексу  $Cu[C_{10}H_9O_2]^+NO_3^-$ , а другая — дибензоилацетонному комплексу  $Cu[C_{10}H_9O_2]_2$ .

При использовании органического растворителя, содержащего воду и минеральную кислоту, на хроматограмме появляются два фронта растворителя. Поверхность бумаги между линией старта и первым фронтом называют «влажной», поскольку бумага содержит здесь растворитель с водой и кислотой (как результат адсорбции воды носителем из подвижной фазы). Поверхность между обоими фронтами в таком случае называют «сухой», так как в этом месте бумага содержит сухой органический растворитель. Относительное расстояние обоих фронтов зависит как от содержания воды, так и от содержания минеральной кислоты. Увеличение содержания кислоты приводит к сближению обоих фронтов, т. е.  $R_f$  для первого фронта растет. В случае использования растворителей, смешивающихся с водой (например, ацетон), сближение обоих фронтов происходит в результате увеличения как содержания минеральной кислоты, так и содержания воды. На относительное расстояние обоих фронтов, кроме содержания кислоты и воды в подвижной фазе, оказывает также влияние и атмосфера камеры.

### Влияние температуры

Общим результатом повышения температуры при хроматографировании неорганических веществ на бумаге является увеличение скорости протекания подвижной фазы через бумагу вследствие соответствующего уменьшения вязкости растворителя. Увеличение скорости протекания подвижной фазы не дает особых преимуществ, поскольку оно обычно сопровождается большим размыванием пятен и зон. Зоммер установил, что при использовании смеси концентрированной соляной кислоты, метанола и воды (10 : 80 : 10) повышение температуры приводит к сближению обоих фронтов, а при 56° они уже сливаются. Для большинства катионов более высоким температурам соответствуют большие значения  $R_f$ .

Увеличение температуры при хроматографировании неорганических веществ на бумаге имеет практическое значение лишь для тех катионов, концентрации которых в подвижной фазе ввиду их небольшой растворимости невелики (например, Al, Cr, Be, Pb и т. п.). В то время как пятна алюминия при нанесении 60 мкг образца имеют при комнатной температуре (18—20°) размытый вид, при температуре 56° и для 300 мкг образца достигается разделение, приводящее к образованию безупречно четкой зоны.

### Время хроматографирования

В вопросе, связанном с временем хроматографирования, нет единого мнения. Если одни авторы считают, что величина  $R_f$  не зависит от времени протекания подвижной фазы через бумагу, то другие полагают, что такая зависимость существует. В настоящее время, по-видимому, нельзя установить какой-либо определенной закономерности. Кроме того, известно, что даже при использовании одного и того же растворителя различным катионам соответствует различная продолжительность хроматографирования. Так, например, при хроматографическом разделении смеси Ni, Co, Mn, Cu, Zn и Fe величины  $R_f$  для Fe, Ni и Zn оставались постоянными при восходящем хроматографировании смесью ацетона с 6 н. соляной кислотой (88 : 12) для хроматограмм длиной 18 и 32 см. В противоположность этому величина  $R_f$  в случае Mn с увеличением времени хроматографирования увеличивалась незначительно, для Co увеличивалась сильнее, для Cu различия в величинах  $R_f$  также были велики. При использовании для хроматографирования бутанола, насыщенного 3 н. соляной кислотой, эти различия для всех указанных катионов проявляются в меньшей степени.

### Измерение величин $R_f$

Ввиду того что зоны, получаемые при разделении неорганических веществ, не всегда безупречно резкие и иногда размыты сильнее, чем зоны, образующиеся при хроматографическом разделении органических веществ, было предложено указывать величину  $R_f$  двумя числами (например, Лакур и сотрудники [10]). Первое число в соответствии с этим предложением следует относить к началу пятна или зоны, а второе — к его концу. Эти два числа еще яснее характеризуют возможность разделения отдельных катионов. Известно, что такое обозначение используют не во всех случаях и что иногда оно излишне. При использовании органических растворителей, хорошо смешивающихся с водой (например, ацетона, метил-*n*-пропилкетона, этанола, изопропанола и т.п.), зоны большинства веществ получаются достаточно резкими для того, чтобы уже по их значениям  $R_f$  (расчет сделан для середины пятна или зоны) можно было судить о возможности разделения. Размытые пятна образуются, например, при использовании смеси пиридина или коллидина с водой. В том случае, когда размытые пятна взаимно перекрываются своими краями, применение способа, предложенного Лакур, вполне обоснованно.

### Пропитанные бумаги

Ласковский и Мак-Кроне использовали бумагу, пропитанную 2,5%-ным раствором 8-оксихинолина в 96%-ном этаноле. В качестве подвижной

фазы они использовали различные чистые растворители. Значения  $R_f$  для отдельных подвижных фаз приведены в табл. 142.

Таблица 142  
ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  НЕКОТОРЫХ КАТИОНОВ НА БУМАГЕ,  
ПРОПИТАННОЙ 8-ОКСИХИНОЛИНОМ  
(Ласковский и Мак-Кроне)

Катион	Подвижная фаза			
	диоксан	пиридин	метанол	этанол
Al	0,79	0,96	0,65	0,97
Sb	0,00	0,90	0,69	0,57
Ba	0,68	0,00	0,46	0,06
Cd	0,00	0,91	0,14	0,00
Ca	—	0,11	0,42	0,08
Co	0,94	0,87	0,86	1,00
Cu	0,81	0,91	0,65	0,00
Fe	0,99	0,92	—	—
Pb	0,69	0,83	—	—
Mg	—	0,53	0,60	0,10
Ni	0,79	0,93	0,79	0,75

Фернандо и Филлипс [2] пропитывали бумагу различными производными 8-оксихинолина; в качестве подвижного растворителя они использовали пиридин и этанол. Фернандо и Де-Сильва [1] пропитывали бумагу в течение 6—8 час насыщенным раствором азокрасителей в метаноле или этаноле. Хроматографирование они вели при 30° метанолом или этанолом восходящим методом; были установлены значения  $R_f$  для ряда катионов. Наилучшее разделение было достигнуто на бумаге, пропитанной 5-*o*-карбоксифенилазо-8-оксихинолином и 5-*n*-сульфанилфенилазо-8-оксихинолином. Такая пропитка по сравнению с пропиткой 8-оксихинолином является более выгодной, поскольку она способствует увеличению избирательности.

Ледерер [10] опубликовал предварительное сообщение о пропитке бумаги катионообменниками. Для разделения редкоземельных элементов (Y, Ce и La) им была использована бумага, пропитанная смолой дауэкс 50 в  $\text{NH}_3$ -форме. Хорошее разделение было получено при использовании в качестве подвижной фазы 3%-ного цитратного буфера с pH 3. При сравнении результатов, полученных при разделении хлоридов Co, Cu и  $\text{Fe}^{3+}$  на чистой бумаге и бумаге, пропитанной катионитом дауэкс 50 в  $\text{H}^+$ -форме, различия практически обнаружено не было. На этом основании был сделан вывод, что влиянием ионного обмена при распределительной хроматографии можно пренебречь.

#### Образование комплексов перед хроматографированием

Ривс и Крумплер готовили комплексы различных катионов с 8-оксихинолином, осаждая их в разбавленной уксусной кислоте или ацетатном буфере. Полученные комплексы растворяли в разбавленной соляной кислоте и затем наносили их на бумагу. В качестве подвижной фазы использовали *n*-бутанол, содержащий различные количества 12 н.

соляной кислоты. Однако при такой методике кажется сомнительным, что катионы действительно перемещаются в виде клешневидных соединений, поскольку в сравнительно сильной кислоте, которую использовали в подвижной фазе, должно, по-видимому, происходить расщепление комплекса. И, действительно, авторы доказали, что это явление имеет место в случае Ni, Cu, Bi, Zn и  $\text{Hg}^{2+}$ . Берг и Мак-Интайр [1] проводили разделение комплексов металлов с 2-теноилтрифторацетоном при использовании смеси бензола, метанола и уксусной кислоты. Разделение проводили как на чистой бумаге, так и на пропитанной окисью алюминия или хлоридом натрия. Хорошие результаты были получены при разделении катионов следующих групп:  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ ;  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . Берг и Штрассен [2] разделили  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  в виде ацетилацетонатов, растворенных в смеси циклогексан—диоксан—метанол (84:10:6). Использование методики, для которой характерно добавление к подвижной фазе ацетилацетона (Поллард и сотрудники [4]), должно, по-видимому, приводить к появлению некоторых аномалий, связанных с различной скоростью образования клешневидного комплекса, избытком комплексообразователя и присутствием сильной кислоты в подвижной фазе. Предпочтительнее использовать такую подвижную фазу, в которой хроматографируемые комплексы устойчивы. Из других  $\beta$ -дикетонов Берг и Штрассен [3] исследовали 2-теноилперфторобутирилметан и 2-фурилперфторобутирилметан. Эти авторы нашли условия разделения соответствующих комплексов для катионов  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . В качестве подвижной фазы использовали смесь петролейного эфира с метанолом.

Вентурелло и Ге [3] использовали для разделения детизонатов некоторых катионов бумагу, увлажненную буферным раствором, pH которого изменялся в пределах от 1 до 10. В качестве подвижной фазы были использованы спирты, начиная от метилового и кончая изоамиловым. На основании хроматографического поведения разделяемых веществ при различных pH для каждого отдельного комплекса было найдено оптимальное значение pH.

## КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Ввиду того что практически невозможно разделить одновременно все катионы, были разработаны различные способы качественного анализа, общей целью которых является осуществление предварительного разделения всех присутствующих катионов на меньшие группы. Чаще всего прибегают к разделению на обычные аналитические группы, каждую из которых затем подвергают хроматографическому анализу. Кроме этого метода, существуют два способа анализа смесей, разработанные Поллардом и сотрудниками [7, 10, 11] для 24 катионов. В первом случае применяют различные реактивы для проявления при использовании одной и той же подвижной фазы. Во втором способе используют различные подвижные фазы, а оценку разделения производят на основании величин  $R_f$ .

## РАЗДЕЛЕНИЕ Ag, $\text{Hg}^+$ , Pb, (Ti)

В одной из первых работ разделение элементов этой группы было основано на модификации капельной реакции, предложенной Ледерером [3]. На центральную часть круглого листа фильтровальной бумаги

наносили небольшие количества (около 1 мг) смеси Ag, Hg<sup>+</sup> и Pb. Затем в это же место с помощью пипетки прибавляли сначала две капли воды, а потом две капли 5 н. раствора аммиака. После обработки хроматограммы сероводородом появлялись три окружности: внешняя — PbS, внутренняя — Ag<sub>2</sub>S и в центре — Hg и HgS.

При разделении элементов этой группы методом распределительной хроматографии были использованы самые различные системы растворителей. В большинстве случаев достигали отделения лишь одного элемента. Так, например, в системе, состоящей из смеси *n*-бутанола с тиоциановой кислотой, Ag и Hg имеют  $R_f$  1,0, в то время как Pb остается на линии старта; в системе, состоящей из *n*-бутанола, насыщенного 4 н. уксусной кислотой, Ag и Pb имеют  $R_f$  около 0,45, а  $R_f$  для Hg составляет 0,77. Хорошего разделения можно достигнуть при использовании системы *n*-бутанол — пиридин — вода (100 : 20 : 20); эта система была предложена Харасавой. Муртки и сотрудники [1] использовали эту систему при разделении методом круговой хроматографии (табл. 143).

Таблица 143

НЕКОТОРЫЕ СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ГРУППЫ Ag, Hg<sup>+</sup> и Pb

Подвижная фаза	Катион			Автор
	Ag	Hg	Pb	
<i>n</i> -Бутанол, насыщенный 1 н. HNO <sub>3</sub> с 0,5% бензоилацетона; нисходящий метод . . . . .	0,1	0,03	0,25	Поллард и сотрудники [6]
<i>n</i> -Бутанол—пиридин—вода (100 : 20 : 20); круговой метод . . . . .	0,86	0,62	0,34	Муртки и сотрудники [2]
<i>n</i> -Бутанол—пиридин—вода (60 : 4 : 36); восходящий метод . . . . .	0,52	0,92	0,06	Тевари
<i>трет</i> -Бутанол—ацетон—вода—конц. HNO <sub>3</sub> (40 : 40 : 12 : 8); круговой метод . . . . .	0,25	0,0	0,50	Сурак и Мартинович
Метил- <i>n</i> -пропилкетон с 15% 10 н. HCl; восходящий метод . . . . .	0,59	0,84	0,19	Карлесон

РАЗДЕЛЕНИЕ Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Bi<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup> (Pb<sup>2+</sup>)

Берсталь и сотрудники при разделении элементов этой группы в качестве подвижной фазы использовали *n*-бутанол, насыщенный соляной кислотой различной концентрации. Наилучшие результаты были получены при использовании 3 н. кислоты. В то же время Сибата использовал *n*-бутанол, насыщенный 2 н. соляной кислотой. При разделении методом восходящей хроматографии быстрее всего движется катион Hg<sup>2+</sup>, затем Cd, Bi и Cu. На пятно Cu налагается размытое пятно Pb. Муртки и Нарайан [2] исследовали влияние, которое оказывают на величину  $R_f$  катионов этой группы анионы, связанные с этими катионами, и тип кислоты, присутствующей в подвижной фазе. Результаты этого исследования приведены в табл. 144.

Таблица 144

ВЛИЯНИЕ АНИОНА НА ВЕЛИЧИНУ  $R_f$   
(Муртхи и Нараян [1])

Соль	н-Бутанол, насыщенный 4 н. уксусной кислотой				
	Pb	Hg <sup>2+</sup>	Bi	Cu	Cd
Сульфат . . . . .	—	0,57	—	0,27	0,21
Хлорид . . . . .	—	0,84	0,61	0,40	0,42
Нитрат . . . . .	0,46	0,69	0,62	0,54	0,52
Ацетат . . . . .	0,51	0,82	—	0,57	0,54

н-Бутанол, насыщенный 3 н. соляной кислотой

Хлорид . . . . .	—	0,83	0,72	0,36	0,79
------------------	---	------	------	------	------

Ледерер [4] при разделении элементов этой группы, кроме *n*-бутанола, использовал и другие спирты с различным содержанием минеральных кислот. Системы, исследовавшиеся различными авторами в качестве подвижной фазы и давшие наилучшие результаты при разделении элементов этой группы, приведены в табл. 145.

Таблица 145

СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ  
Cu, Pb, Bi, Cd, Hg<sup>2+</sup>

Система растворителей	$R_f$					Автор
	Cu	Pb	Bi	Cd	Hg <sup>2+</sup>	
<i>n</i> -Бутанол—H <sub>2</sub> O—ацетоуксусный эфир—CH <sub>3</sub> COOH (50 : 35 : 5 : 10); нисходящий метод . . . . .	0,63	0,18	0,34	0,28	0,83	Поллард и со- трудники [6]
<i>n</i> -Бутанол, насыщенный 3 н. HCl; нисходящий метод . . . . .	0,20	0,27	0,60	0,77	0,81	Берсталь и со- трудники [1]
<i>n</i> -Бутанол— <i>изо</i> -пропанол—5 н. HCl (45 : 45 : 10); восходящий метод . . . . .	0,12	0,03	0,65	0,73	0,85	Уокер и Ледерер
<i>трет</i> -Бутанол—ацетон—вода—6 н. HNO <sub>3</sub> —ацетилацетон (40 : 40 : 11 : 4,5 : 4,5); круговой метод . . . . .	0,40	0,15	0,76	0,32	0,90	Сурак и Мартино- вич
Метил- <i>n</i> -пропилкетон с 15% 10 н. HCl; восходящий метод . . . . .	0,60	0,19	0,40	0,75	0,80	Карлесон
<i>изо</i> -Пропанол с 10% CH <sub>3</sub> COOH и 10% H <sub>2</sub> O; круговой метод . . . . .	0,44	0,24	0,51	0,39	0,69	Барнабас [1]

## РАЗДЕЛЕНИЕ As, Sb, Sn

В этой группе с помощью использования ряда растворителей было достигнуто хорошее отделение  $As^{3+}$  от  $Sb^{3+}$ . В то же время разделения  $Sn^{2+}$  и  $Sb^{3+}$  добиться весьма трудно. Берсталь и сотрудники [1] использовали в качестве подвижной фазы ацетилацетон, насыщенный водой с 0,5% концентрированной соляной кислоты и 25% ацетона. Проявление раствором дитизона в хлороформе приводит к образованию пятна Sn в области фронта; величина  $R_f$  для Sb равна 0,5, а для As — 0,2. Ледерер [4] исполь-

Таблица 146

СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ As, Sb и Sn

Система растворителей	$R_f$			Автор
	As <sup>3+</sup>	Sb <sup>3+</sup>	Sn <sup>2+</sup>	
<i>трет</i> -Бутанол—CHCl <sub>3</sub> —8 н. HCl—ацетилацетон (45:45:8:2); круговой метод . . . . .	0,64	0,85	1,0	Сурак и Мартинович
Ацетилацетон, насыщенный смесью H <sub>2</sub> O—HCl—ацетон (75:0,5:25); нисходящий метод . . . . .	0,20	0,50	1,0	Берсталь и сотрудники [1]
<i>н</i> -Бутанол—H <sub>2</sub> O—винная кислота (20 мл:20 мл:4 г); нисходящий метод . . . . .	0,61	0,39	0,75	Стефанович и сотрудники [2]

зовал в этом случае спирты, содержащие соляную кислоту. Использование *н*-бутанола с различным содержанием соляной кислоты приводит к хорошему отделению As от Sb, разделение же Sb и Sn<sup>2+</sup> в этом случае осуществляется плохо. Харасава разделял  $Sb^{3+}$  и  $Sn^{2+}$  в смеси *н*-бутанол—HCl—вода (100:4:20) после их предварительного окисления перекисью водорода в  $Sb^{5+}$  и  $Sn^{4+}$  ( $R_f$  соответственно 0,0 и 0,7). Андерсон и Уитли для разделения элементов этой группы использовали эфир, насыщенный различными минеральными кислотами (HCl, HBr, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), а Карлесон—метил-*н*-пропилкетон и метилизопропилкетон с различным содержанием соляной кислоты. Как и в предыдущих случаях, в этих системах осуществляется хорошее отделение  $As^{3+}$  от  $Sb^{3+}$  и  $Sn^{2+}$ , разделение же  $Sb^{3+}$  и  $Sn^{2+}$  является неполным.

При изучении хроматографического разделения элементов различной валентности Полларду и сотрудникам [3] удалось отделить  $As^{3+}$  от  $As^{5+}$  ( $R_f$  соответственно равны 0,55 и 0,75) и  $Sb^{3+}$  от  $Sb^{5+}$  ( $R_f$  0,75 и 0,00 — «хвост»). В качестве подвижной фазы в этом случае использовали систему: соляная кислота — вода — эфир — метанол (2:20:50:30).

РАЗДЕЛЕНИЕ Fe, Cr, Al, Ti, V, UO<sub>2</sub>

Берсталь и сотрудники [1] для разделения Fe, Al и Cr использовали смесь ледяной уксусной кислоты с 25% метанола. Ввиду близких значений  $R_f$  для Al и Cr их проявление проводят последовательно

на двух половинках листа бумаги (см. стр. 676). Лакур и сотрудники [6] для разделения Fe, Ti и Al использовали 6,5 н. муравьиную кислоту. В этом случае Fe и Ti образовывали смешанную зону, от которой отделя-

Таблица 147

СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ  
Fe, Cr, Al, Ti, V, UO<sub>2</sub>

Система растворителей	$R_f$						Автор
	Fe	Cr	Al	Ti	V	UO <sub>2</sub>	
Ацетон с 5% H <sub>2</sub> O и 5% HCl; нисходящий метод . . . . .	0,97	—	—	—	0,18	0,64	Берсталь и сотрудники [1]
Бутанол—уксусная кислота—ацетоацетат—H <sub>2</sub> O (50 : 10 : 5 : 3,5); нисходящий метод	0,73	0,64	0,17	—	—	—	Поллард и сотрудники [4]
Этанол с 10% 5 н. HCl; восходящий метод	0,56	0,47	0,37	—	0,38	0,57	Ледерер [4]
Ацетон с 5% конц. HCl; камера насыщена C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ; нисходящий метод . . . . .	0,96	—	0,12	—	—	0,50	Лакур и сотрудники [8]
Амиловый спирт—C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> —HCl (60 : 10 : : 30), в виде хлоридов с 15% HCl и 10% лимонной кислоты; нисходящий метод . .	0,95	—	0,13	0,35	—	—	Лакур и сотрудники [10]

лась зона, содержащая Al (см. стр. 704). Разделения всех трех катионов удавалось достигнуть в том случае, когда хроматографируемый образец представлял смесь соответствующих хлоридов, растворенных в смеси 15%-ной соляной кислоты и 10% лимонной кислоты, а используемая подвижная фаза представляла систему амиловый спирт — бензол — концентрированная соляная кислота (60 : 10 : 30; Лакур [10]) (табл. 147). Отделение Fe от Ti и Al от V Лакур и сотрудники [7] проводили в смеси ацетон — сухой хлористый водород — метанол (100 мл : 1,0 г : 1,4 г). Смесь ацетона с концентрированной соляной кислотой была использована для отделения Fe от Al (Лакур, Гейндрикс [3]). Особенно часто эту систему использовали при анализе образцов урана. Разделение Ti, V и Mo было осуществлено Ледерером [6] в виде их перекисных соединений. Хроматографирование проводили в *n*-бутаноле, насыщенном смесью, состоящей из 10 мл концентрированной соляной кислоты, 10 мл 30%-ной перекиси водорода и 80 мл воды. Для Ti величина  $R_f$  равнялась 0,09, для V — 0,27 и для Mo — 0,79. Для выделения урана из разнообразных смесей катионов был предложен ряд подвижных фаз, важнейшие из которых приведены в главе о количественном анализе (стр. 703); некоторые из них указаны на стр. 699. Хорошие результаты были получены Стефановичем и сотрудниками [2] при проведении разделения Al, Fe и Cr в системе, состоящей из *n*-пропа-

нола, метанола, 2 н. раствора соляной кислоты и роданида аммония (60 мл:20 мл:20 мл:4 г). Рао и Шанкар использовали для разделения Fe, Al и Be смесь бутанона с концентрированной соляной кислотой (85:15). Вентурелло и Ге [4] удалось осуществить разделение Ni, Cr, Mn, V, Mo, Co и Cu (или Al) в присутствии большого количества Fe. Для разделения в этом случае использовали систему *n*-бутанол — этилацетат — концентрированная соляная кислота (37,5:37,5:25).

#### РАЗДЕЛЕНИЕ Co, Ni, Mn, Zn, Mo

Для разделения катионов этой группы пригодны лишь смеси низкомолекулярных кетонов с соляной кислотой и водой. Берсталь и сотрудники [1] при разделении Ni, Mn, Co и Zn в качестве подвижной фазы использовали смесь ацетона с 5% воды и 8% концентрированной соляной кислоты (табл. 148). При разделении Ni, Mn, Co, Cu и Fe Арден и сотруд-

Таблица 148  
СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ Co, Ni, Mn, Zn, Mo

Системы растворителей	$R_f$					Автор
	Co	Ni	Mn	Zn	Mo	
Ацетон с 5% $H_2O$ и 8% $HCl$ ; нисходящий метод . . . . .	0,60	0,07	0,30	0,90	—	Берсталь и сотрудники [1]
Ацетон—20%-ная $HCl$ (88:12); восходящий метод . . . . .	0,51	0,03	0,26	0,82	—	Какач
Метилизобутилкетон с 15% 10 н. $HCl$ ; нисходящий метод . . .	0,52	0,04	0,13	0,58	0,90 <sup>a)</sup>	Карлесон

a) В виде  $MoO_4^{2-}$ .

ники [1], а также Льюис и Гриффитс использовали смесь ацетона с концентрированной соляной кислотой и метил-*n*-пропилкетон (50:8:42). Елисеева для разделения сложной смеси Al, Cr, Cd, Fe, Ni, Mn, Co и Zn использовала метод двумерной хроматографии. В первом направлении пропускалась смесь ацетона с 5% воды и 8% концентрированной соляной кислоты, во втором направлении — смесь пиридина и воды (60:40). Смесь катионов Fe, Zn, Co, Cu, Ni и Mn Какач разделял в смеси ацетона с 20%-ной соляной кислотой (88:12). При высоком содержании Fe для разделения этих элементов было использовано двойное хроматографирование. Сначала хроматографировали нисходящим способом в системе, состоящей из коллидина и 0,4 н. азотной кислоты (1:1). При этом катион Fe оставался на линии старта, а остальные 5 катионов перемещались с фронтом растворителя. После высушивания хроматограммы часть листа бумаги, содержащую железо, отрезали, а с оставшейся частью проводили хроматографирование смесью ацетона с 12%-ной соляной кислотой (88:12) восходящим методом. Cu, Co и Ni определяли с помощью спиртового раствора рубеоноводородной кислоты. Затем после высушивания бумаги ее опрыскивали 0,1%-ным раствором метилтимолового синего в этаноле

и насыщенным раствором уротропина в смеси воды с ацетоном (1:1). Этим способом были проявлены зоны, содержавшие Mn, Zn и Fe (см. также рис. 240).

Поллард и сотрудники [6] получили хорошие результаты при разделении Fe, Co, Mn и Ni в смеси коллидин — вода (1:1). Полученные ими величины  $R_f$  соответственно равны 0,0; 0,48; 0,28; 0,55.

Алмаши и Штрауб [2] при хроматографическом выделении  $\text{Mo}^{6+}$  из смеси с другими катионами использовали систему этанол — концентрированная соляная кислота — вода (40:10:50). Определение молибдена в смесях катионов изучали также Кандела и сотрудники и Николас со Стивенсом. Они разделяли  $\text{Mo}^{5+}$  и  $\text{Mo}^{6+}$  с помощью метода нисходящей хроматографии. В качестве подвижной фазы использовали систему вода — уксусная кислота — роданид калия (100 мл:10 мл:10 г). После элюирования проводили фотометрическое определение пентатиоцианата молибдена. Хартками и Спеккер для разделения катионов аналитических групп IIIa и IIIb использовали смесь тетрагидрофурана с концентрированной соляной кислотой (50:15). В этом случае  $\text{Fe}^{3+}$ , Zn,  $\text{MoO}_4^{2-}$  и Cd движутся с фронтом растворителя, а  $\text{UO}_2$ , Cu, Co,  $\text{VO}_2$ , Mn и Ni хорошо разделяются. Величины  $R_f$  для последних соответственно составляют 0,98; 0,91; 0,78; 0,56; 0,50; 0,27.

#### РАЗДЕЛЕНИЕ Ba, Sr, Ca, Mg

Берсталь [1] для разделения элементов этой группы предложил использовать систему, состоящую из пиридина с добавкой 20% воды и 1% роданида калия. Разделение Берсталь рекомендует проводить в камере, влажность в которой составляет 65—80% (насыщенный раствор нитрата или хлорида аммония). Наибольшей скоростью перемещения во всех случаях обладает Ca, затем Sr и Ba. По данным Маги и Хэдриджа, величины  $R_f$  для элементов указанной группы равны: Ba 0,05—0,14; Sr 0,17—0,27; Ca 0,44—0,51; Mg 0,55—0,64; Be 0,78—0,93. В качестве подвижной фазы

Таблица 149

СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ Ca, Ba, Sr, Mg

Системы растворителей	$R_f$				Автор
	Ca	Ba	Sr	Mg	
Метанол—этанол (1:1); круговой метод . . . . .	0,62	0,28	0,49	0,80	Барнабас и сотрудники [3]
трет-Бутанол—6 н. HCl (1:1); круговой метод . . . . .	0,60	0,50	0,35	—	Сурак и Мартино-вич
изо-Пропанол—пиридин— $\text{H}_2\text{O}$ —уксусная кислота (8:8:4:1); восходящий метод . . . . .	0,35	0,09 <sup>a</sup> )	0,19	0,53	Гордон и Хевел
Коллидин—0,4 н. $\text{HNO}_3$ (1:1); нисходящий метод . . . . .	0,52	0,26	0,40	0,65	Поллард и сотрудники [6]

а) В виде ацетатов.

Маги и Хэдридж использовали систему метанол — бутанол — коллидин — 6 н. уксусная кислота (40 : 20 : 20 : 20). Эрленмейер и сотрудники для разделения ацетатов элементов этой группы использовали смесь 96 %-ного этанола с 2 н. уксусной кислотой, а Гордон и Хевел — систему изопропиловый спирт — пиридин — вода — уксусная кислота (8 : 8 : 4 : 1) (табл. 149). Поллард и сотрудники [8] при определении элементов этой группы использовали систему метанол — муравьиная кислота — вода — муравьинокислый аммоний — изопропанол (50 мл : 2 мл : 15 мл : 2,5 г : 30 мл). Найденные ими значения  $R_f$  составляют для Ba 0,3; Sr 0,45; Ca 0,60; Mg 0,75.

#### РАЗДЕЛЕНИЕ Na, K, NH<sub>4</sub>, Rb, Cs, Li

Разделению и идентификации щелочных металлов на бумаге посвящено большое число работ. Стил провел сравнение всех описанных смесей растворителей, использовавшихся для разделения NH<sub>4</sub>, K, Rb и Cs. Это сравнение показало, что разделение всех четырех указанных катионов нельзя осуществить с помощью применения какой-либо одной из описанных смесей. Единственным растворителем, позволяющим осуществить это разделение, является фенол, насыщенный 20 %-ной соляной кислотой. Проявление Стил проводил 10 %-ным раствором кобальтинитрита натрия в 5 %-ной уксусной кислоте. Чакрабарты и Бурма исследовали поведение хлоридов натрия, калия и лития при восходящей и нисходящей хроматографии, используя в качестве растворителей абсолютный метанол, этанол и ацетон, а также различные смеси этанола, метанола и ацетона с водой. В то время как в абсолютном этаноле и ацетоне ни один из этих металлов не передвигается, абсолютный метанол пригоден для использования в качестве подвижной фазы. Это было подтверждено Сураком и Мартиновичем, которые применяли в этом случае метод круговой хроматографии (табл. 150). Смеси этанола с водой более пригодны, чем смеси

Таблица 150

СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ K, Na, NH<sub>4</sub>, Li, Cs, Rb

Система растворителей	$R_f$						Автор
	K	Na	NH <sub>4</sub>	Li	Cs	Rb	
Абсолютный метанол; круговой метод . . .	0,20	0,42	—	0,68	—	—	Сурак и Мартинович
Фенол, насыщенный 20 %-ной HCl; восходящий метод . . . . .	0,19	—	0,11	—	0,43	0,27	Стил
Этанол—H <sub>2</sub> O (80 : 20); восходящий метод	0,25	0,37	—	0,61	—	—	Чакрабарты и Бурма
Этанол—метанол (1 : 1); восходящий метод	0,08	0,23	0,32	0,65	—	—	Барнабас и сотрудники [2]
Бутанол—метанол (3 : 7); круговой метод	0,31	0,48	0,57	0,78	—	—	Барнабас и сотрудники [2]

ацетона с водой. Поскольку гидроокиси Li, Na и K имеют низкие значения  $R_f$ , мало отличающиеся друг от друга, для их разделения следует использовать хроматографирование с перетеканием. Хорошее разделение удалось получить Бурме [1] при хроматографировании смесью этанола и воды (85 : 15) в течение 36—48 час. При разделении сернокислых и лимоннокислых солей этих трех металлов Бурма [2] использовал различные смеси метанола, этанола и ацетона с водой. В основном в этом случае имеют место те же закономерности, которые уже были отмечены для хлоридов этих металлов, т. е. смеси спиртов с водой более пригодны, чем смеси ацетона с водой. Барнабас и сотрудники [2] также использовали различные подвижные фазы при проведении хроматографического разделения K, Na,  $\text{NH}_4$  и Li. Определение этих катионов проводили параллельно с помощью круговой и восходящей хроматографии. В обоих случаях были определены величины  $R_f$  для указанных элементов. Для проявления применяли свежий 0,2%-ный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола в этаноле; кроме 2,6-дихлорфенолиндофенола, в растворе присутствовало азотнокислое серебро (3 г  $\text{AgNO}_3$  на 100 мл раствора). Сакагути и Иасуда осуществили разделение K, Na,  $\text{NH}_4$ , Mg и Li в виде хлоридов, используя следующие системы: *n*-пропанол — метанол (9 : 1), метанол — *n*-бутанол или метанол — амиловый спирт (7 : 3).

#### РАЗДЕЛЕНИЕ Au, Pt, Pd, Rh, Ir, Ru, Os

Одной из первых работ, посвященных разделению элементов этой группы, была работа Ледерера [1], в которой он для разделения Ag, Cu, Pd, Pt и Au использовал *n*-бутанол, насыщенный 1 н. соляной кислотой. После обработки хроматограммы аммиаком проявление элементов производили с помощью сероводорода. Берсталь и сотрудники для разделения этих элементов использовали метилэтилкетон (иногда метил-*n*-пропил-

Таблица 151

## СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ

Au, Pt, Pd, Rh, Ir, Ru, Os \*

Система растворителей	$R_f$							Автор
	Au	Pt	Pd	Rh	Ir	Ru	Os	
Эфир— <i>n</i> -бутанол—конц. HCl (1 : 2 : 1); восходящий метод . . . . .	0,98	0,76	0,53	0,09	—	—	—	Сибата
<i>n</i> -Бутанол, насыщенный 10%-ной HCl и 10%-ной $\text{HNO}_3$ ; восходящий метод . . . . .	1,0	0,71	0,55	0,17	0,70	0,13	—	Ледерер [1]
Метил- <i>n</i> -пропилкетон с 30% HCl; нисходящий метод <sup>а)</sup> . . . . .	0,96	0,81	0,56	0,11	0,11	0,07	0,89	Берсталь и сотрудники [1]

<sup>а)</sup> Ir был отделен после хроматографирования с перетеканием; высушенную хроматограмму опрыскивали хлорной водой, а затем снова проявляли ацетоном с 5% HCl. В этом случае Ir перемещается с фронтом растворителя.

кетон) с 30% концентрированной соляной кислоты (табл. 151). Au, Pd и Pt разделялись, а Ir и Rh образовывали смешанную зону. Если в смеси присутствует Ru, он движется вместе с Ir и Rh. Os имеет несколько меньшее значение  $R_f$ , чем Au, однако их разделение не осуществляется полностью. Для избирательного выделения Au Берсталь и сотрудники использовали эфир с добавкой 2% сухого хлористого водорода и 7,5% абсолютного метанола. Pt, Pd, Cu и Rh проявляли с помощью хлорида олова (II) и йодида калия, Ir определяли путем окисления хлорной водой, а Ru и Os — 2%-ным раствором тиомочевины в 5 н. соляной кислоте. Серьезное исследование вопроса о разделении Rh, Pd, Pt и Ir было опубликовано Кембером и Уэллсом [2] (см. стр. 705). Сибата испытал пригодность ряда растворителей для разделения Au, Pt, Pd и Rh. Некоторые из этих растворителей оказались удобными для качественного анализа элементов этой группы.

### РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Отделение Sc и Th от редкоземельных элементов Берсталь и сотрудники проводили с помощью системы тетрагидрофуран — вода — азотная кислота (уд. вес 1,42) (85 : 15 : 10) или системы метилацетат — вода — азотная кислота (85 : 10 : 5). Zr и Hf они разделяли, используя смесь эфира с азотной кислотой (87,5 : 12,5). В первом случае удается обнаружить 1  $\mu\text{g}$  Sc в 1000  $\mu\text{g}$  редкоземельных элементов. Разделение U, Th и Pr с помощью различных систем растворителей исследовал Сарма. Для разделения сернокислых солей редкоземельных элементов наилучшей системой оказалась смесь этилацетата с уксусной кислотой (1 : 3), для разделения хлоридов, нитратов и сульфатов — смесь эфира с концентрированной азотной кислотой (19 : 1 или 9 : 1) и смесь эфира с уксусной кислотой для разделения нитратов (7 : 3), нитратов и хлоридов (3 : 2), нитратов, хлоридов и сульфатов (1 : 1). Ледерер [7] осуществил разделение ряда редкоземельных элементов с помощью системы *n*-бутанол — ацетилацетон — уксусная кислота — вода (100 : 30 : 5 : 65) при температуре 60°. Все исследованные элементы Ледерер разделить не смог. Удалось разделить лишь ограниченное число элементов, составлявших небольшие группы, например La, Gd, Dy; Gd, Y; Ac, La, Y, Sc; Pr, Nd, Dy; Pr, Nd, Y; La, Sm, Er. Поллард и сотрудники [12] использовали для разделения редкоземельных элементов *n*-бутанол, насыщенный водой, в который добавляли различные количества уксусной кислоты и 8-оксихинолина или антипирина. Разделение проводилось как в колонках, так и на бумаге.

### НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ПРИМЕРЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Суши удалось осуществить хорошее разделение урана и тория при использовании системы метанол — пиридин — толуол (7 : 2 : 1), в которой  $\text{Th}^{4+}$  имел значение  $R_f$  0,16, а  $\text{UO}_2^{2+}$  0,86. В других смесях, которые были использованы Суши, также было получено хорошее разделение. Для отделения  $\text{Ge}^{4+}$  от  $\text{As}^{5+}$  и  $\text{As}^{3+}$  Ледерер [8] использовал *n*-бутанол, насыщенный 1 н. соляной кислотой. Он получил следующие значения  $R_f$ : 0,26 (Ge), 0,84 ( $\text{As}^{5+}$ ), 0,52 ( $\text{As}^{3+}$ ). Для разделения  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{In}^{3+}$ ,  $\text{Ge}^{4+}$  и  $\text{Ga}^{3+}$  Карвало и Ледерер использовали смесь, состоящую из *n*-бутанола, 3 н. соляной

кислоты и воды (10:3:7). Найденные для этих элементов величины  $R_f$  были соответственно равны 0,30; 0,40; 0,54; 0,27.

Осборн и Джевсберри при разделении Al и Be использовали *n*-бутанол, насыщенный соляной кислотой. В тех же условиях можно хорошо отделить Be и Al от редкоземельных элементов и циркония (Ледерер [4]). Арден и сотрудники [2] для разделения Al, Ga, In и Zn использовали смесь *n*-бутанола с соляной кислотой. Разделение Po, Bi и Pb было осуществлено Фрайерсоном и Джонсом с помощью системы бутанол — концентрированная соляная кислота — концентрированная серная кислота (60:12:1).

Стефанович и Джанич [1] установили, что с помощью хроматографии на бумаге можно разделять *цис-транс*-изомеры неорганических комплексных солей. При хроматографическом разделении *цис*- и *транс*-изомеров нитрата, хлорида (или йодида) динитроди-(этилендиамино)-кобальта *цис*-изомеры всегда имеют значительно большие значения  $R_f$ , чем *транс*-изомеры. Кроме того, было установлено, что с помощью хроматографии на бумаге можно разделять рацематы комплексных соединений на оптические изомеры, если к подвижной фазе прибавлять оптически активные вещества. Ледерер [12], занимавшийся хроматографическим разделением некоторых комплексов трехвалентного кобальта в различных системах растворителей, установил, что в органических растворителях с наибольшей скоростью перемещается наименее ионизированный комплекс. В воде же, наоборот, наиболее сильно ионизированный комплекс передвигается быстрее, чем одновалентные или нейтральные комплексы.

#### АНАЛИЗ НЕИЗВЕСТНОЙ СМЕСИ КАТИОНОВ

Поллард и сотрудники [7, 10, 11] пытались использовать хроматографию на бумаге для систематического качественного анализа неизвестных смесей с целью замены этим методом применяемого до настоящего времени классического сероводородного способа. Ими было предложено два варианта: 1) метод последовательного опрыскивания различными реактивами с использованием одной и той же подвижной фазы; 2) метод идентификации на основе значений  $R_f$  в трех различных системах растворителей. Второй метод, по мнению авторов, менее удобен, чем первый.

В первом случае в качестве подвижной фазы Поллард и сотрудники [7] использовали насыщенный 0,1 н. азотной кислотой *n*-бутанол с добавкой 0,5% бензоилацетона. Анализируемый образец растворяли в 2 н. азотной или в 2 н. соляной кислоте. В азотной кислоте растворяются также катионы первой аналитической группы, в то время как соляная кислота осаждает нерастворимые хлориды Ag, Pb и Hg<sup>+</sup>. Приготовленные таким образом растворы используют для получения хроматограмм. Хроматограммы получают тремя способами. Растворы, приготовленные этими тремя способами, обозначены в табл. 152 буквами X, Y и Z. Раствор образца в азотной кислоте обозначен буквой X, раствор в соляной кислоте — буквой Y. Буквой Z обозначена хроматограмма, приготовленная следующим образом. После нанесения раствора образца в соляной кислоте бумагу дважды опрыскивают щелочным раствором гипобромита натрия, затем высушивают и вновь дважды опрыскивают 2 н. уксусной кислотой. Обработка бумаги приводит к тому, что при хроматографировании Mn, Ni и Co остаются в виде нерастворимых гидроокисей на линии старта и не мешают проявлению 8-оксихинолином. Ход анализа показан в табл. 152.

[illegible]

Продолжение табл. 152

Хромато- грамма	Y <sup>+</sup> и Z <sup>+</sup>	Y и Z	Y	Y	Y <sup>+</sup> или Z <sup>+</sup>	Y <sup>+</sup>	Y	Y <sup>+</sup>	Y <sup>+</sup>	Y
Реактив	0,5%-ный раствор 8-оксихино- лина в 60%-ном этаноле+ NH <sub>3</sub> (флюо- ресценция в ультра- фиолетовом свете)	Ледяная уксусная кислота (слабое опрыскива- ние)	1) NH <sub>3</sub> 2) 0,1%-ный водный рас- твор родизо- ната натрия (свежепри- готовлен- ный)	Смесь 2 н. HCl и 2 н. CH <sub>3</sub> COOH (1 : 1)	1) 0,1%-ный раствор CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O в воде с до- бавкой 10% 2 н. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2) 2,7 г HgCl <sub>2</sub> и 3 г NH <sub>4</sub> SCN в 100 мл воды	0,02%-ный раствор хиналаза- рина в метаноле	Смесь 2 н. NaOH и 20%-ной H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 : 1)	1%-ный раствор галлането- фена в 2 н. NH <sub>4</sub> OH	Насыщен- ный раствор ацетата цинкурапи- ла в 1 н. уксусной кислоте (флуоресцен- ция в ультра- фиолето- вом свете)	Нитрат свинца-ко- бальта: по 5 г каждой соли рас- творяют в 100 мл воды, содержащей следы HNO <sub>3</sub> ; затем при- бавляют раз- бавленную HCl до мо- мента появ- ления осад- ка хлорида свинца
0,1 { 0,2 { 0,3 { 0,4 { 0,5 { 0,6 { 0,7 { 0,8 {	Al (з.) Ca (з.) Sr, Ba (син. з.) Mg (син. з.) Zn (ж.) Cd (ж.) Sn (ж.)	Al (з.) Zn (ж.) Sn (ж.)	Ba Sr } (кр.)	Ba (кр.)	Zn (син. ф.)	Al (ф.) Zn (ф. или ф. кр.)	Mg (син.)	Ba Sr Ca } (ф.)	Na (син. з.)	K (с. ч.)

Примечание. Знак \* обозначает, что был взят новый вид бумаги; X, Y и Z, не отмеченные знаком +, соответствуют хроматограммам, использо-  
ванным при предыдущем опрыскивании.

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Хроматография неорганических веществ на бумаге претерпела значительное развитие от качественного анализа к анализу полуколичественному и количественному. В принципе возможны два способа анализа после разделения смеси на бумаге. Анализ можно проводить непосредственно на бумаге (*in situ*) или же после элюирования или минерализации соответствующей части бумаги.

### АНАЛИЗ IN SITU

В этом случае определение элементов можно проводить либо путем простого измерения поверхности пятен (или зон), либо путем сравнения интенсивности окрашивания (или флуоресценции) визуальным или спектрофотометрическим способом, либо, наконец, путем титрования на бумаге. Все эти способы не вполне точны, и их следует считать лишь полуколичественными методами анализа, хотя некоторые авторы приводят в своих работах результаты, отличающиеся высокой точностью.

В последнее время появились новые модификации метода анализа, при котором измеряют поверхности пятен. Изменения, которые были введены в этот метод, направлены на повышение его точности. Бергамини и Версорезе, использовавшие для разделения метод круговой хроматографии, предложили определять так называемую общую оптическую плотность путем последовательного измерения плотностей отдельных зон с помощью денситометра. Большинство авторов, занимавшихся количественным анализом на бумаге, проводили спектрофотометрические или денситометрические измерения. Перед проведением этих измерений бумагу делали прозрачной путем ее пропитки парафиновым маслом или смесью парафинового масла с  $\alpha$ -бромнафталином. Для повышения точности анализа на никель с помощью рубеоноводородной кислоты Ваек [1] предложил измерять интенсивность отраженного света с помощью спектрофотометра Бекмана. Этот способ позволил ему определить содержание никеля в различных металлах и сплавах с высокой точностью.

Лакур и сотрудники [1, 8] использовали для анализа в основном непосредственное титрование на бумаге. Так,  $V^{5+}$  и  $Mo$  они определяли путем титрования азотнокислым свинцом. В качестве индикатора в этом случае был использован спиртовой раствор дифенилкарбазида. Точность анализа  $V^{5+}$  составляла  $\pm 4-5\%$ ,  $Mo$  —  $\pm 3,5\%$ .

### АНАЛИЗ ПОСЛЕ ЭЛЮИРОВАНИЯ ИЛИ МИНЕРАЛИЗАЦИИ

Анализ после элюирования или после минерализации более точен, особенно в тех случаях, когда элюат, полученный для чистой бумаги, используют в качестве стандартного раствора. Опубликовано большое число работ, посвященных анализу этого типа. В зависимости от цели анализа этот метод может иметь три модификации.

#### Определение одного катиона после отделения его от остальных

Для примера можно привести определение золота в присутствии ряда других катионов, осуществленное Кембером и Уэллсом [1]. Если в каче-

стве подвижной фазы использовать смесь этилацетата с водой и азотной кислотой (85:5:10), то Au будет лишь незначительно отставать от фронта растворителя, в то время как остальные катионы будут оставаться поблизости от линии старта. Количественный анализ Au после его вымывания из бумаги проводили колориметрически, используя для этой цели *n*-диметилбензилиденроданид. Поллард и сотрудники [13] для определения Mo в присутствии Co, Cu, Cr, Fe<sup>3+</sup>, Mn, Ni, UO<sub>2</sub> и V применяли в качестве подвижной фазы *n*-бутанол, насыщенный смесью 2 н. соляной и 2 н. азотной кислот, взятых в соотношении 1:1. После окончания элюирования Mo определяли колориметрическим способом. Для колориметрического анализа использовали хлорид олова и роданид калия (II 139).

Ряд исследователей занимались выделением урана и его анализом. Выбор подвижной фазы в этом случае осуществить сравнительно легко, поскольку хорошее отделение урана достигается при использовании практически всех эфирных смесей. По данным Ардена и сотрудников [2], а также Берсталла и Уэллса [2], наилучшие результаты получаются в том случае, когда в качестве подвижной фазы используют тетрагидросильван с 5% концентрированной азотной кислоты или тетрагидропиран с 7% концентрированной азотной кислоты (II 140). Конечное определение урана можно провести после элюирования или минерализации либо полярографическим методом, либо путем титрования сульфатом церия (Фрайерсон и сотрудники).

Интересный способ определения урана в присутствии других катионов предложили Зейлер и сотрудники [1]. В качестве растворителя была использована смесь 81 мл метилэтилкетона с 0,5 мл ацетилацетона, насыщенная 2 н. уксусной кислотой. После нанесения образца на бумагу к нему по каплям добавляют 0,004 мл 2 н. раствора углекислого натрия. Бумагу сушат на воздухе в течение 1 час, после чего проводят хроматографирование. В этих условиях по бумаге перемещается только катион урана, а остальные катионы остаются на линии старта. Количественное определение проводят путем простого измерения поверхности пятна после проявления.

При выделении одного элемента из смеси для его определения часто используют не совсем обычные подвижные фазы. Так, например, для определения мышьяка Поллард с сотрудниками [5] и Элбейн использовали *n*-бутанол, насыщенный водой, в которую были добавлены 1% тартрата аммония, 1% бората аммония и 0,5% маннита.

#### Одновременное определение нескольких катионов в смеси

Лакур и сотрудники [5] разработали метод одновременного определения Al, Fe и Ti с использованием нескольких систем растворителей. После элюирования Al определяли с помощью алюминона. Ti и Fe, образующие смешанную зону, определяли после элюирования в одном растворе с помощью тирона при pH 4,7. Железо имеет максимум поглощения при 560 мμ, а титан — при 410 мμ (II 141). В одной из работ, посвященных количественному хроматографическому анализу, Лакур и сотрудники [10] предложили использовать для определения Al, Fe и Ti листы бумаги треугольной формы. Такая форма бумаги выбрана для того, чтобы находящийся в избытке компонент образовывал зону в более широком месте.

Вендер определял K, Na, Ca и Mg в виде хлоридов. Для получения соответствующих катионов в виде их хлоридов анализируемый образец сжигали в присутствии серной кислоты, а затем пропускали его

через анионит, находящийся в  $\text{Cl}^-$ -форме. В качестве растворителя использовали смесь метанола и этанола (1:1). После элюирования определение катионов вели полярографическим методом (II 142). Для разделения Pt, Pd, Rh и Ir, которое трудно осуществить, Кембер и Уэллс [2] использовали комбинацию нескольких систем растворителей. Ввиду того что эти элементы мешают друг другу при анализе, было использовано три системы растворителей:

а) изобутилметилкетон — амиловый спирт — концентрированная соляная кислота (60:10:30);

б) *n*-бутанол, насыщенный 3 н. соляной кислотой;

в) система б с добавкой перекиси водорода.

При использовании системы а Rh, Pd и Pt образуют хорошо разделенные зоны. В присутствии Ir в этом случае образуется смешанная зона Ir с Rh. Поэтому систему а следует использовать при анализе смесей Rh, Pd, Pt и Ir, Pd, Pt. Систему б можно использовать для отделения всех четырех катионов от других металлов, а систему в — для отделения Ir от Rh. После хроматографирования бумагу разрезают на соответствующие части и проводят элюирование разбавленной соляной кислотой. Pt, Rh и Pd определяли колориметрически. Для определения Pt и Rh использовали хлористое олово, для определения Pd — тиогликолевую кислоту или *n*-нитрозодиметиланилин. Ir определяли путем титрования гидрохиноном; в качестве индикатора в этом случае использовали 3,3'-дихлорбензидин.

Метод определения Ca, Ba, Sr и Mg описан Поллардом и сотрудниками [8]. После разделения на бумаге Ca и Mg элюировали муравьиной кислотой или, как и в случае со Sr, осуществляли минерализацию соответствующей части бумаги. При определении Ba использовали только элюирование, поскольку после минерализации по неизвестным причинам получались худшие результаты.

Поллард и Мартин [1] для определения Ba, Sr и Ca после элюирования (или после минерализации) предложили использовать *o*-крезолфта-лейновый комплексон, а для определения Mg — эриохром черный Т. В качестве подвижной фазы они использовали систему метанол — изопропанол — муравьиная кислота — вода — муравьинокислый аммоний (50 мл:30 мл:2 мл:15 мл:2,5 г).

### Полярографический анализ после грубого хроматографического разделения

Льюис и Гриффитс, разработавшие способ определения урана с помощью комбинирования хроматографии на бумаге и полярографического метода, занимались еще двумя проблемами: 1) выделением некоторых металлов из смеси, например определением Co, Ni и Cu в образцах стали (II 143) и Cu и Co в пиритах; 2) выделением катионов из смеси в виде групп, содержащих катионы, которые могут быть определены полярографически без дальнейшего разделения.

Поиски пригодного электролита позволили сделать вывод, что чрезвычайно удобным электролитом является раствор салициловой кислоты с добавкой серной кислоты (рН около 2). Этот раствор может быть использован для определения металлов в нескольких группах: V, Mo, Ti; Fe, Cu, U; Bi, Sb, Pb, Cd. Железо мешает определению ванадия, молибден и висмут — определению меди, сурьма — определению урана, а титан — кадмия.

При использовании *n*-бутанола, насыщенного водой и содержащего соляную кислоту, все указанные элементы удается разделить на две группы: а) V, Cu, U, Pb, Ti и б) Fe, Mo, Bi, Sb, Cd. Каждая группа содержит практически только те катионы, которые не мешают друг другу при анализе, если в качестве электролита используют салициловую кислоту. Молибден, который нельзя определить одновременно с висмутом, с которым он остается в одной подгруппе, перед проведением полярографического анализа можно перевести в молибденовый синий, который будет выделяться при значительно более отрицательном потенциале (П 144).

Ni, Mn, Co, Fe и Cu хорошо разделяются в смеси ацетон — концентрированная соляная кислота — метил-*n*-пропилкетон (50:8:42). Общее время, необходимое для тщательного разделения катионов на полосе бумаги длиной 40 см, составляет около 6 час. Участки полосы бумаги, содержащие отдельные катионы, отрезают и озоляют. Полученную золу увлажняют концентрированной соляной или азотной кислотой, затем кислоту упаривают, а остаток переводят в раствор электролита. При полярографическом определении Ni используют 0,1 н. раствор хлорида калия, насыщенный растворимой в щелочах метилцеллюлозой; при определении Mn используют тот же электролит с добавкой 0,01% желатина; при определении Co — тот же электролит с добавкой 0,02% агара; при определении Cu — 10%-ный раствор натриевокалиевого тартрата; при определении Fe — 1 М раствор оксалата калия.

## Анионы

Анионам посвящено значительно меньшее число работ, чем катионам. Хроматографию на бумаге использовали в неорганическом анализе более целенаправленно и более широко для катионов, анализом же анионов занимались мало. Только для анализа фосфатов хроматография на бумаге оказалась незаменимым методом, а именно в случае разделения конденсированных фосфатов, а также при анализе малых количеств фосфатов в материалах растительного и животного происхождения. Принцип хроматографического разделения анионов тот же, что и для катионов. Однако если при хроматографическом разлении катионов в большинстве случаев применяют кислые подвижные фазы, то при хроматографическом разделении анионов чаще используют щелочные системы растворителей.

### Приготовление образцов

Приготовление образцов осуществляют точно так же, как и в случае катионов. Если мы имеем дело с материалом, который растворим в воде, разбавленной кислоте или основаниях, то этот материал достаточно растворить в соответствующем количестве и нанести его на бумагу. При анализе материала животного или растительного происхождения анализируемые образцы следует сплавить с содой. В этом случае образец сначала высушивают и взвешивают в фарфоровом тигле, затем плавят в течение приблизительно 3 час с 8-кратным количеством аналитически чистого карбоната натрия. Расплав кипятят с дистиллированной водой, а затем фильтруют. Для устранения большего количества катионов Линскенс

рекомендует использовать ионообменник, лучше всего — амберлит ИР120. К фильтрату растворенного расплава прибавляют 1,5-кратный избыток ионита (в расчете на карбонат натрия) и в течение 30 мин избалтывают эту смесь. Затем смолу отфильтровывают и промывают ее 2—3 раза водой. Фильтрат, полученный из разных операций, упаривают в фарфоровой чашке до малого объема. Упаривание ведут до тех пор, пока увлажненная сивяя лакмусовая бумажка не окрасится под действием паров в красный цвет. Затем упаренный раствор разбавляют до определенного объема водой.

Ямагути для концентрирования анионов высаживает их из раствора с помощью нитрата бария, ацетата цинка или нитрата серебра. Полученные осадки были нанесены на бумагу. В первом случае в качестве подвижной фазы следует использовать систему этилацетат — ацетон — 2 н. соляная кислота (1 : 2 : 1), во втором — систему метанол — 1 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1 : 1), а в третьем случае — смесь ацетона с 28%-ным  $\text{NH}_4\text{OH}$  (3 : 1).

Большей частью для разделения анионов использовали бумагу ватман 1 и 4, в некоторых случаях — бумагу фирмы «Шлейхер — Шульц». Предварительная очистка бумаги (главным образом при работе с фосфатами) безусловно необходима. Хейнс и Ишервуд рекомендуют промывать бумагу на воронке Бюхнера смесью, применяемой в качестве подвижной фазы. Эбел [4] использовал для промывания бумаги разбавленную соляную кислоту или щелочной раствор 8-оксихинолина. Уэстман и сотрудники с целью предварительной очистки бумаги промывали ее в течение нескольких дней 2 н. уксусной кислотой, а затем кислоту и образующиеся ацетаты удаляли водой. После этого бумагу помещали по меньшей мере на неделю в смесь ацетона с этанолом (1 : 1). Высушивали бумагу непосредственно перед ее употреблением.

## Проявление

Универсальный индикатор В. Д. Н., описанный Лонгом и сотрудниками, оказался хорошим универсальным реактивом для проявления. (табл. 153). Перед опрыскиванием бумаги этим индикатором его pH довели с помощью едкого натра до 9—10. Если подвижная фаза содержала аммиак, то пятна появлялись тотчас же, если же в подвижной фазе содержались другие органические основания, то пятна появлялись спустя определенное время. В присутствии катионов щелочных металлов пятна окрашены в синий цвет. Хорошим реактивом для проявления является и бромтимоловый синий, который используют в виде 0,1%-ного раствора в 50%-ном этаноле. После опрыскивания появляются синие пятна анионов на общем зеленом фоне. Поллард и сотрудники [7] для обнаружения ряда анионов использовали насыщенный раствор 1-нафтиламин-4-сульфокислоты в этаноле. В ультрафиолетовом свете пятна анионов темные. Аналогично реагируют галогены с азотнокислым серебром и флюоресцеином. Для обнаружения галогенов, роданидов, арсенитов, сульфидов, фосфатов и арсенатов можно с успехом использовать 2 н. раствор азотнокислого серебра; для определения галогенов последний лучше использовать в смеси с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (см. стр. 698). Для определения  $\text{CNS}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  и  $\text{I}^-$ , присутствующих на одной хроматограмме, Ледерер [2] проводил двойное опрыскивание хроматограммы. Сначала хроматограмму опрыскивали смесью 0,1 н. раствора  $\text{FeCl}_3$  с 3% перекиси водорода. Опрыскиванию подвергали участок бумаги, заключенный

Таблица 153

## НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫЕ МЕТОДЫ ПРОЯВЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ АНИОНОВ

Анион	Проявление	Окраска пятна
$F^-$	$Fe(CNS)_3$	Бесцветное на красном фоне
$Cl^-, Br^-, I^-$	(а) $AgNO_3$ , промывание $HNO_3$ , $H_2S$ б) $AgNO_3$ + флюоресцеин	Темно-коричневое—черное Темные пятна на флуоресцирующем фоне
$BrO_3^-, JO_3^-$	Дифениламин в конц. $H_3PO_4$	Зеленое
$ClO_3^-$	Дифениламин в конц. $HCl$	Синее
$S^{2-}$	$AgNO_3$	Черное
$PO_4^{3-}$	Подогретый раствор молибдата аммония и $HNO_3$ , $H_2S$	Синее
$CH_3COO^-, CO_3^{2-}$	Универсальный индикатор	Желтое или сине-зеленое на розовом фоне
$HCOO^-, (COO)_2^{2-}$	$KMnO_4$	Бесцветное на розовом фоне
$CNS^-$	$FeCl_3$ с $HCl$	Красное
$AsO_4^{3-}$	$AgNO_3$ (аммиачный раствор)	Коричневое
$Cr_2O_4^{2-}$	$AgNO_3$ (аммиачный раствор)	Красное
$As_2O_3^{3-}$	$AgNO_3$ (аммиачный раствор)	Желтое
$Fe(CN)_6^{4-}$	$FeCl_3$ в 2 н. $HCl$	Синее
$Fe(CN)_6^{3-}$	$Fe_2SO_4$ в 2 н. $HCl$	Синее
$S_2O_3^{2-}$	$K_2Cr_2O_7$ в 2 н. $H_2SO_4$	Белое или светло-зеленое на оранжевом фоне

Примечание. Реактивы, используемые для проявления, являются в основном 2 н. растворами.

между линией старта и точкой, отстоящей от линии старта на расстоянии 4 см.  $CNS^-$  дает красное, а  $I^-$  — синее окрашивание. В последнем случае окрашивание сравнительно быстро исчезает. Второе опрыскивание проводят 0,1 н. раствором азотнокислого серебра. В результате этого опрыскивания все анионы осаждаются в виде нерастворимых солей серебра. Затем для удаления избыточного количества серебра бумагу дважды промывают 0,1 н. азотной кислотой. После промывания бумагу подвергают действию сероводорода.

### Системы растворителей

В качестве подвижной фазы большей частью использовали спирты (этанол, *n*-пропанол, изопропанол, *n*-бутанол и *трет*-бутанол) или ацетон, к которому прибавляли какое-либо основание, например аммиак, пиридин, коллидин. Для разделения фосфатов использовали также кислые системы растворителей, содержащие соляную, муравьиную, трихлоруксусную и пикриновую кислоты. Ко всем системам прибавляли воду. Системы растворителей, использующиеся при разделении анионов, не так многочисленны, как при разделении катионов. Большинство изменений в системах растворителей связано лишь с изменением соотношений количеств отдельных составных частей.

Таблица 154

СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ ГАЛОГЕНОВ И  $\text{CNS}^-$ 

Системы растворителей	$R_f$					Автор
	F	Cl	Br	J	CNS	
<i>n</i> -Бутанол—1,5 н. $\text{NH}_4\text{OH}$ (1:1); восходящий метод . . . . .	0,0	0,10	0,16	0,30	0,45	Ледерер [2]
<i>n</i> -Бутанол—пиридин—1,5 н. $\text{NH}_4\text{OH}$ (2:1:2); нисходящий метод . . . . .	—	0,24	0,36	0,47	0,56	Поллард и со- трудники [6]
Ацетон с 20% $\text{H}_2\text{O}$ ; нисходящий метод . . . . .	0,25	0,50	0,61	0,77	—	Берсталь и со- трудники [1]
<i>n</i> -Бутанол—пиридин—вода— $\text{NH}_4\text{OH}$ (80:40:80:5); нисходящий метод . . . . .	0,12	0,15	0,28	0,50	0,55	Поллард и со- трудники [11]

Методы хроматографического разделения анионов в большинстве случаев имеют лишь качественный характер. Ввиду этого несущественно, какой метод используют для количественной оценки.

Ледерер [2] для разделения  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{J}^-$  и  $\text{CNS}^-$  использовал *n*-бутанол, насыщенный 1,5 н. раствором аммиака. Поллард и сотрудники [11] при разделении этих анионов отдавали предпочтение системе *n*-бутанол — пиридин—вода—аммиак (80:40:80:5). Из данных табл. 154 видно, что галогены разделяются хорошо и лишь роданиды и йодиды разделяются в некоторых случаях недостаточно четко. Если в смеси присутствует ион  $\text{F}^-$ , то наилучшей системой оказывается смесь ацетона с 20% воды или смесь пиридина с 10% воды.

Тейге для разделения галогенов использовал круги фильтровальной бумаги, которая была сначала пропитана 1 н. раствором азотнокислого серебра, а затем 15 н. раствором бихромата калия. После хроматографирования дистиллированной водой образуются зоны, хорошо отделенные друг от друга. Только в том случае, когда концентрация ионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{Br}^-$  намного меньше концентрации иона  $\text{J}^-$ , может произойти перекрывание зон  $\text{Cl}^-$  и  $\text{Br}^-$  зоной  $\text{J}^-$ .

Для разделения  $\text{JO}_4^-$ ,  $\text{JO}_3^-$ ,  $\text{BrO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  и  $\text{ClO}_3^-$  наиболее удобной оказалась система этанол — вода — 15 н. раствор аммиака (30:10:5). Поллард и сотрудники [11] добились хорошего разделения  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{BrO}_3^-$  и  $\text{JO}_3^-$  с помощью системы, применявшейся для разделения галогенидов.

Де-Лох и Дринкард для разделения ферроцианида, феррицианида, сульфида, арсенита, фосфата и йодида использовали систему, состоящую из *n*-бутанола, этанола и воды (2:2:1). Разделение проводили при температуре 30°. Найденные значения  $R_f$  соответственно составляли 0,12; 0,15; 0,16; 0,26; 0,37; 0,92.

Е. Ледерер и М. Ледерер осуществили разделение арсената, арсенита, хромата и феррицианида с помощью *n*-бутанола, насыщенного 20%-ным водным раствором уксусной кислоты. Арсенит передвигается с наибольшей скоростью ( $R_f$  0,41), за ним следуют хромат ( $R_f$  0,24), арсенат ( $R_f$  0,15) и феррицианид ( $R_f$  0,03).

Для разделения  $\text{SiO}_4^{2-}$ ,  $\text{BO}_3^{3-}$  и  $\text{MoO}_4^{2-}$  Лакур и сотрудники [4] использовали ацетон с добавкой 5% концентрированной соляной кислоты. Разделение проводили в атмосфере, насыщенной бутанолом с добавкой 5% концентрированной соляной кислоты. Быстрее передвигается  $\text{MoO}_4^{2-}$  ( $R_f$  0,96—1,0), затем  $\text{BO}_3^{3-}$  ( $R_f$  0,56—0,72).  $\text{SiO}_4^{2-}$  остается практически на линии старта.

Определение бора в минеральных водах было проведено Квентином, который в качестве подвижной фазы использовал смесь ацетона с концентрированной соляной кислотой (95:5). Для насыщения атмосферы хроматографической камеры он брал смесь *n*-пропанола с концентрированной соляной кислотой (95:5). Количественную оценку проводили колориметрическим методом после элюирования. Для колориметрического анализа использовали реакцию с карминовой кислотой.

Разделением  $\text{TcO}_4^-$  и  $\text{ReO}_4^-$ , а также отделением их от некоторых других анионов занимался Ледедер [11]. В этой работе он использовал радиоактивные изотопы:  $\text{Re}^{186}$  (время полураспада 92,8 час) и  $\text{Tc}^{99}$  (время полураспада 5,9 час). Ввиду небольшого времени полураспада технеция процесс хроматографирования вели только 4 час. В качестве подвижной фазы был использован *n*-бутанол, насыщенный 0,1 н. соляной кислотой (или 0,1 н. азотной кислотой, или 1,5 н. раствором аммиака). Было достигнуто хорошее отделение Re и Tc от  $\text{PO}_4^{3-}$  и  $\text{SO}_4^{2-}$ , а при использовании щелочной системы — от  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ,  $\text{TeO}_3^{2-}$  и  $\text{J}^-$ . Использование изотопа  $\text{Tc}^{97}$  с временем полураспада 90 дней позволяет лучше изучить хроматографическое поведение технеция. Использование изотопа  $\text{Tc}^{99}$  не позволяло проводить процесс хроматографирования в течение достаточного периода времени. Ввиду этого нельзя было получить правильного представления о возможности разделения.

### НЕОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ ФОСФОРА

Эбел и Вольмар разделяли на бумаге хроматографическим методом орто- и метафосфорные кислоты и полифосфаты. Анализ этих веществ трудно осуществить с помощью обычных химических методов. Это объясняется тем, что они весьма близки по своим химическим свойствам и обладают склонностью гидролизироваться в ортофосфаты. Метод хроматографии на бумаге позволяет разделить эти вещества при использовании кислой или щелочной подвижной фазы. При проявлении хроматограмму опрыскивали 5%-ным раствором молибдата аммония в 1 н. серной кислоте. Образовавшиеся комплексы восстанавливали хлоридом олова (II) или сероводородом до возникновения синего окрашивания.

В качестве органического компонента системы растворителей использовали этанол, изопропанол и *трет*-бутанол. Для создания кислой среды в подвижной фазе Уэстман и сотрудники применяли муравьиную, пикриновую и *n*-толуолсульфокислоту, для создания щелочной среды в подвижной фазе использовали аммиак и пиридин. Эбел и Вольмар [2] в качестве кислого компонента применяли трихлоруксусную и пикриновую кислоты, а в качестве щелочного — аммиак.

Для разделения смеси, содержащей фосфат натрия, пирофосфат натрия, триметафосфат натрия, трифосфат натрия, тетраметафосфат натрия и соль Грэхема, Эбель [1] рекомендует из кислых систем растворителей использовать систему изопропанол — вода — трихлоруксусная кислота — аммиак (22° Bé) (75 мл : 25 мл : 5 г : 0,3 мл). Применение этой системы

Таблица 155

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  РАЗЛИЧНЫХ ФОСФАТОВ  
(Эбел [1])

Подвижная фаза	орто-	пиро-	три-	три- мета-	тетра- мета-	Соль Грэхема
Щелочная а) . . . . .	0,36	0,31	0,29	0,52	0,41	0,0
Кислая б) . . . . .	0,71	0,53	0,35	0,22	0,16	0,0

а) Изопропанол—изобутанол—вода—аммиак (40 : 20 : 39 : 1).

б) Изопропанол—вода—трихлоруксусная кислота—аммиак (75 мл : 25 мл : 5 г : 0,3 мл).

позволяет хорошо разделить не менее четырех из шести указанных фосфатов (табл. 155). Из щелочных подвижных фаз Эбел [1, 2] считает наиболее подходящей для этого случая систему изопропанол — изобутанол — вода — аммиак (40:20:39:1). Эта система, однако, позволяет осуществить разделение лишь трех из приведенных выше шести фосфатов.

Хорошего разделения всех шести фосфатов можно добиться с помощью двумерной хроматографии, если в одном направлении использовать щелочную подвижную фазу, а во втором направлении — кислую подвижную фазу того же состава, что и при одномерной хроматографии.

Кроме качественного разделения, возможно также проведение быстрого и точного количественного анализа фосфатов. Для этого участок бумаги с пятном вырезают и подвергают минерализации в 60%-ной хлорной кислоте, в которую добавлена перекись водорода. Определение проводят спектрофотометрическим или колориметрическим способом. Для колориметрического анализа используют молибдат аммония, который восстанавливают в молибденовый синий.

Вольмар и сотрудники осуществили разделение гипофосфита, фосфита, пирофосфата, гипофосфата, фосфата и пирофосфата натрия. В качестве кислой системы они использовали смесь этанола, воды, трихлоруксусной кислоты и аммиака (80 мл : 20 мл : 5 г : 0,3 мл), в качестве щелочной системы — смесь этанола, изобутанола, воды и аммиака (30 : 30 : 39 : 1). Как видно из табл. 156, в этом случае наиболее пригодна щелочная под-

Таблица 156

ЗНАЧЕНИЯ  $R_f$  РАЗЛИЧНЫХ ФОСФОРНЫХ КИСЛОТ  
(Вольмар и сотрудники)

Подвижная фаза	$\text{NaH}_2\text{PO}_2$	$\text{NaH}_2\text{PO}_3$	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_5$	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_6$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
Кислая а) . . . . .	0,84	0,86	0,86	0,48	0,82	0,61
Щелочная б) . . . . .	0,75	0,49	0,66	0,39	0,21	0,29

а) Этанол—вода—трихлоруксусная кислота—аммиак (80 : 20 : 5 г : 0,3).

б) Этанол—изобутанол—вода—аммиак (30 : 30 : 39 : 1).

вижная фаза. С ее помощью удастся разделить не менее четырех производных из шести.

Применение двумерной хроматографии, при которой в первом направлении пропускают щелочную, а во втором — кислую систему (состав систем растворителей соответствует указанному выше), позволяет осуществить разделение пяти производных (кроме пирофосфита), а также триметафосфата, тетраметафосфата и соли Грэхема. Кроме того, кислая система пригодна для разделения арсенита и арсената, которые в щелочной системе дают смешанную зону.

Кроузер, занимавшийся разделением тех же смесей конденсированных фосфатов, которые изучал Эбел, большей частью использовал кислые системы растворителей, состоявшие из *трет*-бутанола, воды и муравьиной кислоты (80 : 20 : 5) или из изопропанола, воды и муравьиной кислоты (80 : 20 : 5). В качестве щелочной подвижной фазы он использовал систему *n*-пропанол — вода — концентрированный едкий натр (60 : 20 : 20). Хроматограмму опрыскивали кислым раствором молибдата и нагревали. Обнаружение проводили, рассматривая хроматограмму в ультрафиолетовом свете. В течение 1 мин происходило восстановление комплекса с образованием синего окрашивания. Этот метод проявления является более чувствительным, простым и удобным, чем метод, при котором восстановление осуществляется сероводородом.

Ледерер [9] изучал влияние различных катионов на поведение конденсированных фосфатов в процессе хроматографирования на бумаге. В качестве подвижной фазы Ледерер использовал в этом случае *n*-бутанол, насыщенный 1 н. соляной кислотой. Однако сомнительно, чтобы этот растворитель имел какие-либо преимущества, скорее даже наоборот. Большинство конденсированных фосфатов дает размытые пятна, а пирофосфат даже два пятна: одно пятно, принадлежащее пирофосфату, а второе — принадлежащее ортофосфату, образовавшемуся в результате гидролиза.

Андо и сотрудники для разделения орто-, мета- и пирофосфатов использовали *n*-бутанол. После хроматографирования проводили проявление с помощью кислого раствора молибдата аммония. После высушивания хроматограмму опрыскивали раствором бензидина в уксусной кислоте, а затем обрабатывали ее парами аммиака. Указанные фосфаты отличаются значениями  $R_f$  и цветом пятен: ортофосфат имеет  $R_f$  0,21 и дает синее окрашивание, пирофосфат —  $R_f$  0,15 и пурпурно-красное окрашивание, метафосфат остается на линии старта и дает синее окрашивание.

## Заключение

На первый взгляд казалось, что развитие таких физико-химических методов анализа, как искровая эмиссионная спектрография, полярография, спектральная фотометрия и др., не оставит места в области неорганического анализа для хроматографии на бумаге. Однако развитие этого метода показало его неоспоримые преимущества по сравнению с другими методами. Особенно эти преимущества сказываются при идентификации и определении следов неорганических веществ в различных материалах. В настоящее время опубликовано достаточное число работ, дающих конкретное подтверждение этих преимуществ. Хант и Уэллс пока-

зали удобство этого метода на примере анализа образцов почвы и определения Nb, Ta, Ni, Cu, Co и Pb на разрезанной бумаге. Достоинство этого метода в том, что он позволяет проводить анализ без особых затруднений непосредственно в полевых условиях. Чувствительность отдельных определений для указанных катионов составляет около 0,1 мкг. Хроматография на бумаге стала одним из стандартных методов оценки урановых руд. Доказательством ценности метода хроматографии на бумаге при анализе сплавов и руд явились работа Вентурелло и Ге [2], которые для быстрого определения типа сплавов использовали качественный анализ, работы Лакур [1, 3], Дэвиса, Вентурелло и Ге [1, 4], Ваека [1, 2], Накано и др., занимавшихся определением отдельных металлов в сплавах и рудах.

Развитие методик привело к устранению многих ошибок, которые ограничивали применение этого метода. Благодаря незначительному количеству вещества, необходимому для анализа, и высокой чувствительности анализа преимущества хроматографии на бумаге становятся особенно очевидными. Для окончательного определения элементов используют методы, широко применяемые в неорганическом анализе. Следовательно, единственным источником возможных ошибок являются потери при элюировании (или минерализации). Кажущаяся медлительность при разделении (главным образом при использовании высших спиртов) вознаграждается возможностью одновременного получения большего числа хроматограмм.

Кроме того, хроматография неорганических веществ на бумаге дала хороший, быстрый и надежный метод проведения систематического анализа. Лучшим доказательством этого являются работы Полларда в этой области. Полученные им результаты были проверены в ряде работ. Результаты изучения конденсированных фосфатов методом хроматографии на бумаге имели большое значение не только для аналитической химии, но в ряде случаев и для синтетической химии, биологии и медицины.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Almássy G., Nagy Z., Acta chim. Acad. Sci. hung., 7, 325 (1955). [1]  
 Almássy G., Straub J., Magyar kém. Folyóirat, 60, 104 (1954). [2]  
 Anderson J. R. A., Whitley A., Anal. chim. Acta, 6, 517 (1952).  
 Ando T., Ito J., Ishi S., Soda T., Bull. chem. Soc. Japan, 25, 78 (1952).  
 Arden T. V., Burstall F. H., Davies G. R., Lewis J. A., Linstead R. P., Nature, 162, 691 (1948). [1]  
 Arden T. V., Burstall F. H., Linstead R. P., J. Chem. Soc., 1949, 311. [2]  
 Barnabas T., Barnabas J., Naturwissenschaften, 42, 15 (1955). [1]  
 Barnabas T., Badve M. G., Barnabas J., Naturwissenschaften, 41, 478 (1954). [2]  
 Barnabas T., Badve M. G., Barnabas J., Anal. chim. Acta, 12, 542 (1955). [3]  
 Berg E. W., McIntyre R. T., Anal. Chem., 28, 813 (1954); 27, 195 (1955). [1]  
 Berg E. W., Strassen J. E., Anal. Chem., 27, 127 (1955). [2]  
 Berg E. W., Strassen J. E., Anal. Chem., 27, 1131 (1955). [3]  
 Bergamini C., Versorese W., Anal. chim. Acta, 10, 328 (1954).  
 Burma D. P., Analyst, 77, 382 (1952). [1]  
 Burma D. P., Anal. chim. Acta, 9, 513 (1953). [2]  
 Burstall F. H., Davies G. R., Linstead R. P., Wells R. A., J. Chem. Soc., 1950, 516. [1]  
 Burstall F. H., Wells R. A., Analyst, 76, 396 (1951). [2]

- Candela M. J., Hewitt E. J., Stevens H. M., *Anal. chim. Acta*, **14**, 66 (1956).
- Carleson G., *Acta chem. Scand.*, **8**, 1673 (1954).
- Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944).
- Crowther J., *Anal. Chem.*, **26**, 1383 (1954); *Nature*, **173**, 486 (1954).
- Davies R. L., *Nature*, **168**, 834 (1951).
- De Carvalho R. G., Lederer M., *Anal. chim. Acta*, **5**, 191 (1951).
- De Loach W. S., Drinkard C., *J. chem. Educ.*, **28**, 461 (1951).
- de Vries G., Van Dalen E., *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, **73**, 1028 (1954).
- Ebel J. P., *Bull. Soc. chim. France*, 1953, 991; *Mikrochim. Acta*, **6**, 679 (1954). [1]
- Ebel J. P., Volmar Y., *Compt. rend.*, **233**, 415 (1951); **234**, 621, 732 (1952). [2]
- Elbein I. I. M., *Chemist Analyst*, **44**, 20 (1955).
- Елисеева Г. Д., *Труды Комиссии анал. химии*, **6**, 439 (1955).
- Erlenmeyer H., von Hahn H., Sorkin E., *Helv. chim. Acta*, **34**, 1419 (1951).
- Fernando Q., De Silva M. D., *Analyst*, **79**, 911 (1954). [1]
- Fernando Q., Phillips J. P., *Anal. Chem.*, **25**, 819 (1953). [2]
- Fischer E., Schmidmer E., *Ann.*, **272**, 156 (1893).
- Fischer H., *Wiss. Veröff. Siemens-Konzern*, **4**, 158 (1925); *Angew. Chem.*, **46**, 442 (1933); **47**, 685 (1934).
- Flood H., *Tidsskr. Kjem. Bergves.*, **17**, 178 (1937); **20**, 111 (1940); **3**, 9 (1943). [1]
- Flood H., Lorås V., *Tidsskr. Kjem. Bergves.*, **4**, 35 (1944); **5**, 83 (1945). [2]
- Frierson W. J., Jones J. W., *Anal. Chem.*, **23**, 1447 (1951). [1]
- Frierson W. J., Thomason P. F., Raaen H. P., *Anal. Chem.*, **26**, 1210 (1954). [2]
- Chakrabarti S., Burma D. P., *Science and Culture*, **16**, 485 (1951).
- Chalkley D. E., Williams R. J. P., *J. Chem. Soc.*, **1954**, 1718.
- Goppelsröder F., *Capillaranalyse beruhend auf Capillaritäts und Adsorptionsercheinungen mit dem Schlusskapitel: Das Emporsteigen der Farbstoffe in den Pflanzen*. E. Birkhäuser, Basel, 1901.
- Gordon H. T., Hewel C. A., *Anal. Chem.*, **27**, 1471 (1955).
- Goto H., Kakita Y., *J. chem. Soc. Japan*, **63**, 120 (1942).
- Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature*, **164**, 1107 (1948).
- Harasawa S., *J. chem. Soc. Japan*, **72**, 107, 236, 423 (1951).
- Hartkamp H., Specker H., *Naturwissenschaften*, **42**, 534 (1955).
- Hopf P. P., *J. chem. Soc.*, **1946**, 785.
- Hunt E. C., Wells R. A., *Analyst*, **79**, 351 (1954).
- Irving H. M., *Quart. Rev. chem. Soc.*, **5**, 200 (1951).
- Какаџ В., неопубликованные результаты.
- Kember R. F., Wells R. A., *Analyst*, **76**, 579 (1951). [1]
- Kember R. F., Wells R. A., *Analyst*, **80**, 735 (1955). [2]
- Körbl J., Příbil R., *Chem. Listy*, **51**, 1061 (1957).
- Кузнецов В. И., *Успехи химии*, **23**, 654 (1954).
- Lacourt A., *Ind. chim. Belge*, **20**, 267, 399 (1955). [1]
- Lacourt A., *Mikrochim. Acta*, **1955**, 824. [2]
- Lacourt A., Heyndrickx P., *Mikrochim. Acta*, **1955**, 61. [3]
- Lacourt A., Sommereyns G., Claret M., *Mikrochem. mikrochim. Acta*, **38**, 444 (1951). [4]
- Lacourt A., Sommereyns G., De Geyndt E., *Mikrochem. mikrochim. Acta*, **36—37**, 312 (1951). [5]
- Lacourt A., Sommereyns G., De Geyndt E., Baruh J., Gillard J., *Nature*, **163**, 999 (1949). [6]
- Lacourt A., Sommereyns G., De Geyndt E., Jacquet O., *Mikrochem. mikrochim. Acta*, **36—37**, 117 (1951). [7]
- Lacourt A., Sommereyns G., Soete J., *Mikrochem. mikrochim. Acta*, **38**, 348 (1951). [8]
- Lacourt A., Sommereyns G., Stadler-Denis A., Wantier G., *Mikrochem. mikrochim. Acta*, **40**, 268 (1953). [9]
- Lacourt A., Sommereyns G., Wantier G., *Analyst*, **77**, 943 (1952). [10]
- Ladenbauer I. M., Bradacs L. K., Hecht F., *Mikrochem. mikrochim. Acta*, **1954**, 388, 397.
- Langer A., *Anal. Chem.*, **28**, 426 (1956).
- Laskowski D. E., McCrone W. C., *Anal. Chem.*, **23**, 1579 (1951).
- Lederer E., Lederer M., *Chromatography. A Review of Principles and Applications*, Elsevier, 1954.

- Lederer M., Nature, 162, 776 (1948). [1]
- Lederer M., Australian J. Sci., 11, 174 (1949); Science, 110, 115 (1949). [2]
- Lederer M., Nature, 163, 598 (1949). [3]
- Lederer M., Anal. chim. Acta, 5, 185 (1951). [4]
- Lederer M., Progrès récents de la chromatographie, II, Chimie minérale, Hermann & Cie, Paris, 1952. [5]
- Lederer M., Anal. chim. Acta, 8, 259 (1953). [6]
- Lederer M., Compt. rend., 236, 1557 (1953). [7]
- Lederer M., Anal. chim. Acta, 11, 132 (1954). [8]
- Lederer M., Anal. chim. Acta, 11, 524 (1954). [9]
- Lederer M., Anal. chim. Acta, 12, 142 (1955). [10]
- Lederer M., Anal. chim. Acta, 12, 146 (1955). [11]
- Lederer M., Anal. chim. Acta, 13, 350 (1955). [12]
- Lewis J. A., Griffiths J. M., Analyst, 76, 388 (1951).
- Linskens H. F., Papierchromatographie in der Botanik, Springer, 1955.
- Long A. G., Quayle J. R., Stedman R. J., J. Chem. Soc., 1951, 470.
- Macek K., Morávek L., Nature, 178, 102 (1956).
- Magee R. J., Headridge J. B., Analyst, 80, 785 (1955).
- Martin A. J. P., Syngé R. L. M., Biochem. J., 35, 1358 (1941).
- Murthy Vasudeva A. R., Narayan V. A., Naturwissenschaften, 42, 439 (1955). [1]
- Murthy Vasudeva A. R., Narayan V. A., Rao M. R. A., Curr. Sci., 24, 158 (1955). [2]
- Nakano S., J. Chem. Soc., Japan, 72, 962 (1951); 75, 509 (1954).
- Nicholas D. J. D., Stevens H. M., Nature, 176, 1066 (1955).
- Oka Y., Murata A., J. chem. Soc., Japan, 72, 657 (1951).
- Osborne G. H., Jewsbury A., Nature, 164, 443 (1949).
- Otosai K., Kagaku no Ryōiki, 4, 411 (1951); см. также Kumé S., Otosai K., Watanabé H., Nature, 166, 1076 (1950).
- Pickering W. F., Anal. chim. Acta, 8, 344 (1953). [1]
- Pickering W. F., Jacobs E. B., Anal. chim. Acta, 12, 436 (1955). [2]
- Pollard F. H., Martin J. V., Analyst, 81, 348 (1956). [1]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Chromatographic Methods of Inorganic Analysis. Butterworths Sci. Public., London, 1953. [2]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Banister A. J., Chem. & Industry, 1955, 1598. [3]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Elbeih I. I. M., Nature, 163, 292 (1949). [4]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Elbeih I. I. M., Disc. Faraday Soc., No. 7, 183 (1949). [5]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Elbein I. I. M., J. Chem. Soc., 1951, 466. [6]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Elbein I. I. M., J. Chem. Soc., 1951, 470. [7]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Martin J. V., Analyst, 81, 353 (1956). [8]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Martin J. V., Hardy C. J., J. Chem. Soc., 1955, 4332. [9]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Stevens H. M., J. Chem. Soc., 1951, 771, 1863. [10]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Stevens H. M., School Sci. Rev., 34, 21 (1952). [11]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Stevens H. M., J. Chem. Soc., 1952, 4730; 1954, 3435. [12]
- Pollard F. H., McOmie J. F. W., Stevens H. M., Maddock J. G., J. Chem. Soc., 1953, 1388. [13]
- Quentin K. E., Z. Lebensmittel. Unters.-Forsch., 95, 305 (1952).
- Rao C. L., Shankar J., Anal. chim. Acta, 8, 491 (1953).
- Reeves W. A., Crumpler T. B., Anal. Chem., 23, 1576 (1951).
- Runge F. F., Der Bildungstrieb der Stoffe. Veranschaulicht in selbständig gewachsenen Bildern, Oranienburg, 1855.
- Sakaguchi T., Yasuda H., J. pharm. Soc. Japan, 71, 1469 (1951).
- Sarma B., Trans. Bose Res. Inst. Calcutta, Biol. Phys. Res., 18, 105 (1949—1951).
- Seiler H., Schuster M., Erlenmeyer H., Helv. chim. Acta, 37, 1252 (1954). [1]
- Seiler H., Sorkin E., Erlenmeyer H., Helv. chim. Acta, 35, 120 (1952). [2]
- Shibata M. Bull. Tokyo Inst. Technol. B., 1953, 73.

- Schoenbein C. F., *Verhandl. Naturforsch. Ges. Basel*, **3**, 249 (1861); **4**, č. 1 (1864).
- Schwab G. M., Dattler G., *Angew. Chemie*, **50**, 691 (1937). [1]
- Schwab G. M., Jockers K., *Naturwissenschaften*, **25**, 44 (1937). [2]
- Sommer G., *Z. anal. Chem.*, **147**, 241 (1955).
- Steel A. E., *Nature*, **173**, 315 (1954).
- Stefanović G., Janjić T., *Anal. chim. Acta*, **11**, 550 (1954). [1]
- Stefanović G., Janjić T., Crnojević R., *Bull. Soc. chim. Belgrade*, **20**, 343 (1955). [2]
- Suchý K., *Chem. Listy*, **48**, 1084 (1954).
- Surak J. G., Martinovich R. J., *J. chem. Educ.*, **32**, 95 (1955).
- Teige K., *Věst. Král. české společnosti nauk, Tř. mat.-přírod.*, **5**, 1 (1949).
- Tewari S. N., *Z. anal. Chem.*, **141**, 401 (1954).
- Vaeck S. V., *Anal. chim. Acta*, **10**, 48 (1954); *Nature*, **173**, 213 (1953). [1]
- Vaeck S. V., *Anal. chim. Acta*, **12**, 443 (1955). [2]
- Vender M., *Chem. Listy*, **49**, 771 (1955).
- Venturello G., Ghe A. M., *Anal. chim. Acta*, **7**, 261 (1952). [1]
- Venturello G., Ghe A. M., *Anal. chim. Acta*, **7**, 268 (1952). [2]
- Venturello G., Ghe A. M., *Anal. chim. Acta*, **10**, 335 (1954). [3]
- Venturello G., Ghe A. M., *Ann. Chim. Roma*, **44**, 960 (1954). [4]
- Volmar Y., Ebel J. P., Bassilli Fanzi Y., *Bull. Soc. chim. France*, **1953**, 1085.
- Walker W. R., Lederer M., *Anal. chim. Acta*, **5**, 191 (1951).
- Weiss A., Fallab S., *Helv. chim. Acta*, **37**, 1253 (1954).
- Westman A. E. R., Scott A. E., Pedley J. T., *Chem. Can.*, **4**, 189 (1952).
- Yamaguchi K., *J. pharm. Soc. Japan*, **74**, 1276 (1954).

# ***МЕТОДИКИ***



# ПРОЯВЛЯЮЩИЕ РЕАКТИВЫ (Д)

---

Составил К. Мацек

## РЕАКТИВЫ ОБЩЕГО ЗНАЧЕНИЯ

### Д 1. Серная кислота

Хроматограмму помещают на стеклянную пластинку, смоченную концентрированной серной кислотой, после чего добавляют еще несколько капель серной кислоты, которые растирают стеклянной пробкой. Обработанную серной кислотой хроматограмму можно также быстро закрыть другой стеклянной пластинкой. Хроматограмму просматривают в видимом и ультрафиолетовом свете. Реагируют стероиды, алкалоиды и ряд других соединений.

### Д 2. Йод

- а) Хроматограмму быстро погружают в 0,3%-ный раствор йода в 5%-ном йодистом калии, затем промывают в течение нескольких минут водой до полного обесцвечивания фона. Метод применяется для анализа соединений, плохо растворяющихся в воде.
- б) Хроматограмму на несколько минут помещают в закрытый сосуд, на дне которого находятся кристаллики йода. Этот способ рекомендуется для определения стероидов, алкалоидов и многих других соединений. Особенно интенсивный тон окраски дают четвертичные аммонийные и сульфониевые соли, такие, как холин и тиамин.

### Д 3. Перманганат калия

- а) *Кислый раствор*: 0,03—0,15 н. раствор перманганата калия подкисляют серной кислотой с таким расчетом, чтобы конечная концентрация серной кислоты не превышала 0,06—0,3 н. После обработки хроматограммы данным раствором появляются желтые или белые пятна на фиолетовом фоне. Этим методом можно определять многие органические соединения.
- б) *Щелочной раствор*: 1%-ный раствор перманганата калия смешивают с 2%-ным раствором углекислого натрия в соотношении 1:1. После опрыскивания хроматограммы приготовленным раствором

сразу же появляются желтые пятна на фиолетовом фоне, которые через 1 мин приобретают коричневый цвет. По этой причине пятна необходимо тотчас же очертить. Промывая хроматограмму водой, можно получить коричневые пятна на белом фоне. Этим способом можно определять все восстанавливающие соединения, а также соединения с двойной связью.

#### Д 4. Азотнокислое серебро

- а) 0,1 н. раствор азотнокислого серебра смешивают с 5 н. водным аммиаком в соотношении 1 : 1. В зависимости от характера анализируемых соединений хроматограмму обрабатывают этим раствором или при комнатной температуре, или нагревают в течение 5—10 мин до 105°. Соединения, восстанавливающие аммиачный раствор азотнокислого серебра, проявляются в виде коричневых пятен.
- б) Хроматограмму протягивают через раствор, который готовят смешиванием 0,1 мл водного насыщенного раствора азотнокислого серебра с 20 мл ацетона, содержащего каплю воды. Хроматограмму сушат и опрыскивают раствором едкого натра (насыщенный водный раствор едкого натра разбавляют метанолом до 0,5 н. концентрации). Тотчас же после обработки появляются коричневые пятна серебра. Некоторые «невосстанавливающие» соединения требуют кратковременного нагревания.
- в) Опрыскивание проводят 5%-ным раствором азотнокислого серебра в 25%-ном водном аммиаке (9 : 1). В данном случае реагируют даже некоторые «невосстанавливающие» гликоли.
- г) Хроматограмму опрыскивают 0,1 н. раствором азотнокислого серебра в смеси с 5 н. аммиаком и 2 н. едким натром (1 : 1 : 2). Этот способ определения можно применять даже для некоторых «невосстанавливающих» спиртов.

Хроматограмму необходимо предохранять от действия солнечного света или лучше всего отмыть избыток реактива раствором аммиака (6 н.) и закрепителем (25 г тиосульфата аммония и 15 г алюмоаммиачных квасцов в 1,5 л воды), а затем — водой. Анализу мешает присутствие галогенов и некоторых органических кислот.

#### Д 5. Трифенилтетразолий хлористый (ТТХ) или синий тетразолий (см. стр. 320)

- а) 2%-ный водный раствор ТТХ перед использованием смешивают с 1 н. едким натром (1 : 1).
- б) 0,5%-ный раствор ТТХ смешивают с 10%- или 20%-ным раствором едкого натра в 60%-ном метаноле (1 : 3).  
Приготовленный реактив применяют при комнатной или несколько повышенной температуре, лучше всего в темноте. После окончания реакции, когда появляются красные пятна на белом фоне, избыток реактива можно отмыть водой или нейтрализовать едкий натр, погружая хроматограмму на несколько минут в 0,5 н. серную кислоту. Этим способом анализируют соединения, содержащие восстанавливающие группы. Реактив, находящийся вне пятен (фон бумаги), восстанавливается на свету.

#### Д 6. Бромфеноловый синий и индикаторы аналогичного типа

Хроматограмму, тщательно очищенную от остатков кислот или щелочей из систем растворителей, опрыскивают 0,05%-ным рас-

твором индикатора (бромфеноловый синий, бромтимоловый синий, бромкрезоловый зеленый и т. п.) в этаноле. Значение pH раствора, применяемого для определения веществ кислого характера, устанавливают с помощью буферной смеси в пределах 7—8. Для определения оснований или солей в случае применения щелочных систем pH либо не устанавливают, либо слегка снижают. Кислые соединения проявляются в виде желтых пятен на синем или зеленом фоне. В случае соединений основного характера наблюдается обратная картина.

#### Д 7. Хлорирование соединений с активным атомом водорода при азоте

- а) Хроматограмму необходимо тщательно очистить от остатка растворителя путем сушки при температуре 60° (2 часа). Затем хроматограмму помещают в стеклянный цилиндр и подвергают в течение 10 мин действию хлора ( $\text{KMnO}_4 + \text{HCl}$ ). Хлор удаляют током воздуха (минимум 30 мин). Затем хроматограмму опрыскивают смесью равных объемов 1%-ных растворов йодистого калия и крахмала. Соединения с активным атомом водорода при азоте проявляются в виде синих пятен.
- б) Сухую хроматограмму увлажняют смесью этанол — ацетон (1:1). Избыток растворителя отжимают между листами фильтровальной бумаги, после чего хроматограмму помещают в атмосферу хлора (0,1 н.  $\text{KMnO}_4$  — 10%-ная  $\text{HCl}$ , 1:1) на 5 мин. После обработки хлором хроматограмму тотчас же погружают в смесь равных объемов 0,05 н. раствора йодистого калия и насыщенного раствора о-толидина в 2%-ной уксусной кислоте (или 5 частей насыщенного раствора бензида и 1 часть 0,05 н. раствора йодистого калия) и выдерживают в этой смеси в течение 1—2 мин. до образования максимально окрашенных пятен. Бензидин, которым также можно опрыскивать хроматограмму, действует более длительный период. Хроматограмму следует дважды промыть 2%-ным раствором уксусной кислоты. Избыток кислоты отсасывают и хроматограмму сушат на воздухе. С о-толидином окраска более интенсивна, хотя с бензидином она более устойчива.

### СПИРТЫ

#### Д 8. 1-Нафтиламин

Хроматограмму опрыскивают 1%-ным этанольным раствором 1-нафтиламина. При этом 3,5-динитробензоаты дают коричнево-красное окрашивание. Интенсивность окраски повышается путем дополнительного опрыскивания хроматограммы 10%-ным раствором едкого кали.

#### Д 9. Диэтиловый эфир малоновой кислоты

Хроматограмму опрыскивают сначала 10%-ным этанольным раствором диэтилового эфира малоновой кислоты, а затем сразу же 10%-ным водным раствором едкого натра. После нагревания хроматограммы в течение 5 мин в сушильном шкафу 3,5-динитробензоаты проявляются в виде красно-фиолетовых пятен.

**Д 10. Ацетоуксусный эфир**

Хроматограмму опрыскивают 1 н. раствором едкого натра, а затем ацетоуксусным эфиром. При этом 3,6-динитрофталаты спиртов дают оранжевое (вплоть до красного) окрашивание.

**Д 11. Реактив Гроте**

0,5 г нитропрусида натрия растворяют в 10 мл воды, добавляют 0,5 г солянокислого гидроксилamina и 1 г бикарбоната натрия. Затем к раствору добавляют 2 капли брома и для удаления избытка брома раствор нагревают или продувают воздух. Раствор фильтруют и разбавляют до объема 25 мл. Для опрыскивания хроматограммы иногда рекомендуется разбавить раствор насыщенным раствором соды в соотношении 1:1. Реактив применяют для открытия ксантогенатов, тиогидантоинов и тиомочевины.

**АЛЬДЕГИДЫ И КЕТОНЫ****Д 12. Этилат натрия**

0,3 г металлического натрия растворяют в 100 мл этанола. Реактив применяют для увеличения интенсивности окраски 2,4-динитрофенилгидразонов.

**АЛИФАТИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ****Д 13. Метиловый красный и бромтимоловый синий**

200 мг метилового красного и 200 мг бромтимолового синего растворяют в смеси 100 мл 40%-ного формальдегида и 400 мл этанола. Затем 0,1 н. раствором едкого натра доводят pH до 5,2. При повторном опрыскивании хроматограммы этим раствором аммонийные соли кислот проявляются в виде желтых пятен на розовом фоне. После обработки парами аммиака образуются оранжевые пятна на темно-зеленом фоне.

**Д 14. Хлорное железо**

Гидроксамовые кислоты проявляют опрыскиванием хроматограммы 10%-ным раствором хлорного железа. При этом образуются пятна красного цвета на желтом фоне. Окраска устойчива в течение недели.

**Д 15. Образование медных мыл**

Хроматограмму помещают на 45 мин в раствор уксуснокислой меди (II) [10 мл насыщенного водного раствора уксуснокислой меди (II) смешивают с 240 мл дистиллированной воды]. После отмывания избытка уксуснокислой меди в проточной воде в течение 1 часа хроматограмму помещают на 5 мин в разбавленный раствор ферроцианида калия (50 мл 7,5%-ного водного раствора ферроцианида калия смешивают с 250 мл дистиллированной воды). При этом пятна медных мыл кислот окрашиваются в интенсивный темно-красный цвет. Фон остается светло-желтым или светло-красным.

**Д 16. Родамин В**

Хроматограмму погружают в 0,5 %-ный водный раствор родамина В и затем высушивают на воздухе. При этом насыщенные, ненасыщенные и бромированные кислоты дают белые пятна на красном фоне, а в ультрафиолетовом свете — синие пятна на красном фоне. Аналогично реагируют и высшие алифатические спирты.

**Д 17. Азотнокислое серебро и эриохромцианин**

Хроматограмму помещают на 1 мин в 5 %-ный водный раствор азотнокислого серебра, затем вынимают, дают стечь избытку реактива, дважды погружают в 0,5 %-ный водный раствор эриохромцианина, промывают дистиллированной водой и высушивают в течение 10 мин при 150°. При этом галоидсодержащие кислоты дают желтое окрашивание, а насыщенные кислоты — темно-коричневое. Чувствительность реакции около 10 мкг.

**Д 18. Дифенилкарбазон**

Хроматограмму высушивают в течение 30 мин при 80° в темноте. Если для разделения использовать систему диэтиленгликоль — уксусная кислота — тетралин, то хроматограмму необходимо перед высушиванием промыть водой. Затем хроматограмму опрыскивают 0,2 %-ным раствором дифенилкарбазона в этаноле. Аддукты ненасыщенных кислот окрашиваются в пурпурный или сине-пурпурный цвет. Эта окраска становится более интенсивной при последующем опрыскивании хроматограммы 0,05 н. раствором азотной кислоты в этаноле.

**Д 19. α-Декстрин — йод**

Хроматограмму опрыскивают 1 %-ным раствором α-декстрина в 30 %-ном этаноле, сушат на воздухе, а затем на 1 час помещают во влажную камеру при комнатной температуре. При действии на хроматограмму паров йода моноглицериды проявляются в виде белых пятен на фиолетовом фоне. При длительном воздействии паров йода белые пятна ненасыщенных веществ становятся коричневыми или желтыми. По истечении нескольких дней окраска исчезает, но ее можно восстановить воздействием паров йода. Чувствительность этого метода проявления около 20 мкг.

**Д 20. Панкреатин**

Хроматограмму опрыскивают 1 %-ным водным раствором панкреатина, инкубируют в течение 24 час во влажной камере при 37° и высушивают на воздухе. Затем хроматограмму проявляют реактивом Д 19. Реагируют ди- и триглицериды в количестве более 200 мкг.

**Д 21. Тетраацетат свинца**

Хроматограмму опрыскивают 1 %-ным раствором тетраацетата свинца в безводном бензоле. Моноглицериды и невосстанавливающие сахара проявляются в виде белых пятен на коричневом фоне. Чувствительность реакции 50—100 мкг.

**Д 22. Фосфорномолибденовая кислота**

- а) Хроматограмму погружают в 1 %-ный раствор фосфорномолибденовой кислоты в смеси этанола и хлороформа в соотношении 1:1,

а затем промывают в течение 15 мин в проточной воде. После погружения хроматограммы в 1%-ный раствор хлористого олова в 3 н. соляной кислоте фосфолипиды проявляются в виде синих пятен; с этим реактивом также реагируют третичные амины и четвертичные азотсодержащие основания; кефалины с ним взаимодействуют слабо.

- б) Хроматограмму опрыскивают 10%-ным этанольным раствором фосфорномолибденовой кислоты и затем нагревают в течение 5 мин при 90°. Желчные кислоты дают синюю окраску на зелено-желтом фоне. Чувствительность реакции 1—2 мкг.

#### Д 23. Реактив Шиффа

1 г парафуксина растворяют в 700 мл воды и 50 мл 2 н. соляной кислоты. Затем к раствору прибавляют 4,57 г пиросульфата натрия, после чего объем раствора доводят добавлением воды до 1 л. Реактив при перемешивании обесцвечивается в течение 24 час. Высушенную хроматограмму помещают на 10 мин в раствор реактива, предварительно добавив к нему 1%  $\text{HgCl}_2$ . С окрашенной хроматограммы избыток красителя удаляют длительным (в течение нескольких часов) промыванием 1%-ным водным раствором пиросульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), который в процессе промывания меняют 2—3 раза. Затем хроматограмму быстро промывают в проточной воде. Этим реактивом фосфолипиды проявляются в виде красно-фиолетовых пятен на белом фоне.

#### Д 24. Азотнокислое серебро — фенол

Хроматограмму высушивают в сушильном шкафу в течение 5 мин при 105—110°, опрыскивают 0,1 н. раствором азотнокислого серебра и повторно высушивают при той же температуре. При этом восстанавливающие кислоты дают пятна коричневого цвета или пятна белого цвета на бледно-желтом фоне. Затем полностью высушенную хроматограмму слегка опрыскивают раствором фенола, насыщенного водой и содержащего 0,05 н. раствор едкого натра (в соотношении 1 : 1, применяют нижнюю фазу). После нагревания хроматограммы появляются белые пятна на темно-коричневом фоне.

#### Д 25. Ароматический амин — сахар

5 г ароматического амина (например, анилина) и 5 г восстанавливающего сахара (лучше всего ксилозы) растворяют в 50%-ном водном растворе этанола. Опрысканную этим реактивом хроматограмму нагревают до 125—130°. При этом кислоты проявляются в виде коричневых пятен.

#### Д 26. *o*-Фенилендиамин

Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленным 0,05%-ным раствором *o*-фенилендиамина в 10%-ной водной трихлоруксусной кислоте. Затем хроматограмму сушат точно в течение 2 мин при 100°. При этом на еще влажной хроматограмме пятна  $\alpha$ -кетокислот флуоресцируют в ультрафиолетовом свете. Реакция весьма чувствительна по отношению к продолжительности нагревания хроматограммы.

## УГЛЕВОДЫ

## Д 27. 3,5-Динитросалициловая кислота

Хроматограмму опрыскивают 0,5%-ным раствором 3,5-динитросалициловой кислоты в 4%-ном растворе едкого натра, выдерживают в течение короткого времени на воздухе, после чего высушивают в сушильном шкафу в течение 4—5 мин при температуре 100°. При этом восстанавливающие сахара образуют коричневые пятна на желтом фоне. Чувствительность реакции около 1 мкг.

## Д 28. Йодная кислота

- а) *Йодная кислота—реактив Шиффа*. Хроматограмму опрыскивают 2%-ным водным раствором периодата натрия и оставляют в атмосфере азота при 60° в течение 7 мин. Затем хроматограмму помещают в атмосферу SO<sub>2</sub> и опрыскивают реактивом Шиффа (1 г розанилина в 50 мл воды обесцвечивают SO<sub>2</sub> и доводят объем раствора водой до 1000 мл). При этом восстанавливающие и невосстанавливающие сахара при комнатной температуре обнаруживаются в течение 3—24 час.
- б) *Йодная кислота—KMnO<sub>4</sub> — бензидин*. Хроматограмму опрыскивают 1%-ным водным раствором метапериодата натрия и оставляют на воздухе в течение 3—4 мин. Затем опрыскивают свежим 1%-ным раствором перманганата и оставляют на воздухе в течение 5 мин. После отмывания водой избытка реактивов и высушивания хроматограммы на воздухе ее опрыскивают бензидиновым реактивом (1 г бензидина, 8 г трихлоруксусной кислоты, 20 мл безводной уксусной кислоты, 12 мл воды и 160 мл этанола). При этом восстанавливающие и невосстанавливающие сахара образуют на хроматограмме пятна синего цвета на белом или светло-коричневом фоне.
- в) *Йодная кислота—бензидин*. Хроматограмму опрыскивают насыщенным водным раствором метапериодата калия и выдерживают в течение 6 мин. Затем применяют раствор 0,1 М бензидина в смеси 50%-ный раствор метанола — ацетон — 0,2 н. соляная кислота в соотношении 10:2:1. Сахара со свободной α-диоловой конфигурацией образуют на хроматограмме белые пятна на синем фоне. Для отличия кетоз и аминсахаров от всех остальных сахаров хроматограмму можно обработать 0,1 М этанольным раствором бензидина с 0,8 н. соляной кислотой в соотношении 1:1 с последующим нагреванием до 110° в течение 1 мин. При этом все сахара, за исключением аминсахаров и кетоз, обнаруживаются в виде пятен синего цвета.
- г) *Реакция Римини*. Хроматограмму опрыскивают 2,5%-ным раствором метапериодата калия. Спустя 10 мин опрыскивают свежеприготовленной смесью 7%-ного водного раствора нитропруссиды натрия с этанолом, насыщенным пиперазином, и с 1%-ным метанольным раствором этиленгликоля (в соотношении 1:3:4). Вещества, при окислении которых образуется ацетальдегид, обнаруживаются в виде пятен синего цвета (метилпентозы, дезоксисахара и треонин).
- д) *Йодная кислота—п-нитроанилин*. Хроматограмму опрыскивают насыщенным водным раствором метапериодата натрия, разбавленным водой в соотношении 1:2. Хроматограмму оставляют на 10 мин при комнатной температуре, затем опрыскивают 1%-ным этанольным раствором п-нитроанилина в смеси с концентрированной соляной кислотой в соотношении 4:1. Дезоксисахара и гликали образуют

немедленно пятна желтого цвета, сильно флуоресцирующие в ультрафиолетовом свете. При опрыскивании хроматограммы 5%-ным метанольным раствором едкого натра желтая окраска переходит в зеленую.

**Д 29. Бромфеноловый синий — борная кислота**

40 мг бромфенолового синего или бромкрезолового зеленого растворяют в 10 мл этанола. К раствору добавляют 100 мг борной кислоты и 7,5 мл 1%-ного раствора тетрабората натрия и этанолом доводят объем до 100 мл. Этим реактивом сахароспирты обнаруживаются в виде желтых пятен на синем фоне.

**Д 30. Нафторезорцин**

0,2%-ный раствор нафторезорцина в ацетоне смешивают перед опрыскиванием с 3 н. фосфорной кислотой в соотношении 5:1. Хроматограмму после опрыскивания указанным раствором высушивают в сушильном шкафу при 90°. Реактив служит для обнаружения кетоз. Стрептомицин дает слабое серое окрашивание, а маннозидострептомицин — слабое розовое.

**Д 31.  $\alpha$ -Нафтол**

К 1%-ному раствору  $\alpha$ -нафтола добавляют 10% фосфорной кислоты. Этим реактивом кетозы обнаруживаются при нагревании до 90°.

**Д 32. Антрон**

300 мг антрона растворяют при кипячении в 10 мл ледяной уксусной кислоты. Затем к раствору добавляют 20 мл этанола, 3 мл фосфорной кислоты и 1 мл воды. Раствор выдерживают в холодильном шкафу в течение нескольких недель. Если при хранении выпадут кристаллы, то их следует растворить нагреванием. Хроматограмму опрыскивают вышеуказанным раствором и нагревают до 110° в течение 5—6 мин. Кетозы и олигосахариды, содержащие кетозы, обнаруживают при этом в виде пятен желтого цвета. Промытую водой хроматограмму можно сохранять. Чувствительность реакции проявления составляет около 5 мкг.

**Д 33. *m*-Фенилендиамин**

Хроматограмму обрабатывают 0,2 М раствором *m*-фенилендиамина в 76%-ном этаноле, после чего высушивают при температуре 105° в течение 5 мин.

Реакция особенно чувствительна при наблюдении флуоресценции хроматограммы в ультрафиолетовом свете. Реактив пригоден для открытия альдоз.

**Д 34. Кислый фталат анилина**

0,93 г анилина и 1,66 г фталевой кислоты растворяют в 100 мл *n*-бутанола, насыщенного водой. Хроматограмму опрыскивают, после чего высушивают при 105° в течение нескольких минут. С этим реактивом альдопентозы и 2-кетогексоновые кислоты дают красное окрашивание, а альдогексозы и 5-кетогексоновые кислоты — коричневое окрашивание. Чувствительность реакции повышается при рассматривании хроматограммы в ультрафиолетовом свете.

**Д 35. Анилин — дифениламин — фосфорная кислота**

4%-ный этанольный раствор анилина перед использованием смешивают с 4%-ным этанольным раствором дифениламина и сиропообразной фосфорной кислотой в соотношении 5:5:1. Опрысканную реактивом хроматограмму осторожно нагревают до 80° в течение 5 мин.

**Д 36. *o*-Аминофенол**

0,15 г *o*-аминофенола растворяют в 20 мл этанола и подкисляют 10 мл 50%-ной фосфорной кислоты. Реактив готовят непосредственно перед использованием. После опрыскивания хроматограмму нагревают при 105° в течение нескольких минут.

**Д 37. *n*-Аминогиппуровая кислота**

0,3 г *n*-аминогиппуровой кислоты растворяют в 100 мл этанола. Для обнаружения восстанавливающих дисахаридов необходимо добавить 3% фталевой кислоты. Хроматограмму опрыскивают и нагревают до 140° в течение 8 мин. Гексозы и пентозы обнаруживаются в виде пятен оранжевого цвета. В ультрафиолетовом свете чувствительность реакции повышается. Реактив устойчив.

**Д 38.  $\alpha$ -Нафтиламин**

0,5%-ный этанольный раствор  $\alpha$ -нафтиламина смешивают с сиропообразной фосфорной кислотой в соотношении 5:1. Реактив готовят непосредственно перед использованием. Хроматограмму опрыскивают реактивом и затем нагревают до 105° в течение нескольких минут. Реактив специфичен для проявления кетоз и олигосахаридов, содержащих кетозы.

**Д 39. Мочевина**

5 г мочевины растворяют в 20 мл 2 н. соляной кислоты и 100 мл этанола. После опрыскивания этим реактивом кетозы и олигосахариды, содержащие кетозы, обнаруживаются в виде синих пятен.

**Д 40. Ферментативное определение сахаров**

Хроматограмму опрыскивают 5%-ной суспензией свежих пекарских дрожжей в прокипяченной воде и инкубируют в течение 90 мин при температуре 38° в атмосфере, насыщенную водяным паром. Затем хроматограмму высушивают при повышенной температуре и проявляют реактивами, обычно применяемыми для проявления альдоз (Д 34 или Д 35) или кетоз (Д 30—Д 32).

**Д 41. Гидроксамовая проба**

Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленным раствором, содержащим равные объемы 1 н. раствора солянокислого гидроксил-амина в метаноле и 1,1 н. едкого кали в метаноле. Затем хроматограмму высушивают на воздухе в течение 10 мин, после чего ее опрыскивают 1—2%-ным раствором  $\text{FeCl}_3$  в 1%-ной водной соляной кислоте. Лактоны и различные эфиры кислот дают синюю окраску.

**Д 42. Соляная кислота**

Хроматограмму опрыскивают соляной кислотой в этаноле (1:4), а затем нагревают до 90°. При этом гликали дают пятна розового цвета.

**Д 43. *n*-Анизидин**

Хроматограмму опрыскивают 3%-ным раствором *n*-анизидина в *n*-бутаноле и затем нагревают. Альдогексозы дают зелено-коричневую окраску, кетогексозы — желтую, альдопентозы — зеленую, уроновые кислоты — вишнево-красную, метилированные альдопентозы — красную и 2-дезоксисальдозы — серо-коричневую.

**Д 44. Диметиланилин**

Хроматограмму опрыскивают 2%-ным раствором диметиланилина в 2%-ной уксусной кислоте с 5% трихлоруксусной кислоты. Затем хроматограмму нагревают до 100°. Реактив пригоден для обнаружения метилированных сахаров.

**Д 45. Молибденовокислый аммоний**

- а) Для проявления применяют смесь 5 мл 60%-ной хлорной кислоты, 10 мл 1 н. соляной кислоты и 25 мл 4%-ного раствора молибденово-кислого аммония, разбавленную водой до 100 мл. Опрысканную реактивом хроматограмму высушивают при 85° в течение 7 мин.
- б) *Модификация реактива для проявления методом погружения.* 1 г молибденовокислого аммония растворяют в 8 мл воды и 3 мл хлорной кислоты (примерно 70%-ной), после чего добавляют ацетон до объема 100 мл. Как и в первом случае (Д 45а), для увеличения интенсивности окраски пятен хроматограмму подвергают действию сероводорода или дополнительно опрыскивают раствором аскорбиновой кислоты.
- в) *Ферментативный гидролиз.* Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором кишечной фосфатазы в 0,1 н. буферном растворе уксуснокислого аммония (рН 8,9), после чего выдерживают во влажной камере в течение около 1,5 час. Образующийся при этом неорганический фосфат обнаруживают молибденовокислым аммонием (5 г молибденовокислого аммония в 100 мл воды и 30 мл концентрированной азотной кислоты). Хроматограмму высушивают при температуре 50—55°, после чего опрыскивают бензидином (100 г бензидина растворяют в 10 мл ледяной уксусной кислоты и разбавляют водой до объема 100 мл) и высушивают при 37°. Затем хроматограмму опрыскивают насыщенным водным раствором уксуснокислого аммония. Фосфаты дают синие пятна на белом или слабо-желтом фоне.
- г) *Ферментативный гидролиз—хлористый кальций.* Хроматограмму опрыскивают сначала 10 мл 5%-ного раствора  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в 80%-ном этаноле, после чего высушивают при комнатной температуре. Затем хроматограмму обрабатывают раствором фосфатазы в 0,1 н. гликоколовом буфере (рН 9) и инкубируют между двумя стеклянными пластинками при температуре 37° в течение 4 час. Хроматограмму опрыскивают молибденовокислым аммонием и бензидином, как описано выше (Д 45в).

**Д 46. Хлорное железо — сульфосалициловая кислота**

Хроматограмму опрыскивают 0,1%-ным раствором  $\text{FeCl}_3$  в 80%-ном этаноле и после высушивания при комнатной температуре опрыскивают 1%-ным раствором сульфосалициловой кислоты в 80%-ном этаноле. При этом фосфаты проявляются в виде белых пятен на светло-фиолетовом фоне. При более сильной буферности бумаги повышают концентрацию сульфосалициловой кислоты до 10%.

**Д 47. Реактив Моргана — Элсона**

I. *Ацетилацетоновый реактив*. 1) 0,5 мл ацетилацетона растворяют в 50 мл *n*-бутанола. 2) 50%-ный водный раствор едкого кали смешивают с этанолом в соотношении 5 : 20. Перед использованием смешивают 0,5 мл раствора 2 с 10 мл раствора 1.

II. **n*-Диметиламинобензальдегид*. 1 г *n*-диметиламинобензальдегида, полученного перекристаллизацией из водного этанола, растворяют в 30 мл этанола и добавляют 30 мл концентрированной соляной кислоты. Полученный раствор разбавляют дважды перегнанным *n*-бутанолом до объема 180 мл. Реактив до разбавления его *n*-бутанолом устойчив.

Сначала хроматограмму опрыскивают раствором I и в течение 5 мин нагревают при 105°. Затем опрыскивают раствором II и нагревают при 90° еще 5 мин. Свободные гексозоамины дают вишнево-красные пятна, а ацетилированные гексозоамины — пурпурно-фиолетовые пятна. Реакция проходит и при применении только одного реактива II.

**Д 48. Толуидиновый синий**

Для лучшего окрашивания пятен хроматограмму фиксируют путем погружения на 15 мин в смесь 20 мл формалина и 80 мл абсолютного этанола. После высушивания хроматограмму опрыскивают раствором толуидинового синего (40 мг толуидинового синего растворяют в 80 мл ацетона и 20 мл воды). Избыток красителя отмывают сначала разбавленной уксусной кислотой, а затем водой. Применяется для окрашивания кислых полисахаридов.

**Д 49. Муцикармин**

1 г кармина, 0,5 г безводного  $\text{AlCl}_3$  и 2 мл дистиллированной воды нагревают в течение 2—3 мин. Полученную смесь приливают к 100 мл 50%-ного этанола и фильтруют через 24 час. Реактив хранят при 5°. Для проявления хроматограммы берут из основного раствора 5 мл и разбавляют 17 мл абсолютного этанола и 3 мл воды. В реакцию вступают кислые и нейтральные полисахариды. Полисахариды перед проявлением хроматограммы целесообразно фиксировать, как это делается при проявлении толуидиновым синим (см. Д 48).

**ФЕНОЛЫ И АРОМАТИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ****Д 50. Диазотированный *n*-нитроанилин**

а) *По Хайсу*. Смешивают 1 часть насыщенного раствора *n*-нитроанилина в 0,33 н. соляной кислоте с 1 частью 1%-ного  $\text{NaNO}_2$  и к полученному раствору прибавляют 1 часть 5%-ного раствора мочевины. Спустя 5 мин к раствору прибавляют 7 частей воды. Реактив устойчив в течение 2 час.

б) *По Брею и сотрудникам*. Смешивают непосредственно перед употреблением 25 мл 0,3%-ного раствора *n*-нитроанилина в 8%-ной соляной кислоте с 1,5 мл 5%-ного раствора  $\text{NaNO}_2$ . Хроматограмму опрыскивают этим раствором и затем еще 20%-ным раствором соды.

**Д 51. Реактив Паули**

а) *По Брею и сотрудникам*. Непосредственно перед использованием смешивают 25 мл 0,3%-ного раствора сульфаниловой кислоты

в 8%-ной соляной кислоте с 1,5 мл 5%-ного раствора  $\text{NaNO}_2$ . Хроматограмму опрыскивают сначала этим раствором, а затем дополнительно 20%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

- б) По Кирби-Берри и сотр. 4,5 г сульфаниловой кислоты растворяют при нагревании в 45 мл 12 н.  $\text{HCl}$ . Разбавляют водой до объема 500 мл. 1 часть этого раствора смешивают с 1 частью 4,5%-ного раствора  $\text{NaNO}_2$ . Смесь оставляют на 15 мин в ледяной бане. Перед употреблением смешивают полученный таким способом раствор с равным количеством 10%-ного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
- в) По Кутачеку. 3 г сульфаниламида растворяют в 200 мл воды, 6 мл концентрированной соляной кислоты и 14 мл *n*-бутанола. Перед опрыскиванием 20 мл этого раствора смешивают с 0,3 г  $\text{NaNO}_2$  и полученным раствором опрыскивают хроматограмму. Спустя 5—10 мин, когда хроматограмма слегка подсохнет на воздухе, опрыскивают 10%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Сразу появляются красные пятна на желтом фоне. Гистидин дает ярко-красные пятна, тирозин — оранжевые. Перед опрыскиванием хроматограмма не должна соприкасаться с фенолом.
- г) По Зангеру и Туппи. 1%-ный раствор *n*-анизидина в спиртовой 0,11 н. соляной кислоте смешивают с 10%-ным спиртовым раствором амилнитрита (1 : 1). В этом растворе хроматограммы можно проявлять погружением. После высыхания бумагу подвергают действию паров аммиака или опрыскивают спиртовым раствором едкого кали. Гистидин дает темно-красное, тирозин — оранжевое пятно. Для тирозина, однако, чувствительность невелика.

#### Д 52. бис-Дiazотированный бензидин

- а) 0,18 г бензидина растворяют в 50 мл 0,5 н. соляной кислоты. 2 мл этого раствора смешивают с 2 мл 1%-ного раствора  $\text{NaNO}_2$ . Спустя 3—5 мин раствор обесцвечивается. Затем прибавляют 2 мл 5%-ного раствора амидосульфоната аммония или мочевины. После разрушения избытка нитрита добавляют 14 мл воды. Этим реактивом опрыскивают бумагу, предварительно доведенную до рН около 9 лучше всего при помощи опрыскивания 0,1—0,085 М раствором вторичного фосфата натрия (ч. д. а.).
- б) 0,2—0,25 г бензидина растворяют в смеси 8 мл ледяной уксусной кислоты и 22 мл воды. Растворение ускоряют нагреванием до 80°. Диазораствор применяют, как описано выше (Д 52а).

#### Д 53. Хлорное железо

- а) 0,1 %-ный водный раствор  $\text{FeCl}_3$ .
- б) 2,0 %-ный водный раствор  $\text{FeCl}_3$ .
- в) 1 %-ный раствор  $\text{FeCl}_3$  в этаноле.

#### Д 54. Реактив Гиббса

Хроматограмму опрыскивают 1%-ным спиртовым раствором 2,6-дихлорхинонхлоримида. Далее ее рекомендуется обработать парами аммиака.

#### Д 55. Реактив Фолина — Чокальте

10 г  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  и 2,5 г  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  растворяют в 70 мл воды; к раствору прибавляют 5 мл 85%-ной фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь кипятят затем 10 час с обратным

холодильником. К раствору прибавляют 15 г  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 5 мл воды и 1 каплю чистого брома. Кипятят еще 15 мин и по охлаждении разбавляют до объема 100 мл. Перед употреблением разбавляют трехкратным количеством воды. Раствор не должен иметь зеленой окраски. Хроматограмму сначала опрыскивают 20%-ным раствором соды, а затем этим реактивом.

**Д 56. Реактив Фолина — Дениса**

10 г  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ , 2 г фосфорномолибденовой кислоты, 5 г 85%-ной фосфорной кислоты и 75 мл воды кипятят в течение 2 час, фильтруют и затем разбавляют водой до объема 100 мл. Для опрыскивания смешивают 1 часть реактива с 1 частью воды и 2 частями этанола; после опрыскивания хроматограмму подвергают действию паров аммиака. Реагируют также тирозин и триптофан; однако чувствительность реактива невысока.

**Д 57. Реактив Миллона**

1 вес. часть ртути обрабатывают 2 частями дымящей азотной кислоты. Раствор разбавляют 2 частями воды. Хроматограмму слегка опрыскивают этим раствором и высушивают при 35°. Опрыскивание можно повторить. Помимо соединений, содержащих фенольную гидроксильную группу, при нагревании реагируют также соединения с метоксильной группой в бензольном ядре.

**Д 58. Хлорное железо — красная кровяная соль**

Для опрыскивания применяют смесь 1 части 15%-ного раствора хлорного железа с 1 частью 1%-ного раствора красной кровяной соли. Реактив устойчив в течение не более 5 мин. Еще влажную хроматограмму промывают разбавленной соляной кислотой. Восстанавливающие вещества и фенолы дают синее окрашивание.

**Д 59. Уксуснокислый магний**

Хроматограмму опрыскивают 0,5%-ным раствором уксуснокислого магния в метаноле, затем высушивают в течение 5 мин при 90°. Оксиантрахиноны дают окрашивание от оранжевого до фиолетового.

**Д 60. *n*-Нитрозодиметиланилин**

Для опрыскивания используют 1%-ный раствор *n*-нитрозодиметиланилина в 50%-ном этаноле. Фенолы дают различные окраски.

**Д 61. Железоаммонийные квасцы**

Хроматограмму опрыскивают 0,2%-ным раствором  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  в воде. Реактив особенно удобен для флавоноидов.

**Д 62. Хлористый алюминий**

Для проявления флавоноидов пользуются 1%-ным этанольным раствором  $\text{AlCl}_3$ .

**Д 63. Уксуснокислый свинец**

Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором основного или среднего уксуснокислого свинца в воде. Многие флавоноиды образуют цветные лаки.

**Д 64. Реактив Бенедикта**

Хроматограмму опрыскивают реактивом, приготовленным растворением 1,73 г кристаллического сульфата меди, 17,3 г цитрата натрия и 10 г безводного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в воде и разбавлением до объема 100 мл. Реактив на флавоноиды.

**Д 65. Реактив Уилсона**

Хроматограмму опрыскивают насыщенным раствором борной кислоты в безводном ацетоне с 10 %-ным раствором лимонной кислоты в ацетоне (1 : 1). Применяется для проявления 5-оксифлавонов.

**Д 66. Ванадат аммония**

Хроматограмму опрыскивают насыщенным раствором ванадата аммония. Применяется для проявления флавоноидов.

**Д 67. Ванилин**

Хроматограмму опрыскивают 1 %-ным раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте и высушивают при комнатной температуре. Катехины дают интенсивное красное окрашивание.

**Д 68. Хлористый цирконий**

Хроматограмму основательно опрыскивают 2 %-ным раствором  $\text{ZrOCl}_2$  в метаноле. После высушивания обильно опрыскивают 5 %-ным водным раствором лимонной кислоты. Гликозиды можно предварительно подвергнуть гидролизу, подвешивая хроматограмму в закрытом сосуде с кипящей 25 %-ной соляной кислотой на 2 мин.

**Д 69. Едкое кали**

Хроматограмму опрыскивают 1 %-ным раствором едкого кали в этаноле и сушат в сушильном шкафу. Наблюдают флуоресценцию кумарина в ультрафиолетовых лучах.

**Д 70. Реактив Фучика и Коржистека**

а) Сухую хроматограмму опрыскивают перегнанным хлористым сульфуром (в случае необходимости разбавляют четыреххлористым углеродом); хроматограмму можно также обрабатывать погружением. После высушивания опрыскивают лучше всего 10 %-ным водным едким кали или 10 %-ным раствором пиперидина в бензоле или, наконец, другими органическими основаниями.

б) *Модификация Хайса и Ледвины.* На дно эксикатора наливают равные части насыщенного раствора  $\text{KMnO}_4$  и 10 %-ной соляной кислоты и над поверхностью жидкости помещают сухую хроматограмму на 1—16 час в зависимости от степени насыщения атмосферы хлором. Оптимальное время можно установить с помощью бумажек, на которые заранее наносят по 10 мкг открываемых веществ и которые через определенные промежутки времени вынимают и проявляют. После хлорирования хроматограмму оставляют на 15 мин выветриться и опрыскивают 2 %-ным раствором едкого кали в 90 %-ном этаноле.

**71. 2,4-Динитрофенилгидразин**

Хроматограмму опрыскивают 0,4 %-ным раствором 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. соляной кислоте. Вещества, содержащие

свободную альдегидную или кетонную группу, дают интенсивное желтое окрашивание на бледно-желтом фоне.

**Д 72. Гидразин**

Хроматограмму опрыскивают смесью 9 частей насыщенного раствора сульфата гидразина и 1 части 4 н. соляной кислоты. Реактив особенно пригоден для обнаружения ванилина, этилванилина, пиперонала и т. п. Чувствительность около 0,1 мкг.

**Д 73. Бензидин**

Для опрыскивания смешивают 0,5 г бензидина в 20 мл ледяной уксусной кислоты с 80 мл этанола. Флуоресценцию пятен усиливают действием разбавленной соляной кислоты. Чувствительность реакции около 1 мкг. Применяется для проявления флавоноидов, сахаров, терпеновых альдегидов и др.

**Д 74. Орцин**

0,5 г орцина и 15 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 100 мл *n*-бутанола, насыщенного водой. После опрыскивания сушат 20 мин при 105°. Применяется для проявления сахаров, продуктов окисления лигнина и др.

## СТЕРОИДЫ

**Д 75. Фосфорная кислота**

Хроматограмму быстро опрыскивают 15 %-ным раствором фосфорной кислоты и выдерживают в течение 20 мин при температуре 90°. В ультрафиолетовом свете наблюдается флуоресценция.

**Д 76. Хлористый цинк**

Хроматограмму опрыскивают 30 %-ным раствором безводного  $ZnCl_2$  в абсолютном метаноле и сушат в течение 1 час в сушильном шкафу при температуре 130° над водоотнимающим веществом. Флуоресценция и окраска пятен мало устойчивы; реакция чувствительна лишь при строгом соблюдении температуры нагревания и в безводной атмосфере.

**Д 77. Хлористый цинк — хлористый бензоил**

Хроматограмму опрыскивают раствором 20 г хлористого цинка в 30 мл ледяной уксусной кислоты и нагревают в течение 5 мин в сушильном шкафу при температуре 90°. Некоторые стероиды (например, эргостерол) уже на этой стадии образуют окрашенные пятна. В ряде случаев бумагу необходимо опрыснуть еще 50 %-ным раствором хлористого бензоила в хлороформе и подвергнуть кратковременному нагреванию до 90° (однако бумага не должна буреть).

**Д 78. Треххлористая сурьма**

а) Хроматограмму пропускают через насыщенный раствор  $SbCl_3$  в хлороформе и нагревают в течение 4 мин до 90°. Кроме окраски пятен в видимом свете, наблюдается флуоресценция в ультрафиолетовом свете.

- б) Насыщенный раствор  $\text{SbCl}_3$  в хлороформе смешивают с уксусным ангидридом в соотношении 8:2. После протягивания хроматограммы через этот раствор ее нагревают в течение нескольких минут до  $100-120^\circ$  (бумага не должна буреть). Некоторые стероиды дают фиолетовое окрашивание.
- в) Хроматограмму опрыскивают 50%-ным раствором треххлористой сурьмы в ледяной уксусной кислоте и нагревают приблизительно 5 мин до  $110^\circ$ .
- г) *Проявление после хлорирования.* Бумагу в течение 20 мин обрабатывают хлором, а затем слегка опрыскивают раствором  $\text{SbCl}_3$  в уксусном ангидриде (380 г в 100 мл) (Д 78б). Хроматограмму подвергают кратковременному действию температуры  $90-100^\circ$ . Наблюдается флуоресценция в ультрафиолетовом свете.
- д) Хроматограмму опрыскивают насыщенным раствором  $\text{SbCl}_3$  в нитробензоле, а затем выдерживают при температуре  $90^\circ$  до образования максимальной окраски и флуоресценции.
- е) Хроматограмму опрыскивают насыщенным раствором  $\text{SbCl}_3$  в хлороформе, который перед применением смешивают с 10–20%-ным раствором хлористого тионила, и выдерживают в течение 3–5 мин при температуре  $95^\circ$ . Кроме окраски в видимом свете, возникает флуоресценция в ультрафиолетовом свете.

**Д 79. Мышьяковомолибденовая кислота**

25 мг молибдата аммония растворяют в 450 мл воды и смешивают с 21 мл концентрированной серной кислоты; к раствору добавляют 3 г  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 25 мл воды. Смесь выдерживают в течение 48 час при температуре  $37^\circ$ , а затем фильтруют. Раствор хранят в темных бутылках.

Бумагу помещают на стеклянную пластинку, нагретую до  $65^\circ$  и смоченную тонким слоем реактива, затем прикрывают другой пластинкой и выдерживают в течение 30 мин при температуре  $65^\circ$ . Там, где находятся стероиды с кетольной группой и сопряжением при  $\text{C}_{(3-4)}$ , возникают синие пятна. Желто-зеленую окраску фона можно предотвратить быстрым пропусканием хроматограммы через 5%-ный раствор лимоннокислого аммония. Устойчивая окраска пятен сохраняется в течение нескольких дней.

**Д 80. Едкий натр**

Хроматограмму опрыскивают 10%-ным водным раствором едкого натра и сушат при  $60-100^\circ$ .  $\Delta^4$ -3-Кетостероиды флуоресцируют желтым цветом. Через несколько дней реакцию можно вызвать вновь повторным опрыскиванием.

**Д 81. *n*-Фенилендиамин — фталевая кислота**

Хроматограмму опрыскивают раствором, содержащим 0,9% *n*-фенилендиамина и 1,6% фталевой кислоты в *n*-бутаноле, насыщенном водой. После опрыскивания хроматограмму выдерживают в сушильном шкафу при температуре  $100-110^\circ$  до возникновения пятен, окрашенных в интенсивный желтый или коричневый цвет. Каждый день следует готовить свежий реактив.

**Д 82. *m*-Динитробензол (реактив Циммерманна или Раймонда)**

- а) Хроматограмму опрыскивают 2%-ным раствором *m*-динитробензола в абсолютном этаноле, а после улетучивания последнего — 2,5 н.

водным раствором едкого кали. Затем хроматограмму выдерживают при температуре 70—100° до образования пятен, окрашенных в интенсивный красно-фиолетовый цвет.

- б) Хроматограмму опрыскивают 10%-ным раствором *m*-динитробензола в бензоле, сушат 5—10 мин при 60°, а затем опрыскивают раствором 6 г едкого натра в смеси 25 мл воды и 45 мл метанола. Метод применяется для проявления стероидных гликозидов.

**Д 83. *m*-Динитробензол — 2,4-динитрофенилгидразин**

Сначала хроматограмму проявляют реактивом Д 82а, пятна очерчивают, а затем обрабатывают реактивом Д 71. Избыток реактива удаляют, промывая хроматограмму водой.

**Д 84. Йодоплатинат калия**

- а) 5 мл 5%-ного раствора  $PtCl_4$  в 1 н. соляной кислоте смешивают с 45 мл 10%-ного раствора КJ и 100 мл дистиллированной воды. Реактив хранят в темноте. После опрыскивания избыток реактива отмывают водой. Пятна гидразонов Т окрашены в цвета от красного до оранжевого. Чувствительность метода для монокетостероидов составляет приблизительно 1 мкг, для стероидов с большим числом кетогрупп чувствительность выше.

- б) Модификация реактива для хроматографирования методом погружения. 4 мл 0,002 М  $H_2PtCl_6$  или  $PtCl_4$  смешивают с 0,25 мл 1 М раствора КJ, 0,4 мл 2 н. соляной кислоты и 76 мл ацетона непосредственно перед применением. Проявление осуществляют путем двукратного погружения хроматограммы в раствор. Метионин и цистин проявляются в виде бледных пятен на розовом фоне. Пятна будут более отчетливыми, если хроматограмму обработать парами соляной кислоты. Фенол до некоторой степени мешает этой реакции. Метионинсульфоксид обесцвечивается слабо, метионинсульфон вообще не обесцвечивается.

**Д 85. Реакция Либермана**

Хроматограмму помещают на стеклянную пластинку, смоченную раствором 20%-ной серной кислоты в уксусном ангидриде, и прикрывают другой стеклянной пластинкой.  $\Delta^5$ -Ненасыщенные 3-стеролы образуют окраску от сине-фиолетовой до сине-зеленой. Максимальная интенсивность окраски наблюдается через 20 мин.

- Д 86. Сочетание с диазотированным *n*-нитробензолазодиметоксианилином**  
0,1 мл раствора эстрогена в абсолютном этаноле (с содержанием эстрогена минимум 3 мкг) смешивают с 0,2 мл диазотированного водного раствора *n*-нитробензолазодиметоксианилина и 0,1 мл 20%-ного раствора  $Na_2CO_3$ . Раствор нагревают в течение 10 мин на водяной бане, а затем охлаждают. Сочетание можно также проводить без нагревания, выдерживая раствор в течение ночи. Красно-фиолетовое окрашивание раствора может затем сохраняться без изменений в течение нескольких недель. Краситель экстрагируют 0,2 мл бензола и бензольный экстракт наносят на хроматограмму.

**Д 87. Эриохромцианин**

Хроматограмму промывают в течение 15 мин в 0,05%-ном растворе эриохромцианина (нейтральная реакция), а затем 1%-ной уксусной кислотой, 1%-ным раствором  $Na_2CO_3$  и, наконец, водой. Холестан и холест-5-ен образуют синие пятна на светло-синем фоне.

**Д 88. 3,5-Динитробензойная кислота**

Для опрыскивания растворяют 1 г 3,5-динитробензойной кислоты в 50 мл метанола и к раствору добавляют 50 мл 1 н. едкого кали. Приготовленный реактив применяют для идентификации гликозидов наперстянки.

**Д 89. Трихлоруксусная кислота**

Хроматограмму опрыскивают 25%-ным раствором трихлоруксусной кислоты в хлороформе и выдерживают в течение 2 мин при 100°. При продолжительном нагревании флуоресценция усиливается, но окраска в видимом свете ослабляется.

**Д 90. Хлорамин — трихлоруксусная кислота**

Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленной смесью 3%-ного водного раствора хлорамина и 20%-ной трихлоруксусной кислоты (2:8), нагревают в течение 10 мин до 120° и наблюдают окраску в видимом и ультрафиолетовом свете. Приведенный метод служит для анализа стероидных гликозидов.

**Д 91. Фурфурол**

Сухую хроматограмму пропускают через 0,5%-ный раствор свежеперегнанного фурфурола в эфире, не содержащем перекиси, а затем через раствор, содержащий 5 мл уксусной кислоты, 5 мл концентрированной серной кислоты и 90 мл эфира, не содержащего перекиси. Хроматограмму нагревают до 80°. Приведенный метод применяется для проявления стероидных гликозидов.

**Д 92. Коричный альдегид**

а) Сухую хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором коричневого альдегида в этаноле, сушат в течение 5 мин при 85—90°, а затем слегка опрыскивают смесью 12 мл уксусного ангидрида с 1 мл концентрированной серной кислоты. По истечении 1 мин хроматограмму нагревают (85—90°) до появления окрашенного пятна. Метод применяется для идентификации стероидных сапонинов.

б) Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором свежеперегнанного коричневого альдегида в метаноле, выдерживают в течение нескольких минут на воздухе, а затем помещают в камеру, на дне которой находится смесь равных частей концентрированной серной и соляной кислот. Спустя некоторое время на бумаге возникают интенсивно окрашенные пятна алкалоидов кураре. В реакцию вступают также многие производные индола.

**УГЛЕВОДОРОДЫ И ДРУГИЕ ЛИПОФИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ****Д 93. Реакция Ноллера**

Бумагу помещают в камеру, насыщенную парами смеси хлористого тионила примерно с 20%  $\text{SnCl}_2$ . Метод применяется для проявления смол.

## АЛИФАТИЧЕСКИЕ И АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНЫ

Д 94. *o*-Ацетоацетилфенол

Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором *o*-ацетоацетилфенола в *n*-бутаноле. После сушки амины флуоресцируют в ультрафиолетовом свете.

## Д 95. Нитропруссид натрия

а) 5% нитропруссид натрия растворяют в 10%-ном водном растворе ацетальдегида и перед применением добавляют 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . После опрыскивания вторичные амины дают синее окрашивание.

б) *Реактив Тормзлена*. Хроматограмму опрыскивают 2%-ным раствором нитропруссид натрия, а затем 5%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . После частичной сушки хроматограмму опрыскивают 50%-ной уксусной кислотой. Индолы, которые не содержат заместителей в положении 1, 2 или 3, реагируют с образованием синего окрашивания.

Д 96. *n*-Бензохинон

Хроматограмму опрыскивают раствором, полученным растворением 0,5 г перекристаллизованного *n*-бензохинона в смеси 10 мл перегнанного пиридина и 40 мл *n*-бутанола. Сразу же появляются красные пятна этаноламина; холин не реагирует.

## Д 97. Дипикриламид

Опрыскивают раствором 0,2 г дипикриламида в смеси 50 мл ацетона и 50 мл бидистиллированной воды. Холин и его производные проявляются в виде красных пятен на желтом фоне.

## Д 98. Ферроцианид калия — двухлористый кобальт

Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленным 1%-ным раствором ферроцианида калия, а затем 0,5%-ным водным раствором  $\text{CoCl}_2$ . Холин проявляется в виде зеленого пятна. Чувствительность реакции около 10 мкг.

## Д 99. Пикрилхлорид

Хроматограмму опрыскивают или быстро протягивают через 1,5%-ный раствор пикрилхлорида в этаноле, сушат и затем обрабатывают парами аммиака. Метод применяется для проявления гидроксиламины, гидразинов и пиридиновых производных.

## Д 100. Диацетилмонооксим — двухлористый никель

1,2 г диацетилмонооксима растворяют при нагревании в 35 мл воды. К раствору прибавляют 0,95 г  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и после охлаждения — 2 мл концентрированного аммиака. Приготовленный раствор смешивают затем с раствором 0,12 г солянокислого гидроксил-амина в 200 мл воды и оставляют на один день. Осадок Ni-диметилглиоксима фильтруют и красно-коричневый фильтрат используют для проявления.

## Д 101. Реактив Кэзэи

1. Непосредственно перед опрыскиванием смешивают 20 мл 1,3%-ного раствора йода в ледяной уксусной кислоте с 20 мл 1%-ного

раствора сульфаниловой кислоты в 30%-ном водном растворе уксусной кислоты.

- II. 0,1%-ный раствор двусолянокислого N-1-нафтилэтилендиамина. Хроматограмму последовательно опрыскивают раствором I и II. Применяют для проявления гидросиламина.

**Д 102. *n*-Диметиламинобензальдегид**

- а) 1 г *n*-диметиламинобензальдегида растворяют в 30 мл этанола. Полученный раствор добавляют к 30 мл концентрированной соляной кислоты и разбавляют 180 мл дважды перегнанного *n*-бутанола. Реактив выдерживают в течение нескольких недель. Кроме ароматических аминов, реактив действует на мочевины, гидразин, производные индола, алкалоиды сперынии, ароматические нитросоединения (после предварительного восстановления хлористым оловом) и др.
- б) Хроматограмму опрыскивают 0,5%-ным раствором *n*-диметиламинобензальдегида в циклогексане (растворяется при нагревании). Хроматограмму можно также протягивать через указанный раствор. После сушки хроматограмму помещают в закрытую камеру, насыщенную парами соляной кислоты.
- в) Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором *n*-диметиламинобензальдегида в 1 н. соляной кислоте.
- г) Для опрыскивания применяют раствор 1 г *n*-диметиламинобензальдегида в смеси 95 мл этанола и 5 мл соляной кислоты.
- д) 1 г *n*-диметиламинобензальдегида растворяют в 5 г фосфорной кислоты и 50 г ледяной уксусной кислоты и добавляют воду до объема 100 мл. После опрыскивания хроматограмму выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100°. Способ применяется в основном для проявления азуленов, которые дают синюю окраску.
- е) Хроматограмму опрыскивают 6%-ным раствором *n*-диметиламинобензальдегида в уксусной кислоте. Метод применяется главным образом для проявления никотиновой кислоты и некоторых ее производных.
- ж) Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором *n*-диметиламинобензальдегида в этаноле, затем сушат и опрыскивают смесью 12 мл уксусного ангидрида с 1 мл концентрированной серной кислоты, после чего вновь сушат. Метод применяется для проявления стероидных кислот.
- з) Хроматограмму опрыскивают 4%-ным раствором *n*-диметиламинобензальдегида в уксусном ангидриде, к которому было добавлено несколько кристалликов безводного ацетата натрия. Хроматограмму в течение 1—2 мин нагревают до 140°. Лимонная кислота образует пурпурно-красное пятно, аконитовая кислота — красное, винная кислота — красно-оранжевое и гиппуровая — оранжевое пятно.

**Д 103. Фенол — гипохлорит натрия**

Хроматограмму опрыскивают 5%-ным раствором фенола в этаноле и после сушки — раствором гипохлорита натрия, приготовленным путем введения хлора в 10—15%-ный раствор едкого натра. Мочевина дает зеленую окраску. С описанным реактивом взаимодействуют также аминокислоты.

**Д 104. Реактив Сакагути**

- а) Сначала хроматограмму опрыскивают смесью 16%-ного раствора мочевины с 0,2%-ным раствором  $\alpha$ -нафтола в этаноле (5:1), затем сушат при температуре не выше 40° и опрыскивают раствором, полученным смешением 3,3 мл брома с 500 мл 5%-ного едкого натра. Этим методом открывают производные гуанидина, которые образуют окраску от розовой до красной.
- б) *Раствор I.* 0,02%-ный раствор  $\alpha$ -нафтола в 20%-ном этаноле (растворяют в этаноле и разбавляют водой) смешивают с водой и 10%-ным едким натром (1:1:2). Полученный раствор выдерживают в холодильнике шкафу в течение месяца.
- Раствор II.* 2 г брома растворяют в 100 мл 5%-ного едкого натра при охлаждении льдом. Раствор выдерживают 2 месяца.
- Хроматограмму опрыскивают сначала раствором I, а затем раствором II. Метод применяется для проявления стрептомицина.
- в) *Модификация для хроматографирования методом погружения.* Хроматограмму пропускают через 0,1%-ный раствор 8-оксихинолина в ацетоне, сушат на воздухе и слегка опрыскивают раствором гипобромита (1 мл брома в 500 мл 0,5 н. едкого натра). Гуанидины дают оранжевую постепенно бледнеющую окраску.

**Д 105. Реактив Вогес-Проскауэра**

- I. 1 г металлического натрия и 0,3 г  $\alpha$ -нафтола растворяют в 30 мл этанола.
- II. 0,1 г диацетила растворяют в этаноле. Хроматограмму сначала опрыскивают раствором I, сушат при комнатной температуре, а затем опрыскивают раствором II. Сушат при повышенной температуре в течение 10—20 мин до появления интенсивно окрашенных пятен производных гуанидина.

**Д 106. Нитропруссид натрия — феррицианид калия**

10%-ный раствор едкого натра, 10%-ный раствор нитропруссид натрия и 10%-ный раствор феррицианида калия смешивают в соотношении 1:1:1; через 30 мин после приготовления реактив можно применять для опрыскивания. В случае использования для обработки хроматограммы путем погружения полученный раствор разбавляют водой (9 частей), а непосредственно перед применением — ацетоном (12 частей). Описываемый метод применяется для проявления производных гуанидина.

**Д 107. Реактив Яффе**

Непосредственно перед опрыскиванием хроматограммы смешивают 3%-ный раствор пикриновой кислоты в этаноле с 10%-ным раствором едкого натра (5:1). Креатинин, гликоциамидин и лактамы других  $\alpha$ -гуанидинокислот с приведенным реактивом образуют оранжевое окрашивание. Для определения креатина хроматограмму необходимо предварительно опрыскивать 0,5 н. серной кислотой и выдерживать при температуре 100° в течение 1 час.

**Д 108. Диазотирование на бумаге**

- а) Хроматограмму опрыскивают 5%-ным водно-этанольным раствором HCl, а затем подвешивают в цилиндре, на дно которого помещают раствор нитрита натрия, подкисленный соляной кислотой.

Через несколько минут хроматограмму вынимают и выдерживают на воздухе в подвешенном состоянии в течение 10 мин. Затем хроматограмму опрыскивают 0,2—1 %-ным раствором *N*-этил-1-нафтиламина или *N*-1-нафтилэтилендиамина. Описанный метод применяется для проявления ароматических аминов.

- б) Диазотирование проводят, как описано выше (Д 108а), однако сочетание осуществляют путем опрыскивания хроматограммы 0,5 %-ным раствором *R*-соли в 5 %-ном растворе  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
- в) Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленным раствором 1 г  $\text{NaNO}_2$  в 100 мл 1 н. соляной кислоты. Примерно через 1 мин хроматограмму опрыскивают раствором  $\beta$ -нафтола в 1 н. едком кали, после чего ее сушат при 60°. Приведенный метод применяется также для проявления сульфамидов.

#### Д 109. Йодноватокислый калий

Хроматограмму опрыскивают 1 %-ным водным раствором йодноватокислого калия и в течение короткого времени (около 2 мин) нагревают до температуры 100—110°. Приведенный метод применяется для анализа симпатомиметических аминов.

#### Д 110. Феррицианид калия

Хроматограмму опрыскивают 0,44 %-ным раствором феррицианида калия в фосфатном буферном растворе с рН 7,8. Норадреналин обнаруживают в виде коричнево-красного пятна, адреналин — в виде светло-красного пятна и метиладреналин — в виде белого пятна. Если образец содержит трихлоруксусную кислоту, применяют раствор феррицианида калия в 0,2 *M* фосфатном буферном растворе с рН 8,3. Раствор хранят в атмосфере аммиака.

### НИТРОСОЕДИНЕНИЯ

#### Д 111. Восстановление нитрогруппы

- а) *Хлористое олово*. Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленной смесью 3 мл 15 %-ного раствора  $\text{SnCl}_2$  с 15 мл концентрированной соляной кислоты и 180 мл воды. Хроматограмму сушат на воздухе. Образующиеся ароматические амины можно проявить, например, реактивом Д 102.
- б) *Хлористый титан*. 15 %-ный раствор  $\text{TiCl}_3$  (1 часть) смешивают с концентрированной соляной кислотой (9 частей) и полученным раствором опрыскивают хроматограмму. Спустя 15 мин еще влажную хроматограмму помещают на 5 мин в атмосферу  $\text{Br}_2$ . Затем хроматограмму тщательно проветривают в токе воздуха. Образующиеся ароматические амины можно проявлять, например, реактивом Д 102 или Д 108. Приведенный способ восстановления является, однако, весьма капризным.

### АМИНОКИСЛОТЫ

#### Д 112. Нингидрин

- а) Для опрыскивания применяют 0,2 %-ный раствор нингидрина в *n*-бутаноле. *n*-Бутанол должен быть абсолютно чистым; если в нем присутствуют примеси, то последние удаляются перегонкой над

металлическим натрием. При комнатной температуре реакция на бумаге протекает довольно медленно, и ее можно ускорить нагреванием до 60°.

- б) 0,2%-ный раствор в этаноле. Лучше, чем Д 112а.
- в) Хроматограмму пропускают через 0,25%-ный раствор нингидрина в безводном ацетоне. При проведении анализа на бумаге, пропитанной щелочным буферным раствором, к реактиву добавляют небольшое количество уксусной кислоты.
- г) Для достижения четко выраженного различия в окраске хроматограмму можно опрыскивать смесью 0,4 г нингидрина, 10 г фенола и 90 г *n*-бутанола.
- д) Хроматограмму опрыскивают или пропускают через 0,1%-ный раствор нингидрина в бензоле, к которому добавляют 0,1% коллидина; для флуоресцентного анализа пролина и оксипролина хроматограмму обрабатывают в течение 1 мин сухим паром.
- е) Для опрыскивания используют раствор, содержащий 0,4% нингидрина и 0,2%  $\text{CoCl}_2$  в изопропаноле.

**Д 113. Стабилизация окраски, полученной при действии нингидрина**

Хроматограмму погружают или опрыскивают реактивом, полученным смешением 1 мл насыщенного водного раствора  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  с 0,2 мл 10%-ной  $\text{HNO}_3$  и добавлением этанола до объема 100 мл. Затем хроматограмму быстро обрабатывают парами аммиака.

**Д 114. Изатин**

- а) Хроматограмму опрыскивают 0,4%-ным раствором изатина в *n*-бутаноле, содержащем 4% уксусной кислоты. После опрыскивания хроматограмму сушат в течение 10 мин при температуре 100°. С описанным реактивом пролин образует интенсивно окрашенное синее пятно, а оксипролин — зеленое пятно.
- б) Хроматограмму погружают в 0,2%-ный раствор изатина в ацетоне, содержащем 4% уксусной кислоты, и нагревают в течение 10 мин до температуры 100—110°. См. табл. 72.
- в) Хроматограмму погружают в 0,2%-ный раствор изатина в ацетоне. После этого хроматограмму можно обработать раствором *n*-диметиламинобензальдегида (Д 102). Оксипролин образует пятно, окрашенное в вишневый цвет.

**Д 115. 1,2-Нафтохинон-4-сульфонат натрия (реактив Фолина)**

- а) По Мютингу. Хроматограмму опрыскивают 0,2%-ным раствором 1,2-нафтохинон-4-сульфоната натрия в 5%-ном растворе  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . После опрыскивания не сушат. Разные аминокислоты дают различное окрашивание.
- б) По Гири и Нагабушанану. 0,3 г 1,2-нафтохинон-4-сульфоната натрия растворяют в 10 мл воды и добавляют чистый ацетон до объема 300 мл. Реактив выдерживают в холодильном шкафу в течение недели. Хроматограмму погружают в полученный реактив и выдерживают в течение 3—5 мин при температуре 80—90°. Интенсивность розовой окраски пятен, которую дают аминокислоты, усиливается при опрыскивании хроматограммы свежеприготовленным раствором едкого натра в этаноле (2 мл 5 н. едкого натра смешивают с 98 мл этанола).

**Д 116. Тропеолин ОО**

Хроматограмму погружают в раствор 15 мг тропеолина ОО в 100 мл смеси этанол — эфир (1:2), а затем обрабатывают парами 3 н. соляной кислоты. При этом появляются желтые пятна аминокислот на красном фоне.

**Д 117. Орцин**

Хроматограмму опрыскивают 0,1%-ным раствором орцина в этаноле, содержащем серную кислоту в концентрации 0,004 н. Затем хроматограмму сушат в течение 30 мин при температуре 110—120°. Появляются белые пятна аминокислот на красно-фиолетовом фоне. В ультрафиолетовом свете наблюдается флуоресценция фона.

**Д 118. о-Фталевый альдегид**

Хроматограмму опрыскивают 0,2%-ным раствором о-фталевого альдегида в ацетоне и нагревают до 50°. Гликокол окрашивается в зеленый цвет, гистидин и триптофан флуоресцируют желтым цветом. Добавка 0,2% мочевины изменяет окраску гликокола до пурпурной; глутаминовая кислота (в системах растворителей, не содержащих кислот) флуоресцирует коричнево-красным цветом. При последующем погружении хроматограммы в 1%-ный раствор едкого кали в этаноле и нагревании в течение 10 мин до 50° и затем в течение 10 мин до 150° появляется флуоресцирующее красным цветом пятно таурина.

**Д 119. Ванилин**

Хроматограмму погружают в 2%-ный раствор ванилина (х.ч.) в *n*-пропаноле и выдерживают в течение 10 мин при температуре 110°. Орнитин флуоресцирует интенсивным, а лизин слабым желто-зеленым цветом. Затем хроматограмму погружают в 1%-ный раствор едкого кали в этаноле и нагревают в течение 10 мин до 110°: орнитин окрашивается сначала в желтовато-розовый цвет, а затем бледнеет. При выдерживании в течение ночи пролин, оксипролин, пипеколиновые кислоты, байкианин и саркозин окрашиваются в красный цвет, гликокол — в коричнево-зеленый, а остальные аминокислоты — в слабый коричневый.

**Д 120. Теревталевый альдегид**

Хроматограмму погружают в 0,2%-ный раствор терефталевого альдегида в ацетоне и выдерживают в течение 10 мин при 105°: гистидин флуоресцирует желтовато-зеленым цветом, триптофан — коричневым. Если к реактиву добавить 10% уксусной кислоты и нагреть в течение 3 мин до 105°, то триптофан флуоресцирует синим, а триптамиин — желтовато-зеленым цветом.

**Д 121. Йодная кислота — реактив Несслера**

Раствор реактива Несслера добавляют к твердой йодной кислоте до растворения образовавшегося осадка. При опрыскивании хроматограммы реагируют серин и треонин.

**Д 122. α-Нитрозо-β-нафтол (реакция Гернгросса — Фосса — Герфельда)**

Сначала хроматограмму опрыскивают 0,01%-ным раствором α-нитрозо-β-нафтола в этаноле, а затем 10%-ной азотной кислотой.

После опрыскивания хроматограмму нагревают до 90°. Приведенный метод применяется для определения тирозина и его производных.

**Д 123. Бром**

0,5 мл брома добавляют к смеси 50 мл уксусной кислоты и 50 мл воды. Хроматограмму опрыскивают полученным раствором и сушат в течение 3—5 мин при температуре 90°. Гистидин проявляется в виде коричневого пятна, которое при действии аммиака краснеет. Многие соединения при обработке хроматограммы этим реактивом флуоресцируют. Чувствительность метода для гистидина составляет приблизительно 10 мкг.

**Д 124. Сульфат церия — арсенит натрия**

- а) *Раствор I.* 10%-ный раствор  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  в 1 н. серной кислоте.  
*Раствор II.* 5%-ный раствор арсенита натрия в 1 н. серной кислоте (5 г арсенита натрия растворяют в 30 мл 1 н. едкого натра и по каплям прибавляют к 65 мл 1 н. серной кислоты при перемешивании и температуре 0—5°, после чего добавляют воду до объема 100 мл).  
*Раствор III.* 1 н. серная кислота.

Фильтровальную бумагу, помещенную на стеклянную пластинку, пропитывают смесью растворов I+II (1:1). На эту бумагу помещают высушенную хроматограмму и прикрывают другой стеклянной пластинкой. Выдерживают 30 мин, а затем сушат в атмосфере, не содержащей йода. В результате реакции появляются белые пятна на желтом фоне, которые сохраняют свою окраску в течение 1—2 дней. Эти пятна лучше всего фотографировать в синем свете. При полуколичественном анализе пятна можно измерять фотометрическим методом в ультрафиолетовом свете (таким способом можно определять от 0,01 до 0,1 мкг йодида и от 0,1 до 1 мкг тироксина). Для количественного анализа хроматограмму пропитывают смесью растворов I+II+III (4:4:1 для 0,01—0,5 мкг органически связанного йода или 4:4:5 для 0,4—1,5 мкг йодида) и измеряют затем флуоресцирующие участки ( $\text{Ce}^{3+}$ ) у фронта жидкости (Лисицкий).

- б) Согласно Драгуну и Лангеру, добавкой ферроина к смеси растворов I+II (вплоть до концентрации 0,0066—0,01 М) можно повысить контрастность красных пятен на синем фоне. Окраска сохраняется в течение 48 час.  
в) Согласно Флетчеру и Стенли, обесцвечивание фона следами йода, содержащимися в атмосфере, можно предотвратить дополнительным опрыскиванием хроматограммы 1%-ным раствором *о*-фенилендиамина в ацетоне. Фон шоколадного цвета является более устойчивым и контрастным.

**Д 125. Тимоловый синий**

Хроматограмму опрыскивают 0,04%-ным раствором тимолового синего в смеси этанола и *n*-бутанола (1:1) и 0,01 н. серной кислотой. Диметиламинокислоты проявляются в виде желтых пятен на красном фоне.

## БЕЛКИ И ФЕРМЕНТЫ

**Д 126. *n*-Нитрофенилстеарат**

Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором *n*-нитрофенилстеарата. После инкубации во влажной камере при температуре

40° липазы образуют желтые пятна, интенсивность которых усиливается при действии аммиака.

**Д 127. Крахмал — йод**

Хроматограмму опрыскивают 2%-ным раствором крахмала. Бумагу инкубируют во влажной камере в течение 15—60 мин при температуре 40—50°. После сушки при комнатной температуре хроматограмму опрыскивают 0,05 М раствором йода. Амилазы проявляются в виде белых пятен на фиолетовом фоне, который постепенно приобретает коричневый оттенок.

**Д 128. Фосфат фенолфталеина**

Агаровую пластинку получают из 2 г агар-агара, 0,1 г натриевой соли фосфата фенолфталеина и 30 мл 0,02 М ацетатного буферного раствора с рН 5,2 для случая кислой фосфатазы или 30 мл гликоколового буферного раствора с рН 9,2, содержащего 0,58% хлористого натрия, для случая щелочной фосфатазы; в раствор добавляют воду до объема 100 мл. После нагревания в автоклаве горячий раствор наливают на стеклянную пластинку и охлаждают. Хроматограмму помещают на эту пластинку и оставляют в течение 4—12 час при комнатной температуре. После этого бумагу осторожно снимают, чтобы не разрушить слой агара, и опрыскивают 0,1 н. едким натром. Появляются пятна фосфатаз.

**Д 129. Желатина**

Непроявленную киноплёнку увлажняют фосфатным буферным раствором с рН 6,8 и помещают на хроматограмму, которая смочена этим же буферным раствором. Бумагу затем выдерживают во влажной камере термостата при температуре 30°. Через 20—60 мин желатиновый слой растворяется в месте расположения протеолитических ферментов. Таким образом, в темном желатиновом слое появляется прозрачное пятно.

**Д 130. Молоко — генциановый фиолетовый — йод**

Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленным 10%-ным раствором сухого молока, содержащим 2,2%  $\text{CaCl}_2$ , помещают на 5—60 мин во влажную камеру при температуре 45°, а затем опрыскивают раствором генцианового фиолетового с йодом. Пепсин и реннин проявляются при этом в виде фиолетовых пятен на розовом фоне.

**Д 131. Проявление уреазы манометрическим методом**

Хроматограмму разрезают на узкие полоски длиной 3 см, которые затем помещают в манометрический сосудик Варбурга, содержащий 3 мл ацетатного буферного раствора с рН 5. В боковой отросток помещают 0,2 мл 10%-ного раствора мочевины. Уравновешивание проводят в течение 30 мин при 37°. Затем оба раствора смешивают и определяют количество углекислого газа, выделившегося за 1 час. Этот метод может служить как для количественного, так и для качественного анализа уреазы.

**Д 132. Бромфеноловый синий — двухлористая ртуть**

Хроматограмму погружают на 5 мин в 1%-ный раствор бромфенолового синего в этаноле, насыщенный двухлористой ртутью. Влаж-

ную хроматограмму обесцвечивают в 0,5%-ном растворе уксусной кислоты, который в течение 30 мин меняют примерно 5 раз. Хроматограмму, фон которой становится чисто белым, сушат между двумя листами фильтровальной бумаги. Прежде чем бумага высохнет, желтую окраску пятен можно изменить в интенсивно синюю путем обработки парами аммиака. Количественный анализ можно проводить путем экстрагирования красителя 5%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 50%-ном водном растворе метанола с последующим колориметрированием или непосредственным фотометрированием.

**Д 133. Эозин — метилоранж**

1,5 г лимонной кислоты растворяют в 1263 мл воды, а затем разбавляют 51 мл глицерина и 3000 мл ацетона. После тщательного перемешивания к раствору прибавляют 0,6 г метилоранжа и 0,6 г эозина. Хроматограмму погружают в приготовленный раствор на 5 мин, затем промывают 8 л воды, подкисленной 0,5 мл концентрированной серной кислоты, и нагревают до 45°. Хроматограмму отжимают между листами фильтровальной бумаги и сушат при температуре 37°. Приведенный метод служит для окраски белков.

**Д 134. Бензидин — перекись водорода**

Протеингеминовый комплекс проявляют путем опрыскивания насыщенным раствором бензидина в этаноле, смешанном с 3%-ным раствором перекиси водорода (1 : 1) и подкисленным ледяной уксусной кислотой.

## ПУРИНЫ, ПИРИМИДИНЫ, АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

**Д 135. Азотнокислая ртуть — сульфид аммония**

После промывания эфиром хроматограмму опрыскивают или погружают в раствор 0,25 М  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  в 0,5 н. азотной кислоте, затем промывают 0,5 н. азотной кислотой и водой. После сушки хроматограмму обрабатывают разбавленным раствором сернистого аммония. В местах расположения пуриновых и пиримидиновых оснований появляются черные пятна  $\text{HgS}$ . Чувствительность реакции составляет приблизительно 10 мкг.

**Д 136. Азотнокислое серебро — бихромат натрия**

Хроматограмму погружают в 2%-ный раствор  $\text{AgNO}_3$ , сушат в течение 5 мин на воздухе, а затем погружают в ванну, содержащую 0,5%-ный раствор  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . Выделяющийся хромат серебра окрашивает хроматограмму в красный цвет. При последующем погружении хроматограммы в 0,5 н. азотную кислоту фон обесцвечивается, в то время как пятна пуринов остаются окрашенными в красный цвет.

**Д 137. Эозин — двухлористая ртуть**

Хроматограмму погружают на 2 мин в раствор 20 мг эозина и 3,25 г  $\text{HgCl}_2$  в 10 мл этанола. Избыток реагентов отмывают затем 50%-ным этанолом. Пурины образуют розовые пятна. Чувствительность приведенного метода составляет около 0,2 мкг.

**Д 138. Реактив Дипе**

Хроматограмму опрыскивают 0,5%-ным раствором солянокислого цистеина в 3 н. серной кислоте. После нагревания в течение 5—20 мин до температуры 85° появляются слабые красные пятна. Пуриновые дезоксирбозиды взаимодействуют гораздо быстрее, чем пиримидиновые.

**Д 139. Перманганат калия — хлорирование**

Хроматограмму слегка опрыскивают 0,07%-ным водным раствором перманганата калия и сразу же помещают в атмосферу хлора на 15 сек. Затем хроматограмму сушат в течение 5 мин при 100°. Возникающее вначале фиолетовое окрашивание хроматограммы исчезает и появляются пятна аденозинполифосфорных кислот, имеющие окраску от желтой до оранжевой. При последующем опрыскивании 3 н. едким кали пятна окрашиваются в красный цвет. Окраска является обратимой: до рН 7 — желтая, выше рН 7 — красная. Опрыскивание едким кали можно заменить помещением хроматограммы в атмосферу аммиака, главным образом в тех случаях, когда другие фосфорнокислые эфиры будут обнаруживаться молибденовым реактивом. При проявлении могут разрушаться некоторые восстановители. Чувствительность реакции для случаев АМФ, АДФ, АТФ, ДПН и ТПН составляет 0,2  $\mu\text{г}/\text{см}^2$ .

**Д 140. Тиокарбамидная реакция**

Реактив готовят из раствора трихлоруксусной кислоты (к 25 г кислоты добавляют воду до объема 50 мл) и гидрата окиси рутения(III) [40 мг гидрата окиси рутения(III) после сушки в эксикаторе растворяют в 1 мл воды]. Перед применением реактив по крайней мере в течение 24 час необходимо выдерживать в темноте, чтобы добиться красновато-коричневого тона. Реактив устойчив в течение 3—4 недель. После опрыскивания хроматограмму выдерживают в течение 5—10 мин при температуре 80°. Серусодержащие производные пуринов и пиримидинов дают в результате реакции окраску от зеленой до синей.

**Д 141. Хлорирование — аммиак**

Хроматограмму при 50—100%-ном насыщении водой помещают в атмосферу хлора, а после сушки при 80—90° помещают на несколько минут в атмосферу аммиака. Производные ксантина образуют фиолетовую окраску, все остальные пурины флуоресцируют зеленым цветом. Чувствительность реакции составляет около 0,2  $\mu\text{г}$ .

**Д 142. Азотнокислый кобальт(II) (реакция Цвиккера)**

Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  в абсолютном этаноле, сушат в течение 1—2 мин при 80°, а затем обрабатывают парами аммиака или органических оснований (морфолин, пиперидин и т. п.). Барбитураты образуют фиолетовые пятна.

**Д 143. Сернокислая медь(II) — пиридин — хинин**

Хроматограмму опрыскивают раствором, содержащим 200 мг  $\text{CuSO}_4$ , 2 мл пиридина и 20 мг хинина в 100 мл воды. После сушки хроматограмму обрабатывают парами соляной кислоты. Барби-

тураты проявляются в виде гасящихся пятен на флуоресцирующем фоне. Чувствительность реакции составляет 5—10 мкг. Хроматограмму можно еще опрыскать раствором перманганата калия (*D 36*) для идентификации ненасыщенных барбитуратов.

## АЛКАЛОИДЫ

### Д 144. Реактив Драгендорфа

а) *Раствор I.* 850 мг основного азотнокислого висмута растворяют в 40 мл воды и прибавляют 10 мл уксусной кислоты.

*Раствор II.* 8 г йодистого калия растворяют в 20 мл дистиллированной воды.

Оба раствора смешивают и выдерживают в темной склянке в течение нескольких месяцев. Для опрыскивания 10 мл запасного раствора разбавляют 20 мл уксусной кислоты и 100 мл воды. Проявлять хроматограмму этим раствором можно также при помощи погружения. Алкалоиды дают красное окрашивание на светло-желтом фоне.

б) *Раствор I.* 17 г основного азотнокислого висмута и 200 г винной кислоты растворяют в 800 мл воды.

*Раствор II.* 160 г йодистого калия растворяют в 400 мл воды.

Оба раствора смешивают. Для опрыскивания берут 50 мл основного раствора, 100 г винной кислоты и 500 мл воды. Запасный раствор устойчив в течение нескольких месяцев, разбавленный — несколько недель. Чувствительность реакции — около 5 мкг.

### Д 145. Превращение в четвертичные основания

Для веществ, не реагирующих с реактивом Драгендорфа, хроматограмму после высушивания опрыскивают 10%-ным водным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , вновь высушивают и затем погружают в диметилсульфат. Избыток последнего отжимают между двумя листами фильтровальной бумаги и нагревают хроматограмму до 90° в течение 10 мин. Затем опрыскивают реактивом Драгендорфа (*D 144*).

### Д 146. Сульфат церия(IV)

Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором сульфата церия в 2 н. серной кислоте. Некоторые алкалоиды реагируют мгновенно, другие — лишь после нагревания. Кроме алкалоидов кураре, в реакцию вступают и многие другие алкалоиды.

### Д 147. Нитропруссид натрия — трихлоруксусная кислота

Хроматограмму опрыскивают 3%-ным раствором нитропруссиды натрия в 50%-ной трихлоруксусной кислоте. Алкалоиды карболиновой группы дают флуоресценцию в ультрафиолетовом свете.

### Д 148. Серная кислота — углекислый натрий

На хроматограмму наносят точками (микрокаплями) 90%-ную серную кислоту, затем опрыскивают 9%-ным раствором углекислого натрия. Спустя 30 мин наблюдают флуоресценцию карболиновых алкалоидов в ультрафиолетовом свете.

**Д 149. Реактив Майера**

Отдельно растворяют 13,55 г  $\text{HgCl}_2$  и 49,8 г  $\text{KJ}$  в 20 мл воды, смешивают оба раствора и добавляют воду до объема 1000 мл. Перед использованием к раствору прибавляют  $1/10$  объема 17%-ной соляной кислоты. После опрыскивания на хроматограмме появляются бледно-желтые пятна стероидных алкалоидов, которые в ультрафиолетовом свете в значительной степени бледнеют. Кроме того, бумагу можно промыть в течение 10 мин водой и после стекания воды опрыскать раствором 5 г  $\text{ZnCl}_2$  в 80 мл воды и 15 мл концентрированной соляной кислоты. При последующем опрыскивании приблизительно 15%-ным раствором аммиака стероидные алкалоиды проявляются в виде темно-коричневых пятен. Окраска пятен, однако, неустойчива.

**ДРУГИЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ,  
СОДЕРЖАЩИЕ АЗОТ****Д 150. Диметилдигидрорезорцин — хлорное железо**

Хроматограмму опрыскивают 10%-ным раствором диметилдигидрорезорцина (димедон) в этаноле, затем сушат и опрыскивают 5%-ным раствором  $\text{FeCl}_3$ . Альдегиды и кетоны пиридиновых оснований дают пятна, окрашенные в фиолетовый — красно-коричневый цвет. Чувствительность реакции составляет около  $1 \text{ мкг/см}^2$ .

**Д 151. 4-Метилумбеллиферон или флуоресцин**

20 мг 4-метилумбеллиферона растворяют в 35 мл этанола, затем добавляют воду до объема 100 мл (во втором случае растворяют 50 мг флуоресцина в 100 мл этанола). После опрыскивания одним из этих реактивов хроматограмму сушат. Затем одновременно с облучением ультрафиолетовым светом обрабатывают хроматограмму парами аммиака до достижения максимальной видимости постепенно затухающих пятен.

**Д 152. Реакция Кёнига**

Для всех модификаций реакции Кёнига общим является помещение хроматограммы в атмосферу бромциана. Бромциан можно приготовить из насыщенного раствора охлаждаемой льдом бромной воды путем прибавления к ней охлажденного льдом 10%-ного раствора  $\text{NaCN}$  до исчезновения окрашивания бромом.

а) Хроматограмму помещают на 1 час в стеклянный сосуд над раствором  $\text{BrCN}$ . Затем ее опрыскивают раствором, приготовленным растворением 2 г *n*-аминобензойной кислоты в 75 мл 0,75 н. соляной кислоты и добавлением этанола до объема 100 мл. Кроме окрашивания в видимом свете, наблюдают флуоресценцию в ультрафиолетовом свете.

б) 3 г этилового эфира *n*-аминобензойной кислоты можно прибавлять непосредственно к 100 мл смеси *трет*-амилового спирта с водой (100 : 20). Для проявления алкалоидов, содержащихся в табаке, в этом случае следует использовать бумагу, пропитанную фосфатным буфером с pH 6,5. По окончании проявления и высушивания хроматограмму опрыскивают 0,2 М ацетатным буфером с pH 5,6 и сразу же помещают в камеру с  $\text{BrCN}$ . Пятна можно наблю-

дать уже через 5 мин, лучше всего в свете люминесцентной лампы. в) Хроматограмму после высушивания опрыскивают 2%-ным раствором анилина в фосфатном буферном растворе с pH 6,1. После этого ее помещают на 15 мин в камеру с BrCN. Кроме того, хроматограмму можно опрыскивать 20%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Этот метод рекомендуется использовать для проявления алкалоидов, содержащихся в табаке.

г) Хроматограмму опрыскивают 2%-ным водным раствором *о*-фенилендиамина и после высушивания помещают в атмосферу BrCN. Этот реактив по сравнению с реактивом, содержащим *п*-аминобензойную кислоту, имеет преимущество, состоящее в том, что в этом случае хорошо реагируют даже производные изоникотиновой кислоты уже в количестве 0,2 мкг.

#### Д 153. Дiazотирование и реакция азосочетания после обработки гипобромитом

*Раствор гипобромита натрия.* 4 мл 2,5 н. едкого натра разбавляют водой приблизительно до объема 45 мл, а затем прибавляют 2 мл раствора брома (12,5 г NaBr смешивают с 12,5 г брома и разбавляют водой до объема 100 мл). К полученному раствору добавляют воду до объема 50 мл. Этот раствор выдерживают в темноте в течение 24 час.

Хроматограмму опрыскивают раствором гипобромита. Через 15 мин после опрыскивания хроматограмму сушат в течение 5 мин при 100° и опрыскивают 2,4 н. соляной кислотой с 0,1%-ным раствором  $\text{NaNO}_2$  (1 : 1), а через 1 мин — смесью 0,5%-ного  $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$  с 0,1%-ным раствором N-(1-нафтил)-этилендиамина  $\cdot 2\text{HCl}$  (1 : 1). Этот способ проявления используют для обнаружения карбамидной группы в пиридиновом или ароматическом ядре (реакция Гофмана).

#### Д 154. Реактив Сальковского

Для опрыскивания хроматограммы используют смесь, состоящую из 50 частей 5%-ной хлорной кислоты и 1 части 0,05 М раствора  $\text{FeCl}_3$ . Некоторые производные индола дают интенсивную флуоресценцию даже спустя несколько часов.

#### Д 155. Нитрит натрия — соляная кислота

а) Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленным раствором 1 г  $\text{NaNO}_2$  в 100 мл 1 н. соляной кислоты и нагревают в сушильном шкафу до 100°. Производные индола дают с этим реактивом красное окрашивание, а производные тиазола — светло-зеленое.

б) Хроматограмму опрыскивают 0,5%-ным водным раствором  $\text{NaNO}_2$  и после высушивания помещают в пары соляной кислоты.

#### Д 156. Реактив Прохазки

Хроматограмму опрыскивают смесью, состоящей из 35—40%-ного раствора формальдегида, концентрированной соляной кислоты и воды (1 : 1 : 2). Сушат хроматограмму при температуре 90°. Этот реактив используют для проявления многочисленных производных индола.

#### Д 157. Реактив Шлезингера

Хроматограмму опрыскивают суспензией 5%-ного раствора ацетата цинка в 90%-ном этаноле (перед опрыскиванием суспензию необ-

ходимо взболтать). После опрыскивания хроматограмму оставляют сохнуть на воздухе. При освещении хроматограммы ультрафиолетовым светом наблюдается флуоресценция уробилина и стеркобилина.

**Д 158. Формальдегид — реактив Шиффа**

Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором формальдегида, избыток которого испаряют при 110°. Затем хроматограмму опрыскивают реактивом Шиффа (Д 28а). Триазины реагируют в этом случае с образованием красного окрашивания.

### ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ СЕРУ

**Д 159. Ацетат меди(II) — родамин В**

Хроматограмму погружают на 1 мин в 0,5%-ный водный раствор ацетата меди. Избыток ацетата меди вымывают водой и хроматограмму сушат при 105°. Затем хроматограмму погружают в 0,1%-ный раствор родамина В, снова промывают ее водой и сушат. Липофильные алкилсульфаты видны в ультрафиолетовом свете.

**Д 160. Гидросульфит натрия**

Хроматограмму опрыскивают раствором 0,3 г гидросульфита натрия в смеси, состоящей из 15 мл воды, 5 мл аммиака и 1 мл 2,5 н. едкого натра. Антрахинонсульфокислоты проявляются в виде оранжевых пятен, окраска которых неустойчива.

**Д 161. Реактив Ру**

10 г нитропруссид натрия растворяют в 100 мл воды, затем к раствору прибавляют 2 мл 33%-ного едкого натра и 5 мл 0,1 н.  $\text{KMnO}_4$ . После перемешивания раствор фильтруют. Хроматограмму опрыскивают полученным раствором и наблюдают в ультрафиолетовом свете. Этот способ проявления используют для обнаружения сульфамидов.

**Д 162. Нитропруссид натрия —  $\text{NaCN}$**

а) *Раствор I.* 1,5 г нитропруссид натрия растворяют в 5 мл 2 н. серной кислоты и к раствору прибавляют 95 мл метанола и 10 мл 28%-ного раствора аммиака. Отфильтрованный раствор выдерживают несколько дней в холодильном шкафу.

*Раствор II.* 2 г  $\text{NaCN}$  растворяют в 5 мл воды и раствор разбавляют 95 мл метанола.

*Раствор III.* Растворы I и II, взятые в двукратной концентрации, смешивают в соотношении 1 : 1.

Погружая хроматограмму в раствор I, обнаруживают соединения, содержащие группы  $-\text{SH}$ . Эти соединения проявляются на хроматограмме в виде красных пятен. Хроматограмму оставляют сохнуть на воздухе, а затем погружают в раствор II или III. Соединения, содержащие группу  $-\text{S}-\text{S}-$ , проявляются в виде красных пятен на желтоватом фоне. Аргинин с раствором I дает пятна, окрашенные в оранжевый цвет. Однако постепенно их цвет изменяется до серосинего. После выцветания пятен можно провести еще одну операцию — проявление с помощью нингидрина.

- б) Сначала хроматограмму опрыскивают 5%-ным раствором  $\text{NaCN}$  в 25%-ном этаноле с 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , а через несколько минут раствором 2%-ного нитропруссид натрия в 75%-ном этаноле. Этот способ проявления особенно удобен для обнаружения дисульфидов органических соединений.

**Д 163. Йод-азидный реактив**

- а) Готовят 0,1 н. раствор йода в воде, содержащей  $\text{KJ}$  (присутствие  $\text{KJ}$  необходимо для растворения йода). 50 мл этого раствора смешивают с 50 мл этанола и к полученному раствору прибавляют 1,5 г  $\text{NaN}_3$ . Реактив хорошо сохраняется в закупоренной бутылке коричневого стекла. Этим реактивом обесцвечиваются пятна метионина, цистина и цистеина, которые позднее начинают флуоресцировать. Чувствительность реактива около 5 мкг.
- б) 1 г  $\text{NaN}_3$  растворяют в 0,005 н. растворе йода. Хроматограмму опрыскивают этим реактивом, а затем раствором крахмала. Метод используют для проявления тиомочевин, пенициллинов и т. п.

**Д 164. Сульфат меди(II)**

Хроматограмму опрыскивают 10%-ным раствором  $\text{CuSO}_4$  и нагревают в сушильном шкафу до  $120^\circ$  в течение 20 мин. Этот способ используют для проявления гликозидов, содержащих серу; они образуют коричневые пятна на зеленом фоне.

## ВИТАМИНЫ

**Д 165. 2,2'-Дипиридил — хлорное железо**

Хроматограмму опрыскивают 0,25%-ным раствором 2,2'-дипиридила в этаноле, а затем 0,1%-ным раствором  $\text{FeCl}_3$  также в этаноле. Токоферолы образуют красные пятна на белом фоне, которые постепенно розовеют.

**Д 166. Диазотированный о-дианизидин**

Хроматограмму опрыскивают 2%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , а затем диазотированным о-дианизидином (0,5 г чистого о-дианизидина  $\cdot 2\text{HCl}$  растворяют в 60 мл воды и к раствору добавляют 6 мл концентрированной соляной кислоты и 12 мл 5%-ного водного раствора  $\text{NaNO}_2$ ; через 5 мин добавляют 12 мл 5%-ного водного раствора мочевины. Реактив можно использовать через 24 час после приготовления и его свойства сохраняются 10 дней). В результате реакции  $\gamma$ -токоферол дает пурпурную окраску,  $\delta$ -токоферол — красную,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ - и  $\zeta$ -токоферолы не взаимодействуют.

**Д 167. Перевод тиамин в тиохром**

- а) Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором феррицианида калия, содержащим 0,6%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Наблюдается флуоресценция в ультрафиолетовом свете.
- б) Хроматограмму опрыскивают смесью 2,5%-ного раствора феррицианида калия с 10%-ным едким натром в этаноле (1 : 20 : 40).

**Д 168. Йодовисмутат калия**

5 г йодовисмутата калия кипятят в 100 мл воды с 0,5 мл концентрированной соляной кислоты. После охлаждения раствор фильтруют.

Хроматограмму несколько раз опрыскивают этим раствором, затем промывают фон эфиром, насыщенным водой. Однако пятна некоторых соединений бледнеют. Чем выше основность соединения, содержащего азот, тем более синюю окраску имеют пятна (бетаин, ацетилхолин). Остальные азотсодержащие соединения дают оранжевую (тиаминтрифосфат) и красно-фиолетовую (тиамин) окраску.

**Д 169. Треххлористый титан —  $\alpha$ -нафтиламин**

Восстановительное расщепление фолиевой кислоты с образованием *n*-аминобензойной кислоты можно осуществить непосредственно на хроматограмме, например реактивом Д 1116. Коменда рекомендовал для этой цели опрыскивать хроматограмму 10%-ным раствором треххлористого титана в концентрированной соляной кислоте с 15%-ным водным раствором трехзамещенного цитрата натрия (1 : 1), после чего выдерживать ее в течение 24 час на воздухе. Затем следует опрыскивание 0,2%-ным раствором  $\text{NaNO}_2$  в 0,1 н. соляной кислоте, частичная сушка хроматограммы и опрыскивание 0,2%-ным раствором  $\alpha$ -нафтиламина в этаноле. В местах, где находится фолиевая кислота, появляются красные пятна.

**Д 170. Питательная среда из агара для биоавтографии витамина  $\text{B}_{12}$ .**

*Раствор I.* К смеси 200 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и 80 г  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  добавляют воду до объема 2000 мл.

*Раствор II.* К смеси 120 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и 40 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  добавляют воду до объема 2000 мл.

*Раствор III.* 0,094 г бората натрия (декагидрат), 0,25 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,54 г  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,46 г  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4,9 г  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и 0,02 г молибденовокислого аммония разбавляют водой до объема 1000 мл и добавляют концентрированную соляную кислоту до прояснения раствора (приблизительно 0,5 мл).

Для получения питательной среды смешивают 75 мл раствора I с 75 мл раствора II и 0,15 мл раствора III. Затем добавляют 3 мл 5%-ного раствора  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,25 г аспарагина, 1,5 мл 0,1%-ного раствора  $\text{CaCl}_2$  и разбавляют водой до объема 1386 мл. Раствор наливают порциями по 120 мл в колбы Эрленмейера, добавляют по 2 г агара в каждую, после чего помещают в автоклав. При охлаждении приблизительно до 46° в каждую колбу добавляют 10 мл стерильного 13%-ного раствора глюкозы. Агар разливают затем в чашки.

**Д 171. 2,6-Дихлорфенолиндифенол**

Хроматограмму опрыскивают 0,1%-ным раствором 2,6-дихлорфенолиндифенола в этаноле. Проявляются белые пятна аскорбиновой кислоты.

**Д 172. Йод — крахмал**

Хроматограмму опрыскивают 0,001—0,005%-ным раствором йода (с небольшим количеством КJ) в 4%-ном растворе крахмала. Аскорбиновая кислота образует белые пятна на синем фоне.

**Д 173. Фенилгидразин**

Хроматограмму опрыскивают раствором 0,3 г фенилгидразина и 0,45 г уксуснокислого натрия в 10 мл воды. Метод применяют для определения дегидроаскорбиновой кислоты.

**Д 174. *o*-Фенилендиамин**

Хроматограмму опрыскивают раствором 0,1 г *o*-фенилендиамина в смеси 50 мл 0,1 н. серной кислоты и 50 мл этанола. После сушки наблюдают флуоресценцию в ультрафиолетовом свете.

**Д 175. Соляная кислота**

Хроматограмму опрыскивают смесью 1 части концентрированной соляной кислоты и 3 частей воды. После опрыскивания хроматограмму сушат при 90—95°.

**АНТИБИОТИКИ****Д 176. Питательная среда для биоавтографии пенициллина**

- а) К 1000 мл дистиллированной воды прибавляют 6 г пептона, 1,5 г мясного экстракта, 1 г глюкозы и 2,5% чистого агара, который предварительно вымачивают в течение 24 час. Раствор осветляют кипячением, устанавливают рН 6,5 и подвергают стерилизации.
- б) Среду можно приготовить проще, прибавляя 2,5% кукурузного экстракта (cornsteep) к 2,5% агара.  
После стерилизации в среду при 50° вносят 1% бульонной культуры стандартного микроорганизма *B. subtilis* SD (PC I 220), имеющей возраст 24 час, и разливают агар слоем толщиной около 1 см.

**Д 177. Диацетил —  $\alpha$ -нафтол**

Хроматограмму опрыскивают раствором, полученным смешиванием 0,1%-ного водного раствора диацетила с 20%-ным водным едким кали и 2,5%-ным раствором  $\alpha$ -нафтола в этаноле (1 : 1 : 1). Спустя несколько минут проявляется красное пятно стрептомицина. Чувствительность около 5 мкг.

**ИНСЕКТИЦИДЫ****Д 178. Перманганат калия — формальдоксим**

Хроматограмму погружают приблизительно на 5 сек в свежеприготовленный 0,1%-ный раствор перманганата калия. Затем промывают хроматограмму в течение 10 мин в токе воды и сушат при температуре 110°. Во второй раз хроматограмму опрыскивают смесью формальдоксимового реактива (7 г солянокислого гидроксилamina и 3 г параформальдегида кипятят с 10 мл воды до тех пор, пока не получится прозрачный раствор) с целлозольвом и 40%-ным водным раствором едкого натра (1 : 10 : 1). Спустя приблизительно 2 мин после опрыскивания на оранжевом фоне появляются красно-коричневые пятна пиретринов.

**Д 179. Перманганат калия — бензидин**

Хроматограмму погружают в 0,1%-ный раствор  $\text{KMnO}_4$ . После отмывания избытка реактива хроматограмму сушат, затем погружают в 0,5%-ный раствор бензидина в ацетоне, содержащий 5% уксусной кислоты. Пиретроиды образуют пятна, окрашенные в интенсивный синий цвет. Чувствительность реакции менее 1 мкг.

**Д 180. Реактив Дениже**

К 50 мл воды прибавляют постепенно 10 мл концентрированной серной кислоты, а затем в полученном растворе растворяют 2,5 г окиси ртути. После опрыскивания хроматограммы этим раствором проявляются розовые пятна пиретринов I. Цвет пятен быстро изменяется (красный, затем коричневый). Пиретрины II дают желтое окрашивание после нагревания хроматограммы до 70° в течение 7—10 мин. Это окрашивание устойчиво приблизительно в течение 1 час, поэтому его можно фотометрировать. Чувствительность реакции составляет около 30 мкг.

**Д 181. Азотнокислое серебро (для обнаружения органических соединений, содержащих галоиды)**

- а) Хроматограмму после опрыскивания водным 0,05 н. раствором азотнокислого серебра сушат и снова опрыскивают 37%-ным водным раствором формальдегида. Еще слегка влажную хроматограмму опрыскивают 2 н. водным раствором едкого кали и сушат 30 мин при температуре 130—135°. Затем хроматограмму опрыскивают концентрированной азотной кислотой, смешанной с 30%-ной перекисью водорода (1 : 1). После высушивания хроматограмму подвергают действию света. Этим способом можно обнаружить все хлорированные инсектициды.
- б) Хроматограмму опрыскивают 1 н. раствором едкого кали в метаноле. После стекания метанола хроматограмму нагревают в течение 30 мин при температуре 130—135°, затем опрыскивают 0,05 н. раствором азотнокислого серебра с азотной кислотой (1 : 1). После частичного высушивания хроматограмму выставляют на солнечный свет. Этим способом можно обнаружить только изомеры гексахлорциклогексана.
- в) Хроматограмму погружают в дважды перегнанный моноэтиламин и сушат 30 мин при температуре 100°. Затем хроматограмму погружают в 0,1 н. раствор азотнокислого серебра с азотной кислотой (10 : 1). После промывания водой хроматограмму облучают ультрафиолетовым светом (254 мμ). Изомеры гексахлорциклогексана образуют пятна, окрашенные в коричневый цвет. Чувствительность реакции составляет около 5 мкг.
- г) Хроматограмму опрыскивают смесью 0,05—0,1 н. раствора азотнокислого серебра и концентрированного аммиака (1 : 1) и нагревают 5 мин при 100°. Затем хроматограмму опрыскивают повторно, но на этот раз реактив содержит вдвое большее количество концентрированного аммиака. После этого хроматограмму прополаскивают в течение 20 мин в ванне, наполненной 18%-ным раствором аммиака. Затем хроматограмму промывают водой. Этот метод проявления используют для обнаружения инсектицидов типа систокс и малатион.
- д) Хроматограмму прополаскивают в 1%-ном водном растворе азотнокислого серебра. Избыток реактива вымывают водой. Затем хроматограмму подвергают действию света и проявляют способом, аналогичным способу проявления фотобумаги. Всю операцию проводят в темной комнате. Этот метод используют для обнаружения 5,6-дибромпроизводных стерина.

**Д 182. Каталитическое дехлорирование солями металлов**

Насыщенный водный раствор  $\text{FeSO}_4$  [или  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ] взбалтывают с пятикратным количеством уксусной кислоты. Полученный раствор центрифугируют. Хроматограмму обильно опрыскивают этим реактивом. После нагревания хроматограммы на ней появляются темные пятна ДДТ, гексахлорциклогексана, хлордана и токсафена. Чувствительность этого метода проявления составляет около 25  $\mu\text{г}$ .

**Д 183. Сульфат железа(II)**

Хроматограмму опрыскивают 2 н. раствором едкого кали в метаноле, а через 10 мин — раствором сульфата железа (1 г  $\text{FeSO}_4$  растворяют в 50 мл воды, прибавляют 20 мл соляной кислоты и воду до объема 100 мл). Дилан проявляется в виде коричневого пятна, которое через несколько минут исчезает.

**Д 184. N-Бромсукцинимид — флуоресценция**

Хроматограмму слегка опрыскивают 0,002 М раствором N-бромсукцинимид в метилхлороформе, дважды промытым водой. После того как растворитель улетучится, хроматограмму опрыскивают 0,0003 М раствором флуоресцеина в этаноле. Органические соединения, содержащие серу, проявляются в виде зеленых пятен на розовом фоне. В ультрафиолетовом свете наблюдается гашение пятен. Чувствительность реакции составляет 1—10  $\mu\text{г}$ .

**Д 185. Едкое кали**

Хроматограмму опрыскивают 1,5—2 н. раствором едкого кали в этаноле и затем нагревают до 105°.

**НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА****Д 186. Бензидин**

Хроматограмму опрыскивают раствором бензидина (0,05 г бензидина растворяют в 10 мл ледяной уксусной кислоты и затем разбавляют водой до 100 мл). После опрыскивания раствором бензидина хроматограмму подвергают воздействию паров аммиака, затем повторно опрыскивают раствором бензидина. В результате такой обработки на хроматограмме появляются синие пятна Mn, Co, Sr и Pb. Это окрашивание постепенно бледнеет. Ион Co можно маскировать путем предварительного опрыскивания хроматограммы 2 н. водным раствором KCN непосредственно перед опрыскиванием ее бензидином. Pb можно обнаружить, переводя его с помощью гипобромита натрия в  $\text{Pb}_2\text{O}_3$ . Избыток гипобромита натрия удаляют аммиаком.

**Д 187. Хлорид олова(II) — йодид калия**

5,6 г  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 10 мл концентрированной соляной кислоты и разбавляют водой до объема 100 мл. К полученному раствору прибавляют 0,2 г KI. Реактив обладает высокой чувствительностью, особенно при проявлении золота. Последнее дает пятна, окрашенные в черный цвет, даже если оно присутствует в количестве 0,1  $\mu\text{г}$ .

**Д 188. Цинхонин — йодид калия**

1 г цинхонина растворяют в 100 мл горячей воды, к которой было прибавлено несколько капель концентрированной азотной кислоты. После охлаждения раствора прибавляют 2 г KJ. Для проявления необходимо всегда использовать свежеприготовленный раствор. После опрыскивания на хроматограмме появляются оранжевое пятно Bi, желтые пятна Ag, Hg<sup>2+</sup>, Pb, Sb, V, Tl, коричневое пятно Cu и розовое пятно Pt.

**Д 189. Сульфат меди(II) — аммонийнортутный(II) роданид**

Сначала хроматограмму опрыскивают 0,1 %-ным раствором CuSO<sub>4</sub>, к которому было прибавлено 10% 2 н. серной кислоты, а затем раствором аммонийнортутного роданида (2,7 г HgCl<sub>2</sub> и 3 г NH<sub>4</sub>CSN растворяют в 100 мл воды). Zn с этим реактивом дает окрашивание, цвет которого изменяется от красного до фиолетового, Cu дает желтое окрашивание, Fe<sup>3+</sup> — красное, Au — розово-оранжевое, Co — синее. Замена сульфата меди сульфатом цинка позволяет открывать Cu, Ni и Co.

# ПОДГОТОВКА ПРОБ, ПРОПИТКА БУМАГИ, СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ (II)

---

Составил *К. Мацек*

## БУМАГА

### II 1. Бумага с примесью ионитов (Хейл)

Сульфированный полистирол «Зео Карб 225» в  $\text{NH}_4^+$ -форме промывают деионизированной водой и измельчают в течение ночи на шаровой мельнице. Просеиванием (сито 300 меш) удаляют крупные частицы, затем центрифугированием отделяют смолу. 6 г бумаги ватман 1 растирают в 500 мл воды в гомогенизаторе, затем растирают с 20 г влажного молотого катионита «Зео Карб» в течение 30 мин на шаровой мельнице и разбавляют до объема 4 л. После этого изготавливают лист бумаги на большой воронке Бюхнера, покрытой полотном (без отсасывания), и высушивают. Для приготовления бумаги с примесью анионита пользуются сильноосновной смолой амберлит ИРА 400 и к смеси бумажной массы и смолы прибавляют 5 мл 10%-ного раствора неионного смачивающего агента (дисперсол А).

### II 2. Приготовление сульфированного ионообменника (Лауч и сотрудники)

Бумага набухает в течение 12 час в 18%-ном едком натре; затем сливают избыток раствора, бумагу высушивают, опрыскивают с обеих сторон бутансульфоном и оставляют на 1 час в сосуде, накрытом стеклом. После этого сосуд наполняют азотом и в течение 1 час нагревают до 95—100°. По охлаждении бумага набухает в метаноле, а затем ее промывают водой. Емкость бумаги составляет 0,29 экв/кг сухой бумаги.

### II 3. Приготовление анионообменника (Лауч и сотрудники)

2 г фильтровальной бумаги погружают в 55 мл пиридина и по каплям приливают раствор 10 г *n*-толуолсульфохлорида в 30 мл пиридина. После нагревания в течение 6 час на водяной бане промывают этанолом, затем водой. Емкость 0,14 экв/кг.

- П 4. Приготовление карбоксильного ионообменника (Михеель и Швеппе)**  
12 полос бумаги шириной 20 см оставляют на 2 час в смеси 20 частей бензолсульфокислоты и 400 частей уксусной кислоты. Бумаге дают высохнуть в течение ночи. Полосы шириной 4 см кипятят затем 8 час на водяной бане с обратным холодильником в растворе 12 г фталевого ангидрида и 50 мл бензола и 40 мл пиридина. Пиридин можно регенерировать.
- П 5. Пропитка бумаги гидратом окиси алюминия (Буш)**  
Полосы бумаги ватман 4 или 54 погружают на 5—10 мин в 30%-ный раствор сернокислого алюминия, нагретый до 60—70°. Полосы вынимают из ванны и подвешивают вертикально на палочке в большой стеклянной камере, на дно которой спустя 15 мин наливают аммиак (слой около 5 см). В этой атмосфере бумагу выдерживают в течение 18 час, затем погружают в раствор хлористого кальция (0,2 г на 1 л; добавляют известь до щелочной реакции). Затем бумагу высушивают при комнатной температуре в течение 24 час. рН бумаги составляет 7—7,5. Активность можно варьировать в зависимости от концентрации хлористого кальция.
- П 6. Приготовление ацелированной бумаги (Коштирж и Славик)**  
52 г бумаги подходящего сорта в форме полос или листов погружают в ацелирующую смесь (1 объем уксусного ангидрида смешивают с 10 объемами толуола и взбалтывают с 0,1 объема концентрированной серной кислоты); органический слой отделяют. Оставляют на 1 час при комнатной температуре, затем на 20 час при 38° при периодическом перемешивании. Бумагу сушат на воздухе, затем промывают метанолом для удаления загрязнений.
- П 7. Приготовление масляного эфира целлюлозы (Михеель и Швеппе)**  
Бумагу, подвергнутую в течение ночи действию раствора 20 частей бензолсульфокислоты в 400 частях уксусной кислоты, погружают на 2 час в смесь 250 мл масляного ангидрида, 1,09 мл концентрированной серной кислоты и 1475 мл бензина, нагретую до 21°. После сливания жидкости бумагу промывают бензином, высушивают при 70°, снова промывают метанолом, водой и высушивают. Целлюлоза содержит 16% масляной кислоты.

### ВЫБОР СИСТЕМЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

- П 8. Пропитка бумаги водой**  
Бумагу протягивают несколько раз через водную фазу соответствующей системы. Затем избыток воды удаляют отжиманием между двумя листами фильтровальной бумаги и влажную бумагу помещают в камеру. Спустя 30 мин можно начинать разделение.
- П 9. Пропитка бумаги мало летучими растворителями**  
а) Пропитка бумаги формамидом или диметилформамидом. Бумагу обычно пропитывают этанольным или метанольным раствором формамида или диметилформамида. Концентрацию формамида чаще всего берут равной 50%, концентрация диметилформамида обычно ниже (25—40%). На бумагу прежде всего наносят раствор

анализируемого вещества, затем хроматограмму протягивают через раствор формамида так, чтобы около 2 см бумаги вдоль линии старта оставалось непропитанными. Избыток раствора формамида отжимают между двумя листами фильтровальной бумаги, а сухую полоску вдоль линии старта пропитывают, опрыскивая из пульверизатора. Бумагу подвешивают и оставляют на воздухе в течение около 15 мин для испарения разбавителя (этанол, метанол). Для разделения можно пользоваться различными растворителями (от хлороформа до циклогексана или бензина).

Реже применяют способ, по которому бумагу сначала пропитывают, а затем наносят анализируемую пробу.

- б) *Пропитка пропиленгликолем.* Бумагу пропитывают 50%-ным метанольным раствором пропиленгликоля аналогично тому, как было описано в П 9а.

#### П 10. Петролейный эфир — метанол — вода

Систему приготавливают взбалтыванием смеси петролейного эфира с метанолом и водой (2 : 1 : 1). Камеру необходимо основательно насыщать 50%-ным метанолом в течение 5—10 час перед разделением. Для разделения более гидрофильных веществ петролейный эфир можно заменить бензолом.

#### П 11. Пропитка бумаги силиконом

Бумагу пропускают через 5%-ный раствор силикона (например, «Dow Corning Silicone 1107») в циклогексане, избыток удаляют отжиманием между листами фильтровальной бумаги и бумагу сушат в течение 1 час при 110°. Для разделения можно пользоваться различными системами, содержащими воду, спирты, хлороформ и т. п.

#### П 12. Пропитка бумаги керосином

После нанесения проб бумагу быстро пропускают через раствор 4 частей керосина (т. кип. 190—220°) в 6 частях петролейного эфира (т. кип. около 50°). Избыток отжимают между листами фильтровальной бумаги. Для разделения пригоден 80%-ный раствор метанола с 5% *n*-бутанола или 90%-ная уксусная кислота, насыщенная керосином.

#### П 13. Пропитка растительными маслами

Бумагу пропускают через 12%-ный раствор оливкового или чайного масла в бензоле. После высушивания избытка раствора и стекания растворителя (бензола) на бумагу наносят пробы анализируемых веществ. Для разделения можно применять водные растворы спиртов.

#### П 14. Пропитка парафиновым маслом

Бумагу медленно протягивают через 10%-ный раствор парафинового масла в бензоле или эфире. По испарении растворителя на линию старта наносят пробы и для разделения пользуются, например, ледяной уксусной кислотой.

#### П 15. Изготовление лодочки для нисходящей хроматографии

Для изготовления лодочки берут стеклянную трубку диаметром 25—35 мм с толщиной стенок 1—2 мм. Длина ее должна быть при-

мерно на 3 см больше длины лодочки. Трубку запаивают с обеих сторон и вблизи одного из концов проплавляют отверстие. От этого отверстия с помощью раскаленной палочки начинают вести продольную щель по всей длине лодочки.

## ХРОМАТОГРАФИЯ НА КОЛОНКЕ

### П 16. Получение гидратцеллюлозы (Гирдез и сотрудники)

5 г порошкообразной целлюлозы («Solka-Floc») быстро суспендируют в 1250 мл 85%-ной фосфорной кислоты с помощью гомогенизатора с большим числом оборотов («Waring Blendor»). Густую смесь при перемешивании выливают в 3 л воды. Осажденную гидратцеллюлозу декантируют водой почти до нейтральной реакции фильтрата. Осадок затем суспендируют в 3 л воды и к суспензии приливают аммиак до щелочной реакции на лакмус. После стояния в течение 2 час снова промывают водой до нейтральной реакции. Гидратцеллюлозу отфильтровывают, затем промывают абсолютным этанолом и петролевым эфиром (т. кип. 30–60°). После высушивания в вакууме получают тонкий белый порошок, набухающий, но не растворяющийся в воде. Для разделения некоторых веществ его смешивают с порошкообразной целлюлозой (1 : 1).

### П 17. Приготовление целлюлозы ДЕАЕ (Петерсон и Собер)

Раствор 40 г едкого натра в 170 мл воды перемешивают с 60 г порошкообразной целлюлозы («Solka-Floc») и выдерживают в ледяной бане 30 мин при периодическом перемешивании. Затем порциями прибавляют раствор 35 г перекристаллизованного 2-хлортриэтиламина в 45 мл воды и нагревают смесь на масляной бане при 80–85° в течение 35 мин при постоянном перемешивании. Охлаждают в ледяной бане и порциями прибавляют 250 мл 2 М раствора хлористого натрия. Затем отфильтровывают суспензию на пористом фильтре при слабом отсасывании и вещество на фильтре промывают 1 н. едким натром, пока фильтрат не перестанет окрашиваться. Осадок вновь суспендируют в 350 мл 1 н. соляной кислоты и снова фильтруют. Затем промывают (порциями по 250 мл) 1 н. едким натром, 1 н. соляной кислотой и вновь 1 н. едким натром. Осадок между операциями промывания основательно спрессовывают и сильно отсасывают, не допуская растрескивания. Водой не промывают. Затем осадок вновь суспендируют в 25 мл 1 н. едкого натра, переносят в большой сосуд и разбавляют водой до объема 3 л. Выдерживают в течение ночи, загрязненную жидкость декантируют и осадок подвергают декантации 5–6 раз, чтобы удалить неосаждающиеся частицы. Затем фильтруют для удаления большей части воды, промывают 500 мл этанола (тремя порциями) и окончательно промывают абсолютным этанолом, который отсасывают по возможности полнее; остаток удаляют в вакууме. При применении наиболее тонко измельченной целлюлозы выход составляет около 45 г; содержание азота около 1,4% (1 мэкв на грамм). Более крупная целлюлоза (свыше 325 меш) дает несколько больший выход.

## СПИРТЫ

## П 18. Приготовление 3,5-динитробензоатов (Вечера и сотрудники)

- а) *Из водных растворов.* К 10 мл водного раствора, содержащего 5—50 мг спирта, добавляют 0,1 мл пиридина и 1 мл бензола. К полученному раствору при низкой температуре (охлаждение льдом) сначала осторожно добавляют 11 г  $K_2CO_3$ , а затем 2 мл бензола, содержащего 0,5 г 3,5-динитробензоилхлорида. После встряхивания в течение 3 мин к раствору добавляют 30 мл эфира, не содержащего спирт, и продолжают встряхивание еще 10 мин. Затем эфирный экстракт отделяют, а водный раствор подвергают повторному встряхиванию с 20 мл и 10 мл эфира с последующим отделением эфирных экстрактов. Последние объединяют, пиридин удаляют встряхиванием экстрактов с 1%-ным раствором серной кислоты и водой, после чего эфир отгоняют.
- б) *Из безводных растворов.* 5—50 мг спирта растворяют в 5 мл бензола, к раствору добавляют 50 мг 3,5-динитробензоилхлорида, 0,3 мл пиридина и нагревают до кипения в течение 1 час. Затем раствор охлаждают и дважды встряхивают с 20%-ным раствором едкого натра, водой, 5%-ным раствором серной кислоты и водой (по 5 мл). После отделения бензольного слоя растворитель отгоняют. Для хроматографирования вновь растворяют в небольшом количестве бензола.

## П 19. Приготовление 3,6-динитрофталатов (Момосэ и Ямада).

0,1—1 мг спирта растворяют в 0,1—0,2 мл безводного пиридина, добавляют избыток ангидрида 3,6-динитрофталево́й кислоты и смесь нагревают в течение 1 час при 50° в случае применения низших спиртов или при 100° — в случае применения высших или многоатомных спиртов. К смеси для разложения избытка реактива добавляют каплю воды, а затем 2—3 мл эфира; пиридин удаляют из смеси путем двукратной экстракции 2—3 мл 5%-ного раствора соляной кислоты. Затем эфирный слой сушат сульфатом натрия, эфир отгоняют и остаток растворяют в небольшом количестве *n*-бутанола.

## П 20. Приготовление 3-нитрофталатов (Зигель и Шлегль)

В стеклянной трубке смешивают около 0,4 г ангидрида 3-нитрофталево́й кислоты с 0,2—0,3 мл спирта или смеси спиртов, после чего трубку запаивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем содержимое трубки растворяют в эфире, дважды встряхивают с разбавленным раствором  $Na_2CO_3$  и из этого раствора осаждают 3-нитрофталаты раствором соляной кислоты.

## П 21. Приготовление ксантогенатов (Карионе и Хасимото)

В небольшой пробирке смешивают несколько капель спирта с 0,5 мл чистого сероуглерода и 0,1 г чистого едкого кали (порошок), после чего встряхивают в течение нескольких минут. Затем смесь декантируют, жидкую фазу удаляют, а оставшийся ксантогенат растворяют в капле воды. Для разделения применяют щелочные системы растворителей.

## АЛИФАТИЧЕСКИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

## II 22. Приготовление гидроксамовых кислот (Томпсон)

- а) *Из эфиров кислот.* Смешивают 2 мл эфира или смеси эфиров кислот в этаноле с 30 мл эфира и 1 мл раствора гидроксиламина (смешивают равные объемы 5%-ного раствора солянокислого гидроксиламина и 12,5%-ного раствора едкого натра в метаноле; выделившийся при этом хлористый натрий отфильтровывают). Смесь выдерживают 30 мин при 25°, после чего к ней добавляют 0,08 мл ледяной уксусной кислоты. Образовавшийся при этом уксуснокислый натрий отфильтровывают, а эфир отгоняют в вакууме.
- б) *Из свободных кислот.* Кислоты переводят в натриевые соли. Приблизительно к 10 мг твердых натриевых солей кислот добавляют 0,2 мл тионилхлорида и смесь выдерживают в течение 15 мин. Затем добавляют 5 мл абсолютного этанола и через 30 мин к раствору прибавляют воду для разрушения избытка тионилхлорида. Через несколько минут экстрагируют из раствора эфиры кислот 30 мл эфира. Затем эфирный экстракт высушивают хлористым кальцием и нейтрализуют этанольным раствором едкого натра. Гидроксамовые кислоты получают согласно прописи II 22а.

## II 23. Приготовление гидразидов кислот (Сатакэ и Сэки)

При комнатной температуре смешивают избыток гидразина с этиловым эфиром алифатической кислоты. В некоторых случаях смесь рекомендуется нагревать. Полученный раствор подвергают хроматографированию.

## II 24. Галоидирование ненасыщенных кислот (Звольский и Редлих)

*Реактив Гануша.* К 12,3 г йода, тонко измельченного в фарфоровой ступке, добавляют при низкой температуре (охлаждение льдом) и постоянном перемешивании 8 г брома. Выкристаллизовавшуюся массу после удаления из нее избытка брома (испарение в течение нескольких часов при комнатной температуре) растворяют в ледяной уксусной кислоте и разбавляют до объема 500 мл. Затем смешивают реактив Гануша с 1%-ным бензольным раствором алифатических кислот в соотношении 1 : 1 и выдерживают в течение 1—1,5 час в темноте. Добавлением водного раствора серноватистокислого натрия разрушают избыток йодмонобромидов, а бензольный слой после обесцвечивания промывают водой до нейтральной реакции и высушивают сульфатом натрия. Бензольный раствор хроматографируют на бумаге, пропитанной чайным маслом (II 13).

## II 25. Продукты присоединения ацетата ртути(II) (Иноуэ и сотрудники)

К смеси метиловых эфиров ненасыщенных кислот добавляют 20%-ный избыток ацетата ртути в абсолютном метаноле (1 г ацетата ртути в 1—2 мл метанола) и нагревают при 80° в течение 30 мин до растворения ацетата. Затем реакционную массу вливают в стакан с дистиллированной водой (избыток). При этом с целью удаления избытка ацетата ртути и небольшого количества непрореагировавшего эфира несколько раз промывают нижний маслянистый слой смеси. Раствор затем экстрагируют эфиром и эфирный раствор применяют для хроматографирования.

Для хроматографирования используют бумагу, пропитанную тетралином или керосином (т. кип. 140—170°). Для разделения пригодны следующие смеси: 90%-ный метанол — уксусная кислота — тетралин в соотношении 30 : 1 : 3; диэтиленгликоль — уксусная кислота — тетралин в соотношении 60 : 20 : 11 и метанол — уксусная кислота — керосин в соотношении 30 : 1 : 7.

**П 26. Удаление белков (депротеинизация) вольфрамовой кислотой (Кавалини и Фронталли)**

*Раствор вольфрамовой кислоты.* К воде добавляют 10%-ный раствор вольфрамовокислого натрия и 0,66 н. раствор серной кислоты в соотношении 60 : 20 : 20. Для удаления белков из биологического материала (кровь, ткань и т. п.) последний обрабатывают вышеприведенным реактивом в соотношении 1 : 5. Через 10 мин белки отфильтровывают через бумажный фильтр и фильтрат хроматографируют.

**П 27. Приготовление 2,4-динитрофенилгидразонов (Эль Гавари и Томпсон)**

а) К водному раствору альдегида, кетона или натриевой соли кислоты (минимум 2%-ный раствор) добавляют избыток насыщенного раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. растворе соляной кислоты. После выдерживания в течение нескольких часов при комнатной температуре из раствора выделяются 2,4-динитрофенилгидразоны. Последний отделяют центрифугированием и растворяют в смеси 10 частей метанола и 1 части пиридина.

б) *Приготовление из природного материала.* К 20 мл экстракта добавляют 2 мл 0,2%-ного раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. растворе соляной кислоты и инкубируют смесь 20 мин при 38°. Затем смесь экстрагируют в делительной воронке 5 мл этилацетата с последующим повторным экстрагированием водной фазы 5 мл этилацетата. Экстракты объединяют и при наличии эмульсии ее отделяют на центрифуге (4000 об/мин) в течение 20 мин. Водные слои соединяют и еще раз экстрагируют 4 мл этилацетата. Объединенные этилацетатные экстракты 4 раза извлекают 2 мл 10%-ного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Для удаления 2,4-динитрофенилгидразина раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  дополнительно экстрагируют 2 мл этилацетата. Затем раствор осторожно нейтрализуют концентрированной соляной кислотой (температура 0—4°) до прекращения выделения  $\text{CO}_2$  и подвергают 4-кратному экстрагированию 2 мл этилацетата. Объединенные экстракты выпаривают в вакууме досуха при температуре, не превышающей 40°.

**П 28. Количественный анализ 2,4-динитрофенилгидразонов (Кавалини и Фронталли)**

Вырезанные и измельченные участки бумаги с пятнами помещают в пробирку центрифуги, добавляют 4 или 8 мл 1 н. раствора едкого натра и тщательно растирают бумагу стеклянной палочкой. Через 10 мин содержимое пробирки центрифугируют; раствор декантируют и фотометрируют при длине волны 510 мμ.

**П 29. Восстановление 2,4-динитрофенилгидразонов (Альфтанг и Виртанен)**

Приготовленные согласно прописи П 27б 2,4-динитрофенилгидразоны растворяют в 95%-ном этаноле и  $\frac{2}{3}$  или  $\frac{4}{5}$  раствора гидрируют в присутствии олова в бане со льдом в течение 12—20 час при

пропускании газообразного хлористого водорода. Затем реакционную смесь фильтруют, разбавляют водой и ионы олова осаждают сероводородом. Осадок отфильтровывают и фильтрат выпаривают досуха. Остаток растворяют в воде, фильтруют через слой ионита амберлит ИР 120 (колонка  $25 \times 1,3$  см). Ионит отмывают водой и поглощенные аминокислоты вытесняют 1 н. раствором аммиака. Окрашенный в коричневый цвет раствор концентрируют на кипящей водяной бане или в вакууме. Коричневая окраска раствора не влияет на хроматографический анализ.

## УГЛЕВОДЫ

### П 30. Осаждение белков по Шомодьи

1 объем анализируемого раствора смешивают с 2 объемами 0,3 н. раствора  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . К полученной смеси добавляют 2 объема 5 %-ного водного раствора  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Смесь хорошо перемешивают и белки отфильтровывают.

### П 31. Денионизация пиридином

Раствор сахара выпаривают на водяной бане досуха. Полученный сухой остаток экстрагируют в течение 10 мин при  $100^\circ$  5 мл дважды перегнанного пиридина. Охлажденный раствор фильтруют, пиридин отгоняют в вакууме при температуре, не превышающей  $40^\circ$ . Остаток растворяют в 10 %-ном растворе изопропанола.

### П 32. Гидролиз серной кислотой

10 мг анализируемой пробы помещают в пробирку, растворяют в 0,5 мл 1 н. раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и после запаивания проводят гидролиз содержимого при  $100^\circ$  в течение 6 час. По окончании гидролиза раствор нейтрализуют твердым  $\text{BaCO}_3$  по конго красному и осажденный  $\text{BaSO}_4$  отделяют центрифугированием. Температура и продолжительность гидролиза для различных полисахаридов различны.

### П 33. Гидролиз инвертазой (Вильямс и Бевеню)

- а) *До разделения.* На бумагу наносят 1  $\mu\text{л}$  раствора, содержащего 10—50  $\mu\text{г}$  рафинозы или сахарозы и сразу же по каплям добавляют 5  $\mu\text{л}$  раствора инвертазы. Спустя 5 мин проводят разделение сахаров.
- б) *После хроматографирования.* Хроматограмму опрыскивают 4 %-ным водным раствором препарата инвертазы (British Drug Houses Ltd.), после чего ее подвешивают в термостате над водой на 15—30 мин при температуре  $50^\circ$ . Затем хроматограмму проявляют обычным способом или проводят разделение вторым растворителем (в другом направлении).

### П 34. Проведение ферментативного гидролиза в трубочках (Портер и Гобан)

На предметное стекло помещают каплю раствора сахара (около 5 мг в 1 мл), а рядом с ней раствор фермента (около 10 мг в 1 мл). Затем в каплю сахарного раствора погружают трубочку, обычно применяемую для определения температуры плавления, но открытую с двух сторон. Набрав 0,01 мл (около 5 мм) раствора, трубочку наклоняют, в результате чего раствор перемещается на середину.

Таким же образом другим концом трубочки набирают аналогичный объем раствора фермента и сдвигают его к центру. Конец трубочки, через который был набран раствор сахара, запаивают и после охлаждения центрифугированием перемещают растворы в трубке к запаянному концу ее. После перемешивания другой стеклянной трубочкой запаивают второй конец и раствор инкубируют при температуре  $37^{\circ}$ , затем вытянутые в капилляры концы трубки отрезают и содержимое наносят на бумагу.

**П. 35. Образование на бумаге N-бензилгликозиламина (Бейли и Бурн)**

На пятна олигосахаридов на бумаге наносят по каплям около 3  $\mu$ л 10%-ного раствора бензиламина в метаноле; бумагу нагревают при  $85^{\circ}$  в течение 5 мин, после чего проводят разделение олигосахаридов.

**П. 36. Количественный анализ с применением перйодата натрия (Гирст и Джонс)**

0,2—3 мг сахара растворяют в 5 мл воды и окисляют при нагревании на кипящей водяной бане в течение 20—60 мин 0,25 М раствором метаперйодата натрия (параперйодат удаляют путем перекристаллизации соли из концентрированной азотной кислоты). Затем к охлажденному раствору для разрушения избытка перйодата добавляют около 0,2 мл этиленгликоля. Выделившуюся при окислении муравьиную кислоту титруют 0,01 н. едким натром по индикатору метиловому красному. Окраску оттитрованного раствора сравнивают с окраской раствора, содержащего этиленгликоль и метиловый красный.

**П. 37. Колориметрическое определение сахаров по Шомодьи и Нельсону**

*Реактив с медной солью.* В 700 мл воды растворяют 28 г безводного вторичного фосфата аммония и 40 г сегнетовой соли; к раствору добавляют 100 мл 1 н. едкого натра, 80 мл 10%-ного раствора  $\text{CuSO}_4$  и 180 г безводного сульфата натрия. После полного растворения разбавляют до объема 1000 мл и через 1—2 дня фильтруют.

*Реактив с мышьяковомолибденовой кислотой.* 25 г молибденовокислого аммония растворяют в 450 мл воды и при перемешивании добавляют 21 мл концентрированной серной кислоты и 25 мл раствора, содержащего 3 г  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Раствор применяют после выдерживания в течение 24—28 час при температуре  $37^{\circ}$  в склянке из темного стекла.

*Определение.* К 5 мл водного элюата, полученного при элюировании пятен хроматограммы, добавляют 1 мл реактива с медной солью и нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. Затем раствор охлаждают, добавляют 1 мл реактива с мышьяковомолибденовой кислотой и разбавляют водой до объема 25 мл. Окраску раствора измеряют при длине волны 500 м $\mu$ . Этим методом можно определить сахара при концентрации их от 10 до 350  $\mu$ г; погрешность анализа при этом равна  $\pm 2\%$ .

**П. 38. Определение сахаров антроновым реактивом (Димлер и сотрудники)**

Элюат, освобожденный от волокон целлюлозы фильтрованием через стеклянный фильтр, разбавляют до объема 10 мл с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось от 3 до 30  $\mu$ г сахаров. В пробирку наливают 3 мл полученного раствора и при охлаждении

добавляют 6 мл раствора антраона (0,2% антраона в концентрированной серной кислоте). Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 10 мин ( $\pm 15$  сек), после чего содержимое ее быстро охлаждают. Интенсивность окраски раствора измеряют при длине волны 620 мμ. Следует пользоваться свежеприготовленным раствором антраона (годен в течение 1 дня).

#### II 39. Определение сахаров хлористым трифенилтетразолием (Фишер и Дерфел)

Хроматограмму пропускают через смесь, содержащую равные объемы 1 н. едкого натра и 4%-ного раствора хлористого трифенилтетразолия в метаноле, после чего нагревают при 65° в течение 1 час или при 70° в течение 30 мин. Образовавшиеся пятна вырезают и каждое пятно в отдельности экстрагируют в пробирке при встряхивании в течение 10 мин 5 мл смеси метанола с ледяной уксусной кислотой в соотношении 10 : 1. Аналогично экстрагируют полосы (равные размеру пятен) хроматограммы, не содержащие пятен. Затем экстинкцию элюатов измеряют на спектрофотометре Бекмана при использовании кюветы 1 см и длине волны 482 мμ. Из величин спектрофотометрирования элюатов пятен вычитают данные измерения элюата чистых полосок. Элюаты устойчивы в течение 14 дней, что позволяет проводить спектрофотометрирование не сразу. По данным Фишера и Дерфела молярная экстинкция трифенилформазана при 20° составляет  $16,32 \cdot 10^3$ .

#### II 40. Проявление лактонов уроновых кислот (Фишер и Дерфел)

К 5—8 мл анализируемого раствора добавляют каплю раствора фенолфталеина и каплю тимолфталеина, после чего приливают 0,1 н. или 1 н. раствор едкого натра до появления красной окраски. Раствор выдерживают в течение 1 час и нейтрализуют одной или двумя каплями 2 н. раствора уксусной кислоты. Для целей количественного анализа раствор обычно доводят до определенного объема.

#### II 41. Анализ фосфорных эфиров (Хейнс и Ишервуд)

Вырезанное из хроматограммы пятно фосфорного эфира обрабатывают в пробирке 0,5 мл смеси серной и хлорной кислот в соотношении 3 : 2 и сжигают. Полученную золу растворяют в 5 мл воды, а затем к раствору добавляют 0,5 мл 10 н. раствора серной кислоты, 2 мл воды, 2,5 мл 5%-ного раствора молибденовокислого аммония и 10 мл не содержащего альдегидов изобутанола. Смесь переносят в делительную воронку, встряхивают, после чего водную фазу удаляют. Органическую фазу, оставшуюся в воронке, дважды промывают 5 мл 1 н. раствора серной кислоты, добавляют 15 мл 0,2%-ного раствора  $\text{SnCl}_2$  в 0,18%-ной соляной кислоте и встряхивают в течение 30 сек. Образовавшуюся при этом водную фазу удаляют; верхний слой помещают в мерную колбу и добавляют этанол до метки. Синюю окраску раствора измеряют на спектрофотометре Бекмана при длине волны 750 мμ. Аналогично спектрофотометрируют раствор, получаемый при элюировании чистых полосок хроматограммы; данные служат поправкой к результатам измерений элюата пятна. Этим методом можно открыть от 1 до 100 мкг фосфора, а при микромодификации метода — даже 0,1 мкг.

**П 42. Гидролиз полисахаридов при идентификации аминсахаров (Фишер и Небель)**

Исследуемую пробу растворяют в 7 н. растворе соляной кислоты и нагревают 4 час при 100°. Некоторые полисахариды (например, хитин) нерастворимы в 7 н. соляной кислоте, поэтому пользуются более концентрированной кислотой. В таких случаях пробу растворяют в 12 н. соляной кислоте, нагревают 3—4 мин до 50° и после охлаждения раствор разбавляют водой до 7 н. концентрации кислоты. Из полученного раствора ионы хлора удаляют уксуснокислым серебром.

**П 43. Дезаминирование аминсахаров (Стоффин и Янлоз)**

На бумагу наносят 1—150 мкг аминсахаров, затем опрыскивают 2%-ным раствором нингидрина в этаноле, содержащем 4% пиридина. После опрыскивания бумагу помещают в камеру, на дне которой находится 50%-ный водный раствор пиридина, и нагревают 3 час до 80°, после чего проводят разделение сахаров обычным путем.

**П 44. Метилирование полисахаридов**

1 часть полисахарида растворяют в 3 частях 30%-ного водного раствора едкого натра и при энергичном перемешивании нагревают до 40°. При этой температуре к раствору добавляют 30 частей метилсульфата и 60 частей 30%-ного раствора едкого натра. Добавление реактивов производят с десятиминутными интервалами в количестве  $\frac{1}{10}$  объема. Иногда к раствору во избежание выделения метилированного полисахарида добавляют диоксан. Наконец, к раствору прибавляют 30—40 частей горячей воды и при непрерывном перемешивании нагревают до 100°. При этой температуре раствор выдерживают в течение 1 часа. Выделившийся метилированный полисахарид отфильтровывают и промывают горячей водой.

**П 45. Гидролиз метилированного полисахарида**

Метилированный полисахарид переводят в метилгликозиды путем гидролиза в запаянной трубке 4%-ным метанольным раствором HCl при 100°. Последние подвергают дальнейшему гидролизу 4%-ным водным раствором соляной кислоты в течение 3 час при температуре 100°. Полученный гидролизат нейтрализуют  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ; избыток ионов серебра удаляют сероводородом и раствор фильтруют через слой ионита, например амберлита ИР 4Б. Элюат хроматографируют на бумаге.

**ФЕНОЛЫ И АРОМАТИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ****П 46. Превращение фенолов в арилоксиуксусные кислоты (Шлегль и Зигель)**

Смесь летучих фенолов растворяют в 33%-ном едком натре, к раствору прибавляют 50%-ный водный раствор монохлоруксусной кислоты и нагревают в течение 1 часа при 100°. Образующиеся арилоксиуксусные кислоты осаждают соляной кислотой и экстрагируют эфиром. Избыточную монохлоруксусную кислоту из эфирного раствора вымывают водой. Арилоксиуксусные кислоты затем экстрагируют раствором соды и переосаждают кислотой.

**II 47. Определение о-диоксibenзолов (Мраз)**

Пятна элюируют из хроматограммы теплой водой и объем элюата доводят до 25 мл. К раствору затем прибавляют 0,2 мл раствора, содержащего 0,1 %  $\text{FeSO}_4$  и 0,5 % сегнетовой соли, и непосредственно перед определением — 5 мл раствора 10%-ного ацетата натрия. Интенсивность окрашивания можно измерить, например, с помощью колориметра Ланге.

**II 48. Определение хлорогеновой кислоты (Джонсон и Шэлл)**

Природное сырье (например, картофельные очистки) экстрагируют приблизительно трехкратным количеством этанола. После фильтрования и упаривания до  $\frac{1}{6}$  объема раствор наносят на бумагу и хроматографируют. Флуоресцирующие пятна хлорогеновой кислоты вырезают и элюируют 75%-ным этанолом. К элюату добавляют дистиллированную воду до объема 10 мл. Поглощение измеряют при 324 мμ. Значение  $E_{1\%}^{1\text{см}}$  для безводной хлорогеновой кислоты при 324 мμ составляет 526.

**II 49. Получение продуктов окисления лигнина (Бланд и сотрудники)**

5 г воздушносухих опилок нагревают в автоклаве с 3 мл нитробензола и 100 мл 2 н. едкого натра в течение 3 час при 150°. Реакционную смесь фильтруют, фильтрат экстрагируют бензолом. Водную фазу подкисляют соляной кислотой и выдерживают в течение 24 час. Образовавшийся осадок отфильтровывают. Водный фильтрат тщательно экстрагируют бензолом, бензольный раствор упаривают и наносят на бумагу.

Для лучшей очистки бензольный экстракт можно упарить только до 150 мл и извлечь 20%-ным раствором сульфита натрия так, чтобы в бензоле нельзя было обнаружить присутствия альдегидов. Сульфитные экстракты объединяют, подкисляют соляной кислотой и удаляют  $\text{SO}_2$  кипячением в токе углекислого газа. Затем свободные альдегиды вновь экстрагируют бензолом, экстракт упаривают и наносят на бумагу.

**II 50. Определение продуктов окисления лигнина (Бланд и Стамп)**

Анализируемый раствор наносят на бумагу, пропитанную 0,05 M раствором буры. Для разделения применяют смесь метанол — изопропиловый эфир — вода (1 : 1 : 1) или метанол — бензол — вода (7 : 7 : 10), пригодную преимущественно для отделения ацетосинригона. Флуоресцирующие пятна вырезают и помещают в пробирки, содержащие по 10 мл метанола. После взбалтывания в течение 10 мин спектрофотометрируют при 300 мμ.

**СТЕРОИДЫ****II 51. Система, содержащая 2-бутанол (Прохазка и сотрудники)**

2-Бутанол (т. кип. 99—100°) насыщают водой, а затем подкисляют 0,5 % концентрированной соляной кислоты. Разделение проводят на бумаге, пропитанной 0,125 M раствором хлористого калия; избыток раствора удаляют фильтровальной бумагой, после чего хроматограмму сушат на воздухе.

**П 52. Диализ крови или ткани**

К 1 части крови или гомогената ткани добавляют 1 часть воды и 1 часть метанола. Диализ проводят против 40%-ного водного раствора метанола в течение 48 час, а иногда и дольше; возможен также диализ против хлорсформа. Наиболее удобным для этой цели приспособлением является целлофановая диализационная трубка (длина 45 см, диаметр 2,8 см). Один конец трубки закрывают, наливают в нее 150—165 мл образца, в раствор опускают стеклянный шарик, после чего другой конец трубки закрывают. Затем трубку помещают в продолговатую делительную воронку (26×5,5 см) объемом 450 мл, которую наполняют 200 мл 40%-ного метанола и 50 мл хлороформа. Делительную воронку с трубкой закрывают и устанавливают в приборе, обеспечивающем медленное, плавное движение жидкостей.

**П 53. Йодная кислота**

Хроматограмму опрыскивают 3%-ным раствором йодной кислоты в смеси метанола с водой (1 : 1).

**П 54. Хромовый ангидрид**

Хроматограмму погружают в кипящий 0,4%-ный раствор хромового ангидрида в 90%-ной уксусной кислоте (реактив нельзя применять, если он приобрел зеленую окраску), а затем помещают на нагретую стеклянную пластинку и сушат.

**П 55. Тетраацетат свинца**

Хроматограмму погружают в насыщенный раствор тетраацетата свинца в смеси 19 частей ледяной уксусной кислоты и 1 части уксусного ангидрида, а затем сушат на нагретой стеклянной пластинке вплоть до побурения фона. Места расположения стероидов остаются белыми.

**П 56. Окись хрома в уксусном ангидриде**

Хроматограмму погружают в 0,2%-ный раствор окиси хрома в уксусном ангидриде и сушат на воздухе. Реактив устойчив в течение 36 час.

**П 57. Изопропилат алюминия**

Хроматограмму смачивают в 1%-ном растворе изопропилата алюминия в смеси толуола и циклогексана (1 : 1), а затем помещают на нагретую стеклянную пластинку и прикрывают другой пластинкой. Через 2—3 мин верхнюю пластинку снимают и хроматограмму сушат.

**П 58. Алюмогидрид лития**

Хроматограмму смачивают в кипящей свежеприготовленной суспензии алюмогидрида лития в абсолютном эфире (1—2%), затем нагревают в течение 2 мин между стеклянными пластинками и сушат.

**П 59. Приготовление ацетатов**

К остатку после упаривания раствора стероидов добавляют 2 капли уксусного ангидрида и 3 капли сухого пиридина, затем

Таблица 157

РЕАКЦИИ СТЕРОИДОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ГРУППАМИ (ТИП 1—9) ПРИ C<sub>17</sub>

(Аксельрод [3])

Тип:	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{H} \end{array}$ 1	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{CO} \\   \\ \text{OH} \end{array}$ 2	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CHOH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$ 3	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{CHOH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$ 4	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{CHOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$ 5	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CHOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$ 6	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{OH} \end{array}$ 7	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{OH} \end{array}$ 8	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{H} \end{array}$ 9
Д 5	+	+	—	—	—	—	—	—	—
II 53			Окисление в 17-КС	Окисление в 17-КС					
II 54		Окисление в 17-КС	Окисление в 17-КС	Окисление в 17-КС		Окисление в тип 7			Окисление в 17-КС
II 55							Окисление в тип 2	Окисление в тип 1	
II 56	Ацетилирова- ние	Ацетилирова- ние		Окисление в ацетат типа 2	Окисление в ацетат типа 1				
II 57									Окисление в 17-КС
II 58	Восстановле- ние 20-кето- группы	Восстановле- ние 20-кето- группы					Восстанов- ление 20-ке- тогруппы		

Примечание. 17-КС — 17-кетостероиды, определяемые при помощи реагента Циммермана (Д 82). За исключением типа 9, стереоизомеры не указаны.

раствор выдерживают в закрытой пробирке в течение 16—20 час при комнатной температуре. Затем к раствору добавляют 2 мл абсолютного метанола, ацетилированный экстракт упаривают досуха и растворяют в небольшом объеме дихлорэтана. Полученный раствор наносят на бумагу.

#### П 60. Получение эпоксидов

Раствор 5 мг надбензойной кислоты в бензоле добавляют к 100—500 мкг ненасыщенного кристаллического стероида и смесь выдерживают в холодильном шкафу от 4 до 72 час в зависимости от характера стероидов. Реакционную смесь разбавляют затем 25—30 мл этилацетата. Раствор промывают 5 мл 5%-ного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и три раза 5 мл воды. Этилацетат отгоняют в вакууме, а остаток растворяют в 10 мл бензола.

#### П 61. Реакция Портера — Зильбера

*Фенилгидразин* реактив. 62 мг фенилгидразина растворяют в 100 мл разбавленной серной кислоты (390 мл серной кислоты и 190 мл воды). Остаток после упаривания элюата, полученного из хроматограммы, растворяют в 4 мл ледяной уксусной кислоты и к раствору добавляют 8 мл фенилгидразиновой реактива. Раствор нагревают в течение 20 мин при температуре 60°, затем в течение 3 мин тщательно охлаждают и окрашивание раствора определяют при 410 мμ.

#### П 62. Определение стероидных эфиров

К раствору стероидного эфира в 1 мл абсолютного метанола добавляют 2 мл щелочного раствора гидроксилamina (2 н. солянокислый гидроксилamin + 3,5 н. едкий натр, 1 : 1) и раствор выдерживают в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем к раствору добавляют 1 мл соляной кислоты (концентрированная соляная кислота — вода, 1 : 2) и 1 мл 0,37 М хлорного железа в 0,1 н. соляной кислоте. Окраска раствора определяется при 540 мμ в сравнении с эталонным раствором приведенных реактивов в метаноле. Описанный метод можно применять для всех стероидных спиртов, которые предварительно ацетилируют, и для кетостероидов после перевода их в енолацетаты.

#### П 63. Толуол и уксусная кислота

Толуол смешивают с ледяной уксусной кислотой и водой (40 : 40 : 8). Верхний слой применяют в качестве подвижной фазы. Бумагу перед хроматографированием выдерживают в течение часа в камере, насыщенной обеими фазами.

#### П 64. Пропитка бумаги уксусной кислотой

Бумагу ватман 3 пропускают через 70%-ную уксусную кислоту и сушат в течение 5 мин при 90°. После нанесения образца хроматограмму помещают в камеру, насыщенную обеими фазами, на 12—15 час.

- а) Изопропиловый эфир — гептан (8 : 2), насыщение 70%-ной уксусной кислотой. Применяется для разделения гликопроизводных.
- б) Изопропиловый эфир — гептан (1 : 1), насыщение 70%-ной уксусной кислотой. Применяется для разделения свободных желчных кислот.

- в) Изопропиловый эфир — гептан (2 : 8), насыщение 70%-ной уксусной кислотой. Применяется для отделения дезоксихолевой кислоты от хенодезоксихолевой.
- г) Амилацетат — гептан (6 : 4), насыщение 70%-ной уксусной кислотой. Применяется для разделения гликопроизводных.
- д) Амилацетат — гептан (8 : 2), насыщение 70%-ной уксусной кислотой. Применяется для разделения тауропроизводных. После хроматографирования в течение 46 час с перетеканием достигается полное разделение тауродезоксихолевой и таурохенодезоксихолевой кислот.

## II 65. Определение ланатозидов и дезацетилланатозидов

Для определения ланатозида А в продажном препарате ланатозидов А, В, С применяют хроматографирование хлороформом на бумаге, пропитанной 40%-ным раствором формамида в метаноле. Для определения ланатозида В, ланатозида С, дезацетилланатозида А и совместно дезацетилланатозидов В и С хроматографируют в смеси хлороформа с этилацетатом (8 : 2) на бумаге, пропитанной 30%-ным раствором формамида в метаноле. Боковые полосы, на основании которых вырезают непроявленные части хроматограммы, проявляют обработкой смесью 3%-ного водного раствора хлорамина с 25%-ным раствором трихлоруксусной кислоты в этаноле (1 : 15). Хроматограмму выдерживают 4 мин при 120°, после чего в ультрафиолетовом свете наблюдается золотисто-желтая флуоресценция. Вырезанные и непроявленные кусочки бумаги помещают в пробирку, куда наливают 5 мл раствора ксантгидрола (10 мг в смеси 100 мл ледяной уксусной кислоты и 1 мл 35%-ной соляной кислоты), причем таким образом, чтобы вся бумага находилась в растворе. Пробирки закрывают ватой и помещают в водяную баню, нагретую до 40°, выдерживая их там при непрерывном встряхивании в течение 10 мин. Затем пробирки ровно на 3 мин помещают в кипящую водяную баню, после этого на 5 мин в ледяную баню, а затем выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре. Бумажные волокна отделяют фильтрованием через стеклянный фильтр 12 G3. Экстинкцию раствора измеряют при 530 мμ; в качестве образца для слепого опыта применяют ксантгидроловый реактив, который нагревают аналогичным образом.

## АМИНЫ

## II 66. Приготовление 3,5-динитробензамидов

100 мг солянокислого метиламина (или 50 мг метиламина) растворяют в делительной воронке в 10 мл воды, добавляют 30 мл эфира и к смеси приливают 0,5 мл пиридина и 0,5 г 3,5-динитробензоилхлорида, растворенного в 2 мл бензола. Постепенно в делительную воронку добавляют 11 г  $K_2CO_3$  при непрерывном охлаждении и встряхивании. Затем смесь время от времени встряхивают и через 20 мин водный слой спускают, а эфирный дважды промывают 10 мл 1%-ной серной кислоты и дважды 10 мл воды. Эфирный раствор сушат 2 г сульфата натрия, фильтруют и перегоняют. Остаток после перегонки в случае необходимости можно перекристаллизовать из небольшого количества 50%-ного водного раствора этанола.

**П 67. Получение бромированных аминов**

0,1 мл *o*-толуидина (или *m*-толуидина) или 0,1 г *p*-толуидина подкисляют 5 мл концентрированной соляной кислоты и к раствору добавляют 30 мл воды со льдом. Раствор титруют 0,1 *M* раствором бромид-бромата строго до эквивалентной точки (йодкрахмальная бумажка). Затем добавляют 10 мл бензола и образовавшееся бромпроизводное встряхиванием переводят в бензольный слой. После отделения бензольный слой следует профильтровать через сухой фильтр и только после этого фильтрат наносить на бумагу. Оптимальное количество составляет примерно 100 мкг.

**П 68. Определение креатинина модифицированным методом стандартной добавки по Кирби-Берри и Кейну**

На отрезке бумаги длиной 7,5 см и шириной 27,5 см отмечают 15 мест для нанесения образца. На нечетные места наносят стандартный образец креатинина в увеличивающихся концентрациях: 0,25, 0,50, 0,75 мкг и т. д. и на те же места по 5 мкл мочи, разбавленной в четыре раза. На четные места наносят по 5 мкл раствора мочи, разбавленной наполовину. После хроматографирования в системе *n*-бутанол — этанол — вода (4 : 1 : 1) и проявления реактивом Яффе визуально сравнивают интенсивность окраски пятен. Если неизвестное количество креатинина в моче  $\frac{1}{4}$  обозначить  $x$ , в моче  $\frac{1}{2}$  —  $2x$  и  $y$  — известное количество креатинина, добавленного к пятнам мочи  $\frac{1}{4}$ , интенсивность окраски которых такая же, как и у мочи  $\frac{1}{2}$ , то из уравнения  $x + y = 2x$  найдем значение  $x = y$  для 5 мкл мочи  $\frac{1}{4}$ , а следовательно, и концентрацию.

**АМИНОКИСЛОТЫ****П 69. Приготовление сыворотки для хроматографирования аминокислот (Авапара)**

К 1 мл сыворотки или крови добавляют 1 мл воды и раствор обрабатывают 18 мл этанола. Спустя несколько часов выпадает осадок, который удаляют центрифугированием или фильтрованием. Осадок промывают приблизительно 5 мл 85%-ного этанола и к фильтрату добавляют примерно 5 мл воды и 100 мл хлороформа. После интенсивного встряхивания отделяются два слоя. К хлороформенному слою добавляют еще 5 мл воды, смесь встряхивают и разделяют. Объединенный водный слой обессоливают электродиализом (см. стр. 93). Водный раствор затем упаривают досуха и сухой осадок постепенно растворяют в небольших объемах 50%-ного этанола или 30%-ного пропанола (всего примерно 0,1 мл). Каждую порцию раствора набирают в пипетку и половину объема (или меньше) наносят в одну точку одномерной хроматограммы. Для двумерного хроматографирования наносят на хроматограмму весь остаток после упаривания, соответствующий 1 мл исходной сыворотки. Однако при таком способе обезжиривания имеют место потери аминокислот.

**П 70. Депротеинизация и деминерализация плазмы подкисленным ацетоном**

1 мл плазмы сушат в вакуумном эксикаторе над серной кислотой. Остаток после сушки выдерживают в течение 2 час в 8 мл ацетона,

к которому был добавлен 1% концентрированной соляной кислоты. Жидкость центрифугируют, остаток промывают и центрифугирование повторяют еще 2—3 раза. Жидкость упаривают при 37°, продувая через нее сухой воздух. Остаток после упаривания растворяют в 0,5 мл воды, раствор промывают 2—3 раза равным объемом эфира. Водный раствор вновь сушат в эксикаторе над серной кислотой, растворяют в 20—100 мл воды и наносят на бумагу.

#### П 71. Очистка фенола

- а) Вакуумная дистилляция фенола с цинковым порошком.
- б) В перегонную колбу помещают 100 частей фенола, 12 частей воды, 0,1 часть алюминиевых стружек и 0,05 часть  $\text{NaHCO}_3$ . Перегонку проводят при атмосферном давлении с воздушным холодильником. Фенол остается бесцветным значительно дольше, если через него пропустить светильный газ.

#### П 72. Фенол с лимоннокислым и фосфорнокислым натрием

К 100 г фенола добавляют приблизительно 20 мл водного раствора 6,3% лимоннокислого натрия и 3,7% первичного фосфата натрия или калия. На дно камеры можно ввести аммиак или уксусную кислоту (0,5 мл). Полученный раствор хорошо зарекомендовал себя для разделения аминокислот из необессоленной мочи.

#### П 73. Фенол с буферным раствором с pH 12

Бумагу пропитывают буферным раствором с pH 12 (50 мл 0,067 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 50 мл 0,067 М едкого натра) и хроматографируют в феноле, насыщенном тем же буферным раствором. Для хроматографирования можно также применять 100 мл расплавленного фенола с 24 мл фосфатного буферного раствора и 5 мг 8-оксихинолина. Разделение кислот будет более тщательным по сравнению с системой фенол — аммиак. Лучше применять комплексон III, чем 8-оксихинолин. Рекомендуется присутствие следов аммиака в атмосфере, так как при этом пятна лизина не мешают определению треонина и аланина.

#### П 74. Пропитывание бумаги буферным раствором с pH 8,4

Бумагу пропитывают буферным раствором с pH 8,4 (50 мл 0,067 М борной кислоты и хлористого калия и 8,55 мл 0,067 М едкого натра с 0,3 г комплексона III).

- а) Хроматографирование проводят в *m*-крезоле, насыщенном тем же буферным раствором. При этом разделяются аланин, аргинин, оксипролин, тирозин, гистидин, валин и метионин.
- б) Хроматографирование проводят в смеси *n*-бутанол — бензиловый спирт — буферный раствор с pH 8,4 (45 : 45 : 8). При этом разделяются изолейцин, лейцин, валин и метионин.

#### П 75. Пропитывание бумаги буферным раствором с pH 6,2

Бумагу пропитывают буферным раствором с pH 6,2 (8 мл 0,067 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 2 мл 0,067 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Для хроматографирования используют *o*-крезол, насыщенный тем же буферным раствором. При этом фенилаланин отделяется от остальных аминокислот.

**П 76. Пропитывание бумаги буферным раствором с рН 9**

Бумагу пропитывают буферным раствором с рН 9 (50 мл 0,067 М борной кислоты и хлористого калия и 21,3 мл 0,067 М едкого натра). Подвижной фазой является коллидин, насыщенный тем же буферным раствором. При этом триптофан отделяется от остальных аминокислот.

**П 77. Система с трет-бутанолом и буферным раствором с рН 8,4**

Бумагу пропитывают буферным раствором, полученным растворением 4,143 г борной кислоты и 4,143 г хлористого калия в 500 мл дистиллированной воды с добавкой 0,15 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (или ее натриевой соли) в 57 мл 0,1 н. едкого натра; устанавливают рН в пределах 8,4—8,5. Для хроматографирования применяют смесь *трет*-бутанола (с 5% воды) и описанного буферного раствора (85 : 15). Атмосферу насыщают растворителем, но ни в коем случае не буферным раствором, применяемым для пропитки. На линию старта наносят каплю метилоранжа, который показывает перемещение наиболее подвижных аминокислот. Хроматографирование проводят до тех пор, пока пятно метилоранжа не достигнет верхнего края бумаги (4—9 дней). В качестве наиболее пригодной бумаги можно применять ватман 1 или Шлейхер — Шульц 20436.

**П 78. Разделение оптических антиподов фенилгликолола и фенилаланина (Берлингоцци и сотрудники)**

Бумагу помещают в камеру, снабженную термометром и психрометром; влажность воздуха регулируют подачей сухого или влажного воздуха таким образом, чтобы бумага содержала 4,2—5,8% воды. Для хроматографирования применяют раствор *d*-винной кислоты в *n*-бутаноле, насыщенном минимальным количеством воды. Для расщепления фенилгликолола оптимальное количество *d*-винной кислоты составляет 5%, для фенилаланина — 3%, для лейцина — 1%. *d*-Формы имеют более низкие значения  $R_f$ .

**П 79. Окисление метионина до сульфона перед хроматографированием**

К 5 мл анализируемого раствора добавляют 0,5 мл перекиси водорода и 2,5 мл 2,5%-ного раствора молибдата аммония в 5 н. серной кислоте. Раствор выдерживают 40 мин при комнатной температуре.

**П 80. Непосредственное определение на бумаге (Хайс и Франц)**

На линию старта хроматограммы наносят на четные места образцы стандартных растворов (1 г смеси аминокислот в 100 мл) в убывающем количестве — 30, 25, 20, 15, 10, 5 мкл, а на нечетные — 5, 10, 15, 20, 25, 30 мкл испытуемого образца соответствующей концентрации. Все нанесенные точки должны быть одинаковой величины. После хроматографирования и проявления пятен отыскивают для каждой аминокислоты три соседних пятна, у которых постепенно увеличивается либо площадь, либо интенсивность окраски. Например, если пятно аланина на хроматограмме, образованное 10 мкл испытуемого образца, подобно пятну 25 и 20 мкл стандартного образца, но ближе к 20 мкл, можно предположить, что в 10 мкл испытуемого образца содержится такое же количество аланина, как и в 22 мкл стандартного раствора известной концентрации.

**П 81. Определение путем измерения негатива (Кейл)**

Гидролизат, содержащий метионин и цистин, предварительно окисляют надмуравьиной кислотой. На линию старта одномерной хроматограммы наносят 80—100 мкг смеси в виде поперечной линии длиной 13 мм, на остальные места наносят стандартную смесь аминокислот, аналогичную по своему составу испытуемой смеси; кроме того, наносят каплю тропеолина ОО. Первое хроматографирование в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) проводят с перетеканием до тех пор, пока пятно тропеолина достигнет нижнего края бумаги. После сушки хроматограмму хроматографируют в той же системе, повторяя эту операцию 5—8 раз, причем каждый раз до достижения растворителем нижнего края бумаги. Проявление проводят погружением хроматограммы в 0,7%-ный раствор нингидрина в безводном ацетоне, после чего хроматограмму выдерживают в течение 8—10 час при комнатной температуре в полутьме, причем в атмосфере не должно содержаться аммиака. Затем хроматограмму освещают минимум двумя источниками света с определенного расстояния и фотографируют на фотопленку. Отношение величины площадей пиков анализируемых образцов, полученных измерением на микрофотометре, сравнивают с площадями стандартных образцов и результаты выражают в виде части от общего содержания аминокислот. Метионинсульфон (располагающийся на хроматограммах вместе с гликоколом и серином), тирозин и триптофан этим способом не определяются, изолейцин и лейцин определяются совместно.

**П 82. Фотометрическое определение с нингидрином (Коннел и сотрудники)**

Бумагу ватман 3 предварительно промывают 2 н. уксусной кислотой (3 дня), водой (4 дня), 0,6 н. гидроокисью лития (22 дня), водой (9 дней), 0,1 %-ным уксуснокислым кальцием (3 дня), водой (5 дней) и этанолом (4 дня). Хроматограмму проявляют раствором 50 мг нингидрина в смеси 75 мл абсолютного этанола и 25 мл 2 н. уксусной кислоты (если для пропитки бумаги применялись щелочи, то используют 10 н. уксусную кислоту). Пропитанную бумагу нагревают при 65° в течение 5—10 мин, пятна вырезают и каждое смачивают 0,25—0,3 мл щелочного буферного раствора (9,28 мг борной кислоты растворяют в метаноле, добавляют 32,5 мл 6 н. едкого кали и приливают воду до объема 500 мл); затем пятна сушат в течение 5 мин в токе воздуха при температуре 40°. Каждый кусочек бумаги с пятном помещают на дно пробирки, куда приливают 2 мл реактива (380 мг нингидрина и 120 мг гидриндантина растворяют в 50 мл метилцеллозольва, не содержащего перекиси, и добавляют 1 М ацетатный буферный раствор с рН 4,6 до объема 100 мл; раствор следует хранить в атмосфере азота при температуре 0°). Затем пробирки помещают на 20 мин в кипящую водяную баню, после чего их охлаждают. Жидкость фильтруют через ранее вырезанный кусочек бумаги (содержащий пятно), собирая фильтрат в мерный цилиндр емкостью 10 мл, кусочек бумаги промывают 50 %-ным водным раствором этанола, затем тем же растворителем доливают до отметки. Фотометрирование проводят в течение одного часа при 570 мμ. Табачный дым в лабораторном помещении повышает значения для слепого опыта с бумагой.

*Приготовление гидриндантина.* К раствору 80 г нингидрина в 2 л воды, нагретой до 90°, добавляют при перемешивании 80 г аскорбиновой кислоты в 400 мл воды, нагретой до 40°. Через 30 мин полученный раствор охлаждают водопроводной водой. Гидриндантин отфильтровывают, промывают водой, сушат до постоянного веса над пятиокисью фосфора в вакууме без доступа света и хранят в банке из темного стекла. Выход гидриндантина составляет примерно 75 г.

- П 83. **Определение с помощью суспензии фосфорнокислой меди (Войвуд)**  
*Суспензия фосфорнокислой меди.* 1 объем  $\text{CuCl}_2$  (27,3 г  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 1 л кипяченой дистиллированной воды) смешивают с 1 объемом раствора третичного фосфорнокислого натрия (25,6 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  растворяют в 500 мл дистиллированной кипяченой воды, прибавляют 180 мл 1 н. едкого натра и добавляют воду до объема 1 л), а затем кипятят с 4 объемами  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (25,6 г в 1 л) с обратным холодильником в течение 1 час. Суспензию можно применять в интервале от 1 до 7 дней, считая с момента приготовления.

Из хроматограммы вырезают место, содержащее аминокислоту, измельчают его и помещают в пробирку, куда приливают 2,5 мл раствора 0,18 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (согласно Босеру, добавляется еще 0,4%  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) и 2,5 мл суспензии меди. Через 30 мин содержимое пробирки фильтруют через складчатый фильтр и 2 мл фильтрата добавляют к 8 мл воды, находящейся в пробирке центрифуги. Затем добавляют 0,1 мл 2%-ного свежешелученного водного раствора диэтилдитиокарбамата. Полученный раствор выдерживают 10 мин, после чего окрашенный в желтый цвет раствор экстрагируют в течение 15 сек встряхиванием с 10 мл амилового спирта. Раствор отделяют центрифугированием и фотометрируют при 440 мμ (на свету окраска бледнее, поэтому рекомендуют работать в полумраке). Полученный результат корректируют по значению слепого опыта, найденному для вырезанного свободного фона бумаги.

- П 84. **Колориметрическое определение с нингидрином и  $\text{CdCl}_2$  (Монтрей и Куавин)**

Хроматограмму погружают в раствор 75 мг  $\text{CdCl}_2$ , 6 мл воды, 0,3 мл уксусной кислоты, 2 г нингидрина и 100 мл ацетона. Через 24 час раствор приобретает максимальную окраску. Пятна вырезают, экстрагируют метанолом и колориметрируют при 509 мμ. Молярная экстинкция различных аминокислот различна.

- П 85. **Хроматографирование и определение ДНФ-аминокислот**

Водный раствор аминокислот (20—30 мμ в 3 мл) смешивают с небольшим избытком 1-фтор-2,4-динитробензола и выдерживают в течение 80 мин при 40°; рН раствора, равный 9, поддерживают добавкой щелочи. Избыток 1-фтор-2,4-динитробензола экстрагируют эфиром, раствор подкисляют, а ДНФ-аминокислоту пятикратно экстрагируют 5 мл эфира. Водный слой (ДНФ-аргинин и α-ДНФ-гистидин) разбавляют до 10 мл. 2 мл эфирного и 1 мл водного слоя наносят на хроматограмму. Хроматографирование проводят в первом направлении смесью толуол —  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  — пиридин — 0,8 н. аммиак (5 : 3 : 1,5 : 3) восходящим способом. Приведенная система разделяет ДНФ-аргинин и ДНФ-гистидин. В другом направ-

лении хроматографируют буферным раствором  $1,5 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4 + 0,5 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ . Пятна вырезают и промывают 4 мл воды при  $55-60^\circ$  в течение 15 мин. Фотометрирование проводят при 360 мμ (для случая ДНФ-пролина — при 385 мμ). Факторы для расчета соотношения аминокислот приводятся в работе Леви. Абсолютные результаты лучше всего устанавливать по общему содержанию аминокислот, определяемому расходом 1-фтор-2,4-динитробензола.

## II 86. Экстракция бутанолом

Плазму или гомогенаты тканей подкисляют 1 н. соляной кислотой до pH 1—2 и четырежды встряхивают с равным объемом *n*-бутанола. При pH выше 3 моно- и диiodтирозины полностью не экстрагируются. Йодированные тиронины (тироксин) можно экстрагировать *n*-бутанолом при нейтральной или кислой реакции. *n*-Бутанол затем упаривают при температуре ниже  $50^\circ$ , остаток вновь растворяют в воде и упаривают в вакууме, остаток после второго упаривания растворяют в 1 н. аммиаке и наносят на хроматограмму. Чайков и сотрудники добавляют в экстракт бутанола перед его упариванием от 0,1 до 0,3 мг тиреоурацила (на 10 мл раствора), затем упаривают раствор в токе азота и остаток наносят на хроматограмму после растворения в смеси этанола с 2 н. аммиаком (1 : 1).

## II 87. Щелочной гидролиз

- а) 5 г гомогенизированной ткани нагревают 4 час с обратным холодильником с 10 мл 2 н. LiOH в 20%-ном этаноле.
- б) 50 мг тиреоглобулина нагревают с 1 мл 8%-ного  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  в течение 13 час при  $100^\circ$ .

## ПЕПТИДЫ И ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ

### II 88. Экстракция пептидов (Винник и сотрудники)

Ткань растирают с 2 частями 0,5%-ной уксусной кислоты с добавкой 7 частей этанола. Суспензию нагревают в течение нескольких минут до кипения и выпавший осадок белка центрифугируют. Раствор выдерживают в течение 16 час в холодильном шкафу, фильтруют и отгоняют этанол в вакууме. Водный раствор затем экстрагируют эфиром (для удаления липидов) и лиофилизируют.

### II 89. Окисление надмуравьиной кислотой

К нескольким миллиграммам пептида, полученного после упаривания исследуемого раствора, добавляют 0,5 мл раствора надмуравьиной кислоты (1,8 мл 85%-ной муравьиной кислоты смешивают с 0,2 мл 26%-ной  $\text{H}_2\text{O}_2$ , смесь выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре) и раствор выдерживают при комнатной температуре. Окисление прекращают добавкой равного объема дистиллированной воды. Раствор упаривают досуха в вакууме и всю операцию повторяют еще два раза. Затем остаток смачивают водой и упаривают досуха.

### II 90. Кислотный гидролиз пептидов

1 мг пептида нагревают в течение 18 час при температуре  $105^\circ$  с 0,1 мл 6 н. соляной кислоты. Избыток последней упаривают

в вакууме над едким кали. Гидролизат смачивают водой и вновь упаривают досуха. Эту операцию повторяют еще два раза.

**П 91. Неполный кислотный гидролиз белка**

200 мг белка растворяют в 10 мл соляной кислоты и выдерживают 140 час при 37°. Избыток соляной кислоты удаляют трехкратным упариванием досуха с дистиллированной водой. В результате гидролиза получаются преимущественно дипептиды.

**П 92. Частичный ферментативный гидролиз белков**

1 г белка растворяют в 100 мл воды и денатурируют кипячением в течение 10 мин на водяной бане. Раствор затем охлаждают, разбавленным аммиаком устанавливают pH, равный 8,2, и добавляют 30 мг кристаллического трипсина. При хорошем перемешивании и при температуре 37° суспензию гидролизуют (24 часа). Негидролизованную часть осаждают трихлоруксусной кислотой, осадок отделяют центрифугированием и избыток трихлоруксусной кислоты удаляют путем экстракции эфиром. Водный раствор пептидов упаривают досуха.

**П 93. Дезаминирование пептидов с последующим гидролизом**

В капилляре для гидролиза смешивают 25 мкл раствора пептида и 5 мкл 0,1 М раствора  $\text{NaNO}_2$ . Осторожно приливают 25 мкл концентрированной соляной кислоты и смесь выдерживают в течение 15 мин при комнатной температуре. Для удаления избытка азотистой кислоты добавляют кристаллик мочевины, капилляр запаивают и содержимое гидролизуют 16 час при температуре 105°.

**П 94. Динитрофенилирование аминокислот и пептидов (Шрёдер и Ле Жетте)**

1 мМ пептида растворяют в 1 мл воды и к раствору добавляют 20 мг  $\text{NaHCO}_3$  и 0,02 мл динитрофторбензола, растворенного в 2 мл этанола. Смесь механически встряхивают в течение 3 час, затем разбавляют 10 мл воды и экстрагируют четыре раза 25 мл и пять раз 10 мл эфира (в случае пептидов экстрагируют этилацетатом). Объединенные эфирные экстракты три раза промывают 10 мл воды, которую каждый раз подкисляют 2 каплями 6 н. соляной кислоты.

**П 95. Динитрофенилирование в триметиламине**

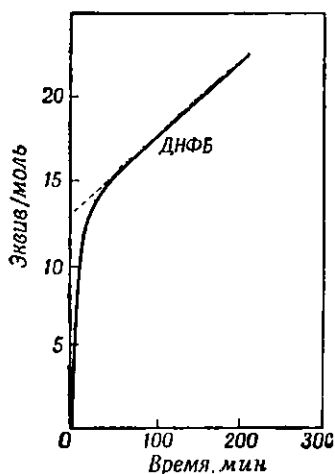
Пептид растворяют в 0,1 мл 1%-ного раствора триметиламина и прибавляют 10 мкл динитрофторбензола в 0,2 мл этанола. Через 2 час добавляют несколько капель воды и 1%-ного триметиламина и трижды экстрагируют эфиром. Водный раствор упаривают, растворяют в нескольких каплях кислоты и гидролизуют.

**П 96. Динитрофенилирование белков без денатурирования**

500 мг белка, 500 мг  $\text{NaHCO}_3$ , 500 мг динитрофторбензола и 10 мл воды при полном удалении пузырьков воздуха встряхивают в течение 6 час со стеклянными шариками. После отделения непрореагировавшего динитрофторбензола раствор белка диализуют до тех пор, пока наружный слой жидкости в течение 24 час не будет окрашиваться в желтый цвет.

**П 97. Динитрофенилирование белка**

Белок (минимум 0,2  $\mu$ М) суспендируют в 3 мл 0,1 М хлористого калия и устанавливают рН раствора равным 8,0. При непрерывном перемешивании добавляют 0,1 мл динитрофторбензола и с этого момента поддерживают рН раствора равным 8 непрерывным добавлением едкого кали известной концентрации при температуре 45°. Из характера кривой, выражающей расход едкого кали в зависимости от времени (1,5—2 час) определяют количество динитрофторбензола, связывающегося с белком (рис. 241). Реакционную смесь переносят в пробирку центрифуги и экстрагируют три раза эфиром. Подкислением осаждают ДНФ-белок и суспензию вновь экстрагируют эфиром. Затем ДНФ-белок промывают при центрифугировании водой, ацетоном и эфиром.

**П 98. Экстракция ДНФ-аминокислот**

Гидролизат ДНФ-пептидов разбавляют 5 объемами воды и 3—4 раза экстрагируют эфиром, освобожденным от перекисей встряхиванием с водным раствором  $\text{FeSO}_4$ . Водную и эфирную фазы упаривают.

Р и с. 241. Зависимость расхода едкого кали от времени (в эквивалентах на молекулу белка) при реакции  $\alpha$ -кортикотропина с 2,4-динитрофторбензолом (Леви и Ли).

**П 99. Динитрофенилирование с использованием ионообменных смол**

Динитрофенилирование проводят в среде триметиламина по методу, приведенному в П 95, но в отличие от этого метода реакционную смесь не экстрагируют, а пропускают через колонку, заполненную зеролитом-Н в  $\text{Cl}^-$ -форме, после чего промывают небольшим количеством воды. При этом непрореагировавшая часть пептида удаляется. ДНФ-пептид десорбируют небольшим количеством ледяной уксусной кислоты. После гидролиза ДНФ-пептида 6 н. соляной кислотой отщепившуюся ДНФ-аминокислоту можно отделить на небольшой колонке зеролита-Н (используя также 6 н. соляную кислоту). В элюат через колонку проходят свободные аминокислоты. Десорбцию ДНФ-аминокислоты можно провести также ледяной уксусной кислотой.

**П 100. Пропитывание бумаги для хроматографирования ДНФ-аминокислот**

22,45 г кислого фталата калия и 4 г едкого натра растворяют в воде и добавляют воду до объема 220 мл. Для пропитывания бумаги приготовленный раствор разбавляют в соотношении 1 : 9. Бумагу смачивают буферным раствором и сушат. Таким же буферным раствором насыщают и третичный амиловый спирт.

**П 101. Гидролиз ДНФ-аминокислот аммиаком**

Образец ДНФ-аминокислоты нагревают с концентрированным аммиаком в запаянной трубке в течение 2 час до 105°. Затем гидролизат упаривают, а остаток растворяют в воде и экстрагируют эфиром. Водный раствор содержит выделившуюся аминокислоту.

**П 102. Гидролиз ДНФ-аминокислоты гидратом окиси бария**

ДНФ-аминокислоту нагревают с насыщенным раствором  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  в запаянной трубке в течение 2 час при температуре 140°. Если раствор оставляют на ночь, то нагревают на следующий день при температуре 105°. Небольшим кусочком твердой углекислоты удаляют  $\text{Ba}^{2+}$  и после кипячения на водяной бане (5 мин) осадок удаляют центрифугированием. Некоторые авторы рекомендуют проводить гидролиз за более короткое время (1 час при 100°).

**П 103. Фенилизотиоцианатный метод применительно к пептидам**

0,2—3 мг пептида (обычно достаточно 0,2—1  $\mu\text{M}$  пептида) растворяют в 4 мл 50%-ного водного раствора диоксана, освобожденного от перекисей кипячением с металлическим натрием в течение 10 час. рН раствора с помощью 0,01 н. едкого натра устанавливают равным 8,7—9. Затем добавляют 0,1 мл фенилизотиоцианата и перемешивают в течение 2 час при 40°. Реакционную смесь семь раз экстрагируют бензолом и водный раствор упаривают досуха в вакууме над едким натром. Натриевую соль фенилизотиоцианата пептида растворяют в 2—10 мл воды и количество, соответствующее 0,2—1  $\mu\text{M}$ , разбавляют таким образом, чтобы концентрация пептида составляла 0,2—1  $\cdot 10^{-4}$  М, а концентрация соляной кислоты равнялась 3 н. После этого в течение 2 час несколько раз измеряют спектр поглощения раствора в области 235—280 м $\mu$ . Исследуют изменение максимума поглощения с 240 до 265—270 м $\mu$  (с новым минимумом приблизительно при 240 м $\mu$ ). Если превращение фенилизотиоцианата в фенилтиогидантоин протекает слишком медленно, то раствор можно нагреть до 40—45°. Течение реакции исследуют до тех пор, пока величина экстинкции для максимума не достигнет самого высокого значения. Фенилтиогидантоин экстрагируют трехкратным встряхиванием с этилацетатом. Объединенные экстракты два раза промывают небольшим количеством воды. Когда спектрофотометрическим путем находят, что этилацетатный раствор не содержит фенилтиогидантоина, водный слой упаривают, нейтрализуют до рН 7—7,5 и этилацетатом экстрагируют фенилтиогидантоин гистидина. Если же гистидин отсутствует и нейтральный раствор показывает максимум поглощения при 268 м $\mu$ , то тем самым подтверждается присутствие фенилтиогидантоина аргинина. Фенилтиогидантоин аргинина не препятствует определению другой аминокислоты, находящейся в растворе.

Раствор для второго цикла готовят следующим образом. Водный раствор после первого цикла упаривают в вакууме над едким кали и остаток после упаривания растворяют в 4 мл 50%-ного диоксана. Последующий прием аналогичен определению первой N-концевой аминокислоты.

**П 104. Фенилизотиоцианатный метод для белка**

На  $\frac{4}{5}$  поверхности хроматографической бумаги размером 1  $\times$  5 см наносят 50  $\mu\text{л}$  2,5—5%-ного раствора белка. Обычно на одну пробу

белка берут от 2 до 12 полосок, причем белок, нерастворяющийся в воде, наносят в растворе слабой кислоты или основания. После сушки каждую полоску увлажняют 50—70  $\mu$ л свежеприготовленного 20%-ного раствора фенилизотиоцианата в диоксане, не содержащем перекиси. Влажные полоски помещают в атмосферу диоксана, пиридина и воды, где они выдерживаются в течение 2—3 час при температуре 40°. Затем полоски промывают несколько раз бензолом, слегка встряхивая их, причем каждый раз берут новую порцию бензола. Далее полоски промывают равными частями абсолютного этанола и эфира, не содержащего перекиси. Промывание продолжают до тех пор, пока оптическая плотность при 270  $\mu$ м 4 мл жидкости после встряхивания в течение 2—3 час будет ниже 0,025; этого обычно достигают через 24 час. Затем полоски сушат, помещают на дно эксикатора, где находятся стаканчики с ледяной уксусной кислотой и 5,7 н. соляной кислотой. Эксикатор эвакуируют до остаточного давления 100 мм рт. ст. Через 4—16 час (в зависимости от характера белка) бумагу проветривают и отщипавшийся фенилтиогидантоин экстрагируют смесью этанол — эфир. N-концевая группа аминокислоты определяется либо непосредственно хроматографированием фенилтиогидантоина, либо в виде свободной аминокислоты после гидролиза фенилтиогидантоина. После экстракции смесью этанол — эфир полоски считаются готовыми для дальнейшей стадии разложения.

#### П 105. Получение диметиламинопептида

Пептиды, плохо растворяющиеся в воде, переводят в солянокислые соли. К раствору 1—2 мг пептида в 50%-ном водном метаноле добавляют 2 капли 37%-ного формальдегида и 5 мг катализатора (1 г  $\text{PdCl}_2$  растворяют в 1 мл 10 н. соляной кислоты и разбавляют водой до объема 100 мл; после добавления 5 г уксуснокислого натрия и 5 г активированного угля суспензию насыщают водородом; катализатор фильтруют, промывают водой и сушат на воздухе). Метилирование проводят в конической колбочке емкостью 10 мл, которая снабжена пробкой с двумя отверстиями. В одно отверстие вставлена трубка, опущенная до дна, а в другую — трубка, по которой отводится водород. После удаления воздуха в раствор вводят водород, насыщенный парами метанола и формальдегида. Насыщение водородом продолжается обычно несколько часов до отрицательной реакции раствора с нингидрином. После центрифугирования раствор упаривают в токе воздуха в пробирке при 100°. Упаривание проводят несколько раз, пока не исчезнет запах формальдегида.

#### П 106. Приготовление раствора карбоксипептидазы

1 мг кристаллического фермента суспендируют в 1 мл воды, содержащем 0,1 мл 1%-ного  $\text{NaHCO}_3$ ; суспендирование проводят при 0—4°. Затем фермент растворяют, добавляя в суспензию 0,05—0,1 мл 0,1 н. едкого натра и раствор быстро обрабатывают 0,1 н. соляной кислотой до pH 8. К полученному раствору добавляют 50-кратный молярный избыток раствора диизопропилфторфосфата (ДФФ) в безводном изопропанол (15  $\mu$ л 0,1 М раствора ДФФ на 1 мг фермента) и раствор выдерживают 1 час при 25°. Карбоксипептидаза применяется в виде получившегося раствора.

**П 107. Определение С-концевой группы белка гидразинолизом**

Гидразинолиз проводят путем нагревания 0,2—0,4  $\mu$ молей сухого белка с 0,5 мл безводного гидразина в запаянной трубке. Реакция протекает в течение 10 час при температуре 100°. Избыток гидразина удаляют в вакууме в присутствии серной кислоты, а остаток растворяют в 1 мл воды. К раствору добавляют 0,2 мл бензальдегида и реакционную смесь взбалтывают 2 час при комнатной температуре. Бензальдегидный слой вместе с продуктами конденсации гидразидов отделяют на центрифуге. Водный слой, содержащий аминокислоты, разбавляют 0,5 мл 6%-ного  $\text{NaHCO}_3$  и 3 мл 2,5%-ного 1-фтор-2,4-динитробензола в этаноле. Динитрофенилирование проводят при комнатной температуре в течение 80 мин. Затем реакционную смесь разбавляют 20 мл воды, подкисляют 2 н. соляной кислотой и дважды экстрагируют 20 мл этилацетата. Этилацетатный слой разбавляют двумя объемами эфира и дважды экстрагируют 50 мл 2%-ного  $\text{NaHCO}_3$ . Бикарбонатный раствор промывают один раз этилацетатом, затем подкисляют и дважды экстрагируют 15 мл этилацетата. Растворитель удаляют в вакууме и динитрофенол сублимируют. Остаток растворяют в этилацетате и хроматографируют.

**П 108. Определение С-концевой аминокислоты в пептидах тиогидантоиновым методом**

В 3—4 мл смеси 90% уксусного ангидрида и 10% уксусной кислоты растворяют 30 мг пептида. После добавления 15 мг роданистого аммония раствор нагревают в течение 30 мин на кипящей водяной бане. Реакционную смесь экстрагируют семь раз петролейным эфиром порциями по 8 мл. Петролейный эфир отгоняют, а остаток растворяют в 0,4 н.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , количество которого достаточно, чтобы рН раствора было выше 12,5. Раствор выдерживают 90 мин, затем подкисляют серной кислотой до рН 6,5. Сульфат бария удаляют центрифугированием. Раствор несколько раз экстрагируют 10 мл этилацетата и объединенные органические слои упаривают почти досуха. Остаток растворяют в воде до общего объема 15 мл и вновь экстрагируют пять раз этилацетатом. Объединенные экстракты сушат сульфатом магния и упаривают досуха в токе водорода. Тиогидантоины идентифицируют либо непосредственным хроматографированием, либо после гидролиза в виде свободных аминокислот. Водный раствор после первой экстракции этилацетатом вымораживают и вторую аминокислоту определяют таким же методом, как и первую.

**П 109. Определение С-концевой аминокислоты белков тиогидантоиновым методом**

Данный метод в принципе аналогичен методу П 108 (50 мг белка, 20 мг роданистого аммония, 4 мл смеси уксусного ангидрида и уксусной кислоты). Раствор белка не нужно нагревать на водяной бане; в некоторых случаях для завершения реакции достаточно 2 дней при комнатной температуре.

**П 110. Гидролиз тиогидантоинов гидратом окиси бария**

Тиогидантоин нагревают 5 час с 3 мл 1,2 н.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  при 140°. После окончания гидролиза нейтрализуют с помощью  $\text{CO}_2$ . После удаления карбоната бария хроматографируют свободную аминокислоту.

**П 111. Гидролиз тиогидантоинов бромистоводородной кислотой**

Тиогидантоин нагревают с 0,2 мл 48%-ной бромистоводородной кислоты в течение 6 час при 150°. После окончания гидролиза раствор разбавляют водой, фильтруют и упаривают досуха в вакууме. Остаток после упаривания увлажняют водой и полностью удаляют кислоту многократным упариванием с водой.

**П 112. Определение С-концевой аминокислоты белков после восстановления**

50 мг пепсина суспендируют в 50 мл сухого эфира. К суспензии в течение 50 мин добавляют 500 мг алюмогидрида лития, растворенного в эфире. Реакционную смесь перемешивают 8 час при 35°. Затем избыток алюмогидрида лития разлагают водой. Раствор подкисляют соляной кислотой, эфир отгоняют при пониженном давлении и восстановленный белок гидролизуют в 30 мл 6 н. соляной кислоты в течение 20 час. Соляную кислоту удаляют из гидролизата многократным упариванием с водой. Образовавшийся сироп охлаждают до 0°, подщелачивают и непрерывно экстрагируют эфиром в течение 30 час. После упаривания эфира аминоспирт идентифицируют методом хроматографии на бумаге.

**П 113. Анодное окислительное декарбоксилирование**

Несколько миллиграммов ДНФ-пептидов растворяют в 1—2 мл безводного метанола. В пробирку, охлажденную льдом, помещают платиновые электроды с поверхностью 1 см<sup>2</sup>, удаленные друг от друга на 3 мм. Электролиз протекает при 50—150 ма и 200—600 в в течение 1—3 час. Раствор после электролиза упаривают, остаток растворяют в 1—2 мл 20%-ной соляной кислоты и гидролизуют в течение 15 мин при 100°. Соляную кислоту удаляют многократным упариванием с водой.

**ПУРИНЫ, ПИРИМИДИНЫ, АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ КОМПОНЕНТЫ  
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ****П 114. Выделение и разделение дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой (РНК) кислот**

Ткань гомогенизируют в течение 10 мин в 70—95%-ном этаноле при 0°. Затем при температуре 5° промывают 70%-ным этанолом и осадок отделяют центрифугированием. Суспензию еще один раз промывают 70%-ным этанолом с 0,1% HClO<sub>4</sub>. После экстракции этанолом остаток дважды кипятят на водяной бане в течение 3 мин с 5 мл смеси этанол — эфир (3 : 1), затем два раза суспендируют в 5 мл 0,2 н. HClO<sub>4</sub> на холоду и осадок отделяют центрифугированием. Эти операции необходимо проводить быстро. Нерастворившуюся часть суспендируют в 5 мл 1 н. HClO<sub>4</sub> и выдерживают при 4° в течение 4—6 час. Большая часть РНК переходит в раствор. Как правило, раствор оставляют на ночь, затем разделяют центрифугированием и нерастворившуюся часть еще два раза промывают 5 мл 1 н. HClO<sub>4</sub>. Объединенные экстракты содержат фракцию РНК. Нерастворившийся остаток суспендируют еще два раза в 5 мл 0,5 М HClO<sub>4</sub> и нагревают в течение 20 мин на водяной бане при температуре 70°. Объединенные фильтраты содержат ДНК.

**П 115. Расщепление нуклеиновых кислот на пурины**

10 мг нуклеиновой кислоты гидролизуют 5 мл 1,5%-ного метанольного раствора HCl при 37° в течение минимум 20 час. Полученный раствор сушат в вакууме, растворяют в смеси *n*-пропанол — 0,5 н. соляная кислота (2 : 1) и наносят на бумагу.

**П 116. Расщепление нуклеиновых кислот на пиримидины**

10 мг нуклеиновой кислоты гидролизуют с 2 мл 6 н. соляной кислоты при 120° в течение 2 час. Гидролизат упаривают в вакууме досуха. Остаток после растворения непосредственно наносят на бумагу.

**П 117. Выделение пуринов и пиримидинов в виде серебряных солей**

Образец гидролизуют 2 час с 1 н. серной кислотой, а затем к фильтрату добавляют водный раствор  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ , насыщенный при нагревании. Раствор выдерживают в холодильном шкафу в течение 24 час. Осадок отфильтровывают, промывают 2 н. серной кислотой с небольшим количеством  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  и разлагают 1 н. соляной кислотой при нагревании. После упаривания досуха образец растворяют в воде и наносят на бумагу.

**П 118. Гидролиз образца**

1 г ткани непосредственно гомогенизируют в 10%-ной трихлоруксусной кислоте, осадок промывают абсолютным этанолом, обезжиривают смесью этанол — эфир (1 : 1) и гидролизуют непосредственно до нуклеотидов 5 мл 0,5 н. едкого натра при 37° в течение 24 час. При последующем гидролизе муравьиной кислотой рН раствора устанавливают равным 4,5, и осадок, который образует белок, отделяют. После разбавления водой осадок очищают с помощью ионообменных смол (например, на деацитите).

## АЛКАЛОИДЫ

**П 119. Разрушение комплексов алкалоидов с йодоплативатом (Гольдбаум и Казьяк)**

После проявления йодоплативатом пятна вырезают из бумаги и помещают в делительную воронку; затем заливают их 5 мл 4%-ного раствора сульфита натрия в полунасыщенном растворе буры (рН 9,5). Когда пятна обесцветятся, прибавляют подходящий органический растворитель, экстрагируют алкалоид при встряхивании и экстракт упаривают.

**П 120. Определение с помощью фосфорномолибденовой кислоты (Лист)**

Хроматограмму протягивают через раствор 1 г фосфорномолибденовой кислоты в 98 мл воды и 2 мл концентрированной соляной кислоты. Затем промывают в проточной воде в течение 10 мин. После высушивания хроматограммы осадок алкалоидов восстанавливают, опрыскивая раствором 1 г  $\text{SnCl}_2$  в 100 мл 3,8%-ной соляной кислоты. Интенсивность синего окрашивания пятен можно оценить фотометрическим путем, после того как бумагу сделают прозрачной при помощи  $\alpha$ -бромнафталина и парафина (см. стр. 183).

**II 121. Количественное определение тропиновых алкалоидов**

Алкалоид элюируют из хроматограммы смесью этанола, уксусной кислоты и воды (5:6:89). Элюат количественно отфильтровывают через стеклянный фильтр G2 или G3 и разбавляют в мерной колбе до объема 10 мл. Из этого раствора отбирают пипеткой 2, 3 и 4 мл в стеклянные чашечки и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. В каждую чашечку приливают по 0,3 мл дымящей азотной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 6 мин. Нитрование можно повторять. Затем пробы помещают на 10 мин в сушильный шкаф при 105° и далее в эксикатор над пятиокисью фосфора. Пробы вынимают из эксикатора лишь перед проведением самой цветной реакции. Остаток в чашечке растворяют в 5 мл сухого пиридина, сразу же прибавляют 0,2 мл 1%-ного раствора едкого кали в безводном метаноле и после быстрого перемешивания стеклянной палочкой переливают в кювету и закрывают. Поглощение раствора измеряют точно в течение 2 мин на фотометре Пульфриха с фильтром S 57 в кюветах диаметром 0,5 см. Оптимальные количества алкалоидов колеблются в пределах 50—200 мкг.

**II 122. Пропитка диметилфталатом**

Бумагу пропитывают, протягивая ее через 10%-ный раствор диметилфталата в эфире или лучше в изопропиловом эфире, позволяют избытку раствора стечь и подвешенную хроматограмму выдерживают на воздухе 15 мин. Алкалоиды наносят на пропитанную бумагу. Для разделения группы эрготоксина пользуются смесью формамид — вода (4:6) с рН, установленным с помощью муравьиной кислоты на 4,0; для разделения группы эрготамина — той же системой с рН 5,2 и для дигидроэрготоксиновых алкалоидов — смесью формамид — вода (1:4) с рН 4,0.

**II 123. Щелочной гидролиз алкалоидов спорыньи**

5 мг алкалоида в ампуле растворяют в 5 мл 10%-ного едкого натра и ампулу запаивают. Гидролиз протекает в течение 20 час при 70°. Затем пробу подкисляют соляной кислотой и кетокислоту определяют хроматографически, лучше всего после превращения в соответствующие 2,4-динитрофенилгидразоны (II 276).

**II 124. Количественное определение алкалоидов спорыньи**

**Реактив.** 0,2 г *n*-диметиламинобензальдегида растворяют в 35 мл воды и 65 мл концентрированной серной кислоты. К раствору прибавляют 2 капли 5%-ного раствора хлорного железа. Реактивом можно пользоваться в течение нескольких дней после проверки с аналитически чистым эргобазиномалеатом. Пятна, флуоресцирующие синим цветом, вырезают и помещают в пробирки. Прибавляют раствор, состоящий из 1,5 мл 1%-ного раствора винной кислоты и 3 мл указанного выше реактива. После получасового периодического перемешивания стеклянной палочкой раствор, окрашенный в синий цвет, фильтруют через фильтр G 3 и интенсивность окраски его измеряют на спектрофотометре Хильгера, применяя кювету 0,5 см и фильтр 606.

**ДРУГИЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ АЗОТ****П 125. Окисление алкилпиридинов**

1 мг или большее количество алкилпиридинов, находящихся в водном растворе, нагревают на кипящей водяной бане. Затем к раствору алкилпиридинов прибавляют небольшими порциями водный раствор  $\text{KMnO}_4$  до тех пор, пока последний не станет расходоваться очень медленно. В том случае, когда образуются монокарбоновые кислоты, раствор можно наносить на бумагу прямо на осадок  $\text{MnO}_2$ . В случае дикарбоновых кислот необходимо или перевести калиевую соль в свободную кислоту, или использовать для хроматографирования растворитель, содержащий соляную кислоту.

**ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ СЕРУ****П 126. Система, состоящая из *n*-пропанола и бикарбоната натрия**

К 100 мл *n*-пропанола прибавляют при перемешивании 50 мл 5%-ного водного раствора бикарбоната натрия. Ту часть бикарбоната, которая выпадает в осадок, через 15 мин отфильтровывают.

**П 127. Приготовление алкилизотиониевых солей**

- а) *Идентификация алкилгалогенидов.* 1—1,5 мг вещества нагревают вместе с 0,8 мг тиомочевины и 0,4 мг ацетона на кипящей водяной бане в закрытой стеклянной ампуле. Алкилйодиды нагревают 30 мин, *n*-алкилбромиды — 4 час, алкилбромиды с разветвленной алкильной цепью и *n*-алкилхлориды — 10 час (в присутствии кристалликов NaI). После охлаждения ампулу открывают и на хроматограмму наносят 5—20 мкл ацетонового раствора.
- б) *Идентификация O-алкилгрупп.* 0,5—1 мг вещества расщепляют обычным способом при кипячении с йодистоводородной кислотой в каком-либо из аппаратов, использовавшихся для определения алкоксильных групп. Выделяющиеся алкилйодиды поглощаются в приемнике, который заполнен 1 мл раствора 2 мг тиомочевины в ацетоне. Приемник охлаждают льдом. Затем поглощительный раствор помещают в ампулу и нагревают его на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения ампулу открывают и раствор упаривают досуха. Остаток растворяют в 0,1 мл ацетона. Ацетоновый раствор наносят на хроматограмму в количестве 5—20 мкл.
- в) *Идентификация N-алкильных групп.* 1—2 мг вещества обрабатывают обычным способом, который принят при определении алкилимидной группы. Термическое разложение проводят дважды в течение 45 мин. Выделяющиеся алкилйодиды обрабатывают таким же способом, как в предыдущем случае.

**П 128. Приготовление N-алкилтиомочевин**

Для анализа берут около 500 г растительного материала, из которого в первую очередь выделяют гликозиды с помощью метанола. Изотиоцианаты выделяют при помощи мирозиназы и отгоняют с водяным паром. 10 л дистиллата собирают в охлажденном сборнике, содержащем 4 л концентрированного  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Раствор оставляют на ночь, а затем упаривают в вакууме досуха. Температура не должна превышать 55°. Остаток растворяют в хлороформе и наносят на хроматограмму.

## ВИТАМИНЫ

## II 129. Пропитка бумаги основным углекислым цинком

20 г  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  растворяют в 600 мл воды; к раствору при перемешивании добавляют 25 г  $\text{ZnCO}_3$ , а затем 150 мл аммиака (уд. вес 0,88). Раствор фильтруют и фильтрат выдерживают в закрытой склянке в течение нескольких недель. Бумагу погружают на 3 мин в приготовленный раствор и после подвешивания избыток раствора снимают снизу фильтровальной бумагой.

## II 130. Количественный анализ токоферолов (Эггит и Уорд [1,3])

В соответствии с параллельно анализируемой полоской вырезают из хроматограммы полоски длиной 3 см, содержащие отдельные токоферолы, и сразу же промывают в темноте в течение  $\frac{1}{2}$ —1 час 3 мл абсолютного этанола. К элюату добавляют 0,5 мл 0,5%-ного раствора 2,2'-динитридила в этаноле, а затем 0,5 мл 0,2%-ного раствора хлорного железа в том же растворителе. Через 2 мин после добавления хлорного железа колориметрическим методом (при 520 мμ) измеряют окраску элюата. Факторы для расчета концентрации по величине экстинкции для разных токоферолов различны.

## II 131. Экстракция тиаминa из биологического материала

Образец ткани внутренних органов, например печени, растирают с песком и депротенинизируют 100 мл 2%-ной трихлоруксусной кислоты; фильтрат разбавляют 25 мл воды, центрифугируют и устанавливают рН, равный 4,5. Тиамин адсорбируют затем на фуллеровой земле. Через 5 мин после адсорбирования адсорбент промывают смесью этанола с эфиром (1 : 1) и элюируют 2 мл смеси пиридина с водой и уксусной кислотой (1 : 4 : 0,1).

## II 132. Экстракция рибофлавина из биологического материала

2,5 г ткани тщательно растирают с 15 мл воды и приблизительно 2 мл 0,1 н. соляной кислоты, устанавливают рН, равный примерно 2. Смесью выдерживают 5 мин, затем нейтрализуют и доливают водой до объема 25 мл. Затем к раствору добавляют 12,5 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , выпавший осадок отделяют центрифугированием и жидкость после фильтрования встряхивают с 10 г фенола. Верхний слой экстрагируют 15 мл эфира с 0,3 мл воды. На хроматограмму наносят водный слой (Сакамото).

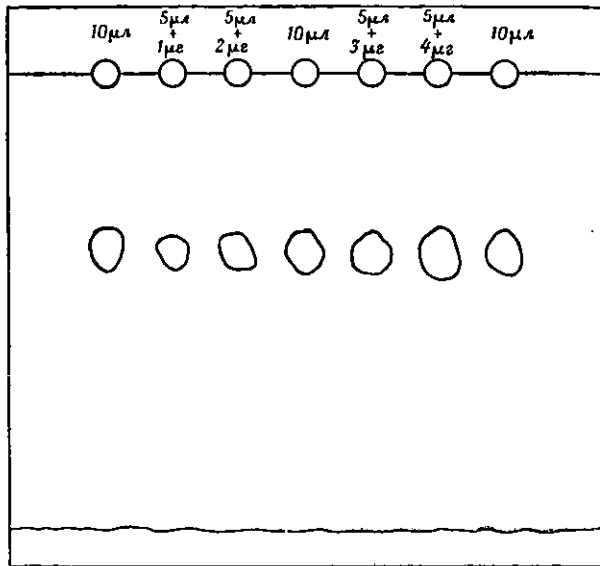
Денатурирование белка можно осуществлять не соляной кислотой, а нагреванием до температуры 80° (Яги).

## II 133. Получение пантоилгидроксамовой кислоты

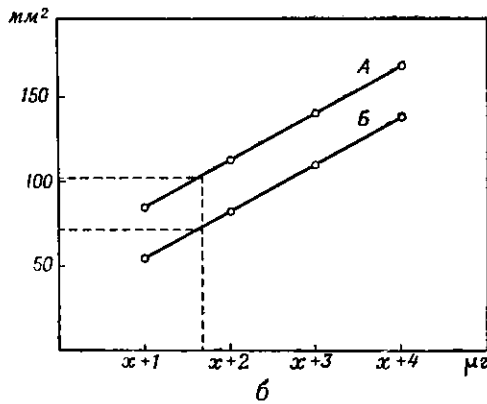
5 мл раствора 8—15 мг пантотеновой кислоты нагревают 3 час на кипящей водяной бане с 0,3 мл концентрированной соляной кислоты. После охлаждения к раствору добавляют 1 мл раствора гидроксилamina (15 г  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  в 100 мл 2 н. едкого натра) и 1 мл 5 н. едкого натра. Раствор выдерживают 5 мин, а затем с помощью соляной кислоты устанавливают рН, равный 2,5—3,2, и доливают дистиллированной водой до объема 10 мл. На бумагу наносят 20 μл раствора пантоилгидроксамовой кислоты.

### П 134. Выделение птеридинов из мочи

100 мл мочи подкисляют ледяной уксусной кислотой до pH 3,5 и раствор встряхивают с 250 мг активированного угля. Спустя 10 мин уголь отделяют центрифугированием и промывают в центрифужной пробирке тремя порциями дистиллированной воды по 50 мл



а



б

Рис. 242. Количественное определение аскорбиновой кислоты (Шаяда).

а — схематическая хроматограмма метода «стандартной добавки»; б — графическая оценка хроматограммы. Чем больше потери при хроматографировании, тем ниже расположена калибровочная кривая.

каждая. После промывания угля поглотившееся вещество извлекают перемешиванием адсорбента с 5 мл 10%-ного аммиака. После выдерживания в течение 30 мин уголь отфильтровывают через плотный фильтр и после упаривания фильтрата досуха наносят концентрированный раствор остатка на хроматограмму.

**П 135. Колориметрическое определение аскорбиновой кислоты**

I. 500 мг 4-метокси-2-нитроанилина растворяют в 125 мл уксусной кислоты и добавляют 10%-ную серную кислоту до объема 250 мл.

II. 0,2%-ный раствор нитрата натрия в воде.

1 мл раствора I смешивают с 1 мл раствора II, 10 мл воды и 50 мл этанола. Вырезанное пятно аскорбиновой кислоты погружают в 5 мл приготовленной смеси и элюируют аскорбиновую кислоту встряхиванием в течение 3 мин. Элюат подщелачивают 2 мл 6%-ного едкого натра. Интенсивность возникающей окраски измеряют колориметрическим методом.

**П 136. Определение I-аскорбиновой кислоты по Шанда (рис. 242)**

На точки 2, 3, 5 и 6 линии старта двух одинаковых хроматограмм наносят по 5  $\mu$ л стандартного раствора аскорбиновой кислоты, содержащей соответственно 1, 2, 3 и 4  $\mu$ г кислоты. Аскорбиновую кислоту, растворенную в смеси 3 г метафосфорной кислоты, 8 мл уксусной кислоты и 92 мл воды, наносят в виде пятна диаметром точно 10 мм. Затем на те же места, т. е. в точки 2, 3, 5 и 6, наносят по 5  $\mu$ л анализируемого образца (образец разбавляют приведенным раствором уксусной кислоты таким образом, чтобы концентрация аскорбиновой кислоты составляла 10—50 мг%). На точки 1, 4 и 7 наносят по 10  $\mu$ л того же образца. Для хроматографирования применяют *n*-бутанол с уксусной кислотой и водой (4 : 1 : 5), время хроматографирования составляет 4 час. При этом фронт растворителя должен быть удален от линии старта приблизительно на 15 см. После сушки на воздухе хроматограмму проявляют индофенольным реактивом (Д 171) и вновь сушат на воздухе. Площади пятен 2, 3, 5, 6 измеряют планиметром или, лучше, миллиметровой бумагой и наносят на диаграмму на ось ординат, тогда как по оси абсцисс откладывают количество ( $\mu$ г) аскорбиновой кислоты. Если опыт проводился правильно, то полученные точки должны находиться на одной прямой (первый контроль). Вторым контролем точности проведения опыта является сходимость измеренных поверхностей пятен 1, 4 и 7; разница не должна превышать 5 мм<sup>2</sup>. На основании средней величины этих трех значений определяют на прямой содержание аскорбиновой кислоты в 5  $\mu$ л образца. Третий рабочий контроль состоит в сравнении углов наклона прямых с результатами, полученными из обеих хроматограмм.

**АНТИБИОТИКИ****П 137. Определение гидроксамовых кислот**

Бумагу, содержащую пятна гидроксамовых кислот, растирают с 1 мл 20%-ного раствора хлорного железа в 0,1 н. соляной кислоте, 10 мл *n*-бутанола, 2 г безводного сульфата натрия и 0,6 г хлористого натрия. Бумагу и соли прижимают к донышку, бутанол сливают и окрашивание оценивают колориметрически, применяя зеленый фильтр.

**П 138. Пропитка для хроматографии аэроспоринов**

К 7,5 г гликокола и 5,85 г хлористого натрия добавляют дистиллированную воду до объема 1000 мл; к 7 частям этого раствора прибав-

ляют 3 части 0,1 н. соляной кислоты так, чтобы рН раствора составлял 2,5. Полученным раствором пользуются для пропитки бумаги.

## НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА

### II 139. Определение молибдена (Поллард)

1 г образца стали растворяют в 8 мл царской водки и раствор упаривают досуха. Остаток растворяют по возможности в наименьшем количестве горячей 2 н. соляной кислоты и затем добавляют дистиллированную воду до объема 10 мл. Полученный раствор не должен быть слишком кислым, так как иначе нельзя будет хорошо отделить молибден от остальных катионов. Если на присутствие молибдена анализируют окисел или молибденовокислую соль, то образец, вес которого должен быть точно известен, растворяют в 2 н. едком натре. Раствор подкисляют небольшим избытком 2 н. соляной кислоты и добавляют воду до определенного объема.

Для получения зоны молибдена на бумагу ватман 1 наносят 0,15—0,2 мл анализируемого раствора. Кроме того, для проявления по обеим сторонам бумаги наносят небольшие количества того же раствора в виде капель. Хроматографирование ведут *n*-бутанолом, насыщенным смесью равных объемов 2 н. соляной и 2 н. азотной кислот. Затем бумагу высушивают, по краям отрезают полоски и на них осуществляют проявление с помощью  $\text{SnCl}_2$  и  $\text{KCNS}$  (см. ниже). Полоску бумаги, на которой не проводили проявление молибдена, нейтрализуют умеренным опрыскиванием водным раствором аммиака. После нейтрализации полоску бумаги высушивают и помещают в небольшой аппарат Сокслета. Экстрагируют 20 мл дистиллированной воды в течение 30 мин. Экстракт упаривают до объема 2 мл. Твердый остаток удаляют центрифугированием, а фильтрат разбавляют до объема 4 мл. К полученному раствору прибавляют 1 мл реактива, используемого при анализе (для получения этого реактива 2 г  $\text{SnCl}_2$  нагревают с 3 мл концентрированной соляной кислоты до тех пор, пока раствор не станет прозрачным; затем в 15 мл воды растворяют 3 г  $\text{KCNS}$ ; оба раствора смешивают непосредственно перед использованием; смешанный раствор отфильтровывают). Колориметрирование проводят в кюветах на 0,5 мл с использованием сине-зеленого фильтра. Для получения калибровочной кривой лучше всего использовать высушенную чистую трехокись молибдена.

### II 140. Определение урана (Льюис и Гриффите)

*Приготовление образца.* Образец руды или горной породы разлагают азотной кислотой, к которой добавлена фтористоводородная кислота, или плавят с едким кали или с  $\text{Na}_2\text{O}_2$ . Затем образец растворяют в азотной кислоте. Раствор должен содержать около 25% азотной кислоты (уд. вес 1,42).

*Приготовление образца кремнистых руд.* В платиновую чашку помещают 2,5 г образца и прибавляют к ним 2 мл концентрированной азотной кислоты и 5 мл фтористоводородной кислоты. Раствор упаривают досуха. Остаток растворяют в наименьшем по возможности количестве воды. Полученный раствор упаривают досуха,

а к остатку прибавляют 10 мл концентрированной азотной кислоты. Затем раствор снова упаривают досуха, а полученный на этот раз остаток растворяют в 8 мл воды, к которым добавлены 2 мл концентрированной азотной кислоты.

*Приготовление образца монацитового песка.* 2,5 г образца смешивают с пятикратным количеством едкого кали и смесь плавят в никелевом тигле в течение 1,5 час. После охлаждения расплав растворяют в воде. Раствор подкисляют избыточным количеством азотной кислоты, нагревают до кипения и при постоянном перемешивании прибавляют к нему по каплям 2%-ный раствор фтористоводородной кислоты до тех пор, пока раствор не посветлеет за счет исчезновения избытка геля кремневой кислоты. Раствор упаривают досуха с помощью лампы инфракрасного излучения. К остатку прибавляют 20 мл воды, содержащей 2 мл концентрированной азотной кислоты и 5 г  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ . Этим путем удаляют  $\text{PO}_4^{3-}$ . После полного растворения остатка к раствору прибавляют 2 мл 20%-ной перекиси водорода. Затем раствор кипятят в течение 3 мин (восстановление четырехвалентного иона церия). Цирконий переводится в комплекс с помощью винной кислоты.

Образец хроматографируют в системе, состоящей из тетрагидросиливана и 5% азотной кислоты. Если концентрация фосфатов выше 0,7 М, а концентрация сульфатов выше 0,8 М, то их присутствие будет мешать проведению анализа. После высушивания хроматограммы ту часть бумаги, которая содержит уран (участок длиной около 6 см, расположенный выше линии фронта, при длине хроматограммы 20 см), отрезают и сжигают. К золе добавляют несколько капель хлорной кислоты. Полученный раствор упаривают досуха. Последнюю операцию проводят дважды. Остаток растворяют в 2 мл 0,1 н. соляной кислоты, насыщенной метилцеллюлозой (растворимой в щелочах). Уран определяют полярографическим методом при напряжении в пределах от 0,0 до 0,4 в.

#### П 141. Определение алюминия, титана и железа (Лакур и сотрудники)

Приготавливают 8 хроматограмм ( $1 \times 25$  см). На четырех хроматограммах нанесена анализируемая смесь, на двух — чистый растворитель и на двух — стандартный раствор, содержащий по 10 мкг отдельных катионов в 0,01 мл. Если образец наносят в виде раствора в 10%-ной лимонной кислоте или в виде раствора в уксусной кислоте (12 г уксусной кислоты и 16 г ацетата натрия в 100 мл воды), то происходит разделение всех трех катионов. При растворении образца в соляной кислоте, разбавленной водой (1 : 1), или в разбавленной водой азотной кислоте (1 : 10), Ti с Fe будут находиться в одной зоне. Однако в данном случае это не препятствует определению. Для хроматографирования используют систему, состоящую из амилового спирта, бензола и концентрированной соляной кислоты (60 : 10 : 30). Хроматографическую камеру перед проведением хроматографирования насыщали в течение 12 час этой системой. Для проявления использовали 8-оксихинолин.

Хроматограмму разрезают, пользуясь в качестве ориентира проявленными контрольными полосами. Al элюируют разбавленной серной кислотой (0,25 мл кислоты на 100 мл воды), а Ti и Fe — разбавленной соляной кислотой (1 : 20). Al проявляют с помощью алюминона. К элюату, содержащему Al, прибавляют 1 мл свеже-

приготовленного 0,2%-ного водного раствора алюминона и 5 мл буферного раствора с рН 4,7. Буферный раствор готовят смешиванием 200 мл ледяной дистиллированной воды, 21,8 мл аммиака (уд. вес. 0,88) и 36 мл ледяной уксусной кислоты. Интенсивность окрашивания измеряют через 15 мин после прибавления обоих растворов при длине волны 520 мμ. В качестве стандартного раствора используют раствор, приготовленный путем экстракции чистой бумаги.

Fe и Ti определяют реакцией с тироном. К элюату, содержащему Fe и Ti, прибавляют 1 мл свежеприготовленного 4%-ного водного раствора тирона и 10 мл буферного раствора, приготовленного растворением 34 г ацетата натрия и 14 мл уксусной кислоты в таком количестве дистиллированной воды, которое необходимо для получения 250 мл раствора. Экстинкцию измеряют при длине волны 560 мμ. Перед определением титана, которое проводят в том же растворе при длине волны 410 мμ, осуществляют восстановление железа с помощью гидросульфита натрия. Содержание металлов во всех трех случаях определяют расчетным путем на основании калибровочных кривых, полученных в тех же условиях для стандартных растворов.

#### П 142. Определение К, Na, Ca и Mg в продуктах растительного происхождения (Вендер)

Для анализа берут около 2 г образца (например, мелассы). Точно взвешенную навеску образца сжигают с концентрированной серной кислотой и прокаливают в электрической печи при температуре 600°. Зола растворяют в 5 мл дистиллированной воды. Сульфаты, содержащиеся в растворе, переводят в хлориды, пропуская раствор через колонку, наполненную сильноосновным анионообменником (вофатит Л) в Cl<sup>-</sup>-форме. Колонку промывают водой, а полученный элюат упаривают почти досуха. Остаток разбавляют в калиброванной пробирке до объема 5 мл.

В центральной части листа бумаги размером 23×55 см наносят 0,05 мл раствора образца до образования одной сплошной линии, а по краям листа для последующего проявления раствор наносят в виде точек. Хроматографирование ведут нисходящим методом в системе метанол — этанол (1 : 1) в течение 7—9 час. После высушивания хроматограмм при комнатной температуре проводят проявление хлоридов на отрезанных контрольных полосах. Для проявления используют опрыскивание 1%-ным раствором азотнокислого серебра и освещение солнечным светом. Те места хроматограммы, где проявления не проводили, отрезают и хлориды вымывают. Квадрат бумаги измельчают на стеклянном фильтре 15 а G 2 (Иена) вместе с 1 мл 0,1 н. серной кислоты. Раствор отсасывают и к остатку вновь прибавляют раствор серной кислоты до тех пор, пока объем фильтрата не станет равным 9 мл. Затем к раствору добавляют 0,1 мл 0,5%-ного раствора желатины и разбавляют его до объема 10 мл. После этого проводят полярографическое определение хлоридов К, Na, Ca и Mg при анодно-катодном включении. Рассчитывают на основе высот волн полярографической кривой, полученной для стандартных растворов хлоридов К, Na, Ca и Mg. В полученные значения нужно внести поправки на примеси, содержащиеся в бумаге.

#### П 143. Определение Fe, Cu, Ni, Mn и Co в сплавах и пиритах (Льюис и Гриффите)

Образец сплава или пирита растворяют в царской водке, а затем упаривают досуха с концентрированной соляной кислотой. Остаток растворяют в соляной кислоте, разбавляют, фильтруют и разбавляют до известного объема. Для хроматографирования используют систему ацетон — концентрированная соляная кислота — метил-*n*-пропилкетон (50 : 8 : 42). Камеру насыщают насыщенным водным раствором  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Проявление проводят после обработки сухой хроматограммы парами аммиака, смесью 0,25%-ного раствора рубеоноводородной кислоты в этаноле и 1%-ного раствора бензидина в 10%-ном водном растворе уксусной кислоты (1 : 1). Смешение обоих растворов проводят непосредственно перед использованием. Пятна, содержащие отдельные катионы, отрезают после проявления и сжигают. Пятна, содержащие Ni и Mn, сжигают с соляной кислотой, Cu и Fe — с азотной кислотой, Co — с царской водкой, а затем с соляной кислотой. Полученные растворы упаривают досуха. Остатки растворяют в 2 мл электролита. Затем эти растворы анализируют полярографическим методом. Электролит для Ni: 1 н. раствор KCl, насыщенный метилцеллюлозой, растворимой в щелочах. Электролит для Mn: 0,1 н. раствор KCl с 0,01% желатины. Электролит для Co: 0,1 н. раствор KCl с 0,02% агар-агара. Электролит для Cu: 10%-ный раствор виннокислого Na—K. Электролит для Fe: 1 М раствор оксалата К.

#### П 144. Определение смеси катионов (Льюис и Гриффите)

Основные растворы готовят путем растворения хлоридов Cu,  $\text{UO}_2$ , Pb, Fe, Bi, Sb, Cd,  $\text{Ti}(\text{OH})_4$ ,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  в 20%-ном водном растворе соляной кислоты. Растворы готовят таким образом, чтобы в 0,25 мл раствора содержалось около 100 мкг отдельных катионов. Хроматографирование ведут нисходящим способом в системе, состоящей из *n*-бутанола и 5% концентрированной соляной кислоты. Хроматограмму сушат лампой инфракрасного света, затем опрыскивают насыщенным раствором бутанола в воде и вновь сушат. После обработки хроматограммы парами аммиака появляется синяя зона Mo (если Mo содержится в количестве 100 мкг). Затем хроматограмму разрезают на две части (разрез выше пятна Mo). На нижней части хроматограммы вместе с Mo остаются Fe, Bi, Sb, Cd; на верхней части — V, Cu,  $\text{UO}_2$ , Pb, Ti. Обе части хроматограммы сначала кипятят в течение 1 мин с водой, затем с насыщенным водным раствором салициловой кислоты и, наконец, с 2 н. серной кислотой. Полученные при экстракции растворы выливают в специальные сосуды. Для удаления ионов хлора из раствора к водному экстракту и экстракту в салициловой кислоте прибавляют 1 каплю суспензии  $\text{Hg}_2\text{SO}_4$  в разбавленной серной кислоте. После фильтрования все три экстракта смешивают и добавляют воду до определенного объема. Анализ катионов осуществляют полярографическим методом. Отдельные катионы восстанавливаются при следующих потенциалах полуволны: V — 0,025 в; Cu — 0,374 в;  $\text{UO}_2$  — 0,575 в; Pb — 0,725 в; Ti — 1,025 в; Fe — 0,025 в; Mo (в виде молибденового синего) — 0,20 в; Bi — 0,40 в; Sb — 0,60 в; Cd — 1,125 в. Содержание катионов определяют по калибровочным кривым, полученным для стандартных растворов в тех же условиях.

## Авторский указатель

- Абдель-Акер (Abdel-Akher M.) 280, 281, 292, 294  
 Абдерхальден (Abderhalden E.) 479  
 Абэ (Abe M.) 546  
 Абэ (Abe Y.) 325  
 Авапара (Awapara J.) 404, 405, 437, 773  
 Аве (Awe W.) 415, 598, 639  
 Авиви (Avivi P.) 203  
 Агрен (Agren G.) 404  
 Адамс (Adams M. W.) 172, 412  
 Аданк (Adank K.) 542  
 Адати (Adachi S.) 387  
 Адембри (Adembri G.) 534  
 Адшид (Adshead G. H.) 532  
 Азимов (Asimov J.) 509, 519  
 Азо (Aso K.) 268  
 Айерс (Ayers C. W.) 395  
 Айран (Airan J.) 141, 242, 269  
 Айрес (Ayres P. J.) 363  
 Айрленд (Ireland D. M.) 562, 565  
 Акабори (Akabori S.) 486, 488  
 Аккер (Acker L.) 387, 389  
 Акленд (Acland J. D.) 95, 151  
 Акри (Acree F.) 84  
 Аксельрод (Axelrod B.) 287—289  
 Аксельрод (Axelrod L. R.) 356—361  
 Аксельрод (Axelrod R. J.) 363  
 Албанезе (Albanese A. A.) 416  
 Алгери (Algeri E. J.) 523  
 Аллен (Allen F. W.) 508  
 Аллуф (Allouf R.) 349, 513, 564, 565  
 Алмашши (Almassy G.) 696  
 Альберс (Albers P.) 108  
 Альберт (Albert A.) 618, 619, 621  
 Альбертацци (Albertazzi G.) 612  
 Альбрехт (Albrecht E.) 24  
 Альтген (Allgen L. G.) 522, 523  
 Альтман (Altmann S. M.) 248  
 Альфтан (Alfthan M.) 248, 250, 251, 763  
 Амброс (Ambros D.) 306  
 Амелунг (Amelung D.) 240, 241  
 Аминоф (Aminoff D. W.) 291  
 Андерс (Anders G.) 419, 463  
 Андерсон (Anderson A. B.) 225  
 Андерсон (Anderson G.) 225  
 Андерсон (Anderson J. R. A.) 693  
 Андо (Ando T.) 712  
 Ансон (Anson M.) 485  
 Анфинсен (Anfinssen C.) 463  
 Анфт (Anft B.) 21  
 Араи (Arai K.) 587  
 Арден (Arden T. V.) 695, 700, 704  
 Армин фон (von Armin K.) 408, 413  
 Армстронг (Armstrong M. D.) 308  
 Аронов (Aronoff S.) 151, 197  
 Аррояве (Arroyave G.) 359  
 Асмис (Asmis H.) 541  
 Аствуд (Astwood E. B.) 108, 212  
 Аструп (Astrup T.) 94, 95  
 Аугустинсон (Augustinsson K. B.) 385  
 Аутергофф (Auterhoff H.) 548—550  
 Афанасьев П. В. 425  
 Ахмад (Ahmad K.) 650  
 Ашэ (Acher R.) 93, 94, 412, 415, 434, 449—451, 460, 463, 464, 474  
 Баар (Baar S.) 259, 277  
 Байер (Bayer S.) 539  
 Байредер (Beyreder J.) 353, 354  
 Балакришнан (Balakrishnan S.) 607, 610  
 Балдантони (Baldantoni A.) 609, 610  
 Баленович (Balenovič K.) 411  
 Балига (Baliga) 93  
 Баллоу (Ballou C. E.) 225  
 Бангэм (Bangham D. R.) 199, 586  
 Бандурский (Bandurski R. S.) 287—289  
 Банерджи (Banerjee B.) 147, 421, 422  
 Баниган (Banigan T. F.) 379  
 Баптист (Baptist V. N.) 490  
 Бардинская М. С. 257, 260, 261  
 Баре (Baret R.) 388  
 Баркер (Barker G. R.) 258  
 Баркер (Barker H. A.) 235, 243  
 Барклай (Barclay J. L.) 292  
 Барнабас (Barnabas J.) 242, 692  
 Барнабас (Barnabas T.) 692, 696—698  
 Барролье (Barrollier J.) 129, 173  
 Баррон (Barron E. S. G.) 436  
 Барроуз (Barrows S.) 286, 519, 520  
 Бартлей (Bartley) 607, 609  
 Бартлетт (Bartlett J. K.) 286  
 Бартон (Barton D. H. R.) 81, 335, 336  
 Бартон (Barton G. M.) 303, 305  
 Баскин (Baskin R.) 199  
 Бассетт (Bassett E. G.) 605  
 Басфорд (Basford R. E.) 616  
 Батлер (Butler G. V.) 189  
 Батора (Batora V.) 653, 657, 658  
 Бауэр (Bauer H. F.) 267, 284  
 Бауэр (Bauer L.) 416, 422, 427, 510, 511, 521, 522, 584, 603

- Бевеню (Bevenue A.) 261, 330, 764  
 Бейберс (Bahers) 84  
 Бейкер (Baker B. R.) 647  
 Бейкер (Baker P. B.) 643  
 Бейкер (Baker R. G.) 109  
 Бейкер (Baker W.) 384  
 Бейли (Bayly R. J.) 151, 259, 273  
 Бейнс (Banes D.) 543  
 Бейт-Смит (Bate-Smith E. C.) 76, 77, 148, 302, 304, 311, 312, 317, 324, 325, 566  
 Бек (Beck M. T.) 151, 402, 403, 429, 434, 438  
 Беленькая И. М. 39  
 Белл (Bell E. A.) 415  
 Бем (Böhm P.) 240, 241  
 Бенедикт (Benedict R. G.) 644  
 Беннет-Кларк (Bennet-Clark T. A.) 574  
 Беннетт (Bennett E. L.) 521  
 Бенсон (Benson A.) 580  
 Бенсон (Benson A. A.) 195, 197, 201, 244, 271  
 Бентлей (Bentley H. R.) 421—423  
 Берап (Beran M.) 609  
 Берг (Berg A.) 108, 213, 405, 425  
 Берг (Berg A. M.) 546  
 Берг (Berg C. P.) 85, 392  
 Берг (Berg E. W.) 690  
 Бергамини (Bergamini C.) 606, 614, 616, 617, 654, 703  
 Бергквист (Bergkvist R.) 519  
 Бергман (Bergmann M.) 471  
 Бергнер (Bergner K. G.) 223, 224, 330  
 Бергстрём (Bergström S.) 426  
 Беренблум (Berenblum I.) 290, 519  
 Беридж (Berridge N. J.) 232, 233  
 Берсталл (Burstall F. H.) 676, 691—696, 698, 699, 704, 709  
 Берлингоцци (Berlingozzi S.) 128, 426  
 Бернаскони (Bernasconi R.) 368  
 Бернхауер (Bernhauer K.) 626, 627  
 Берри (Berry J. S.) 389  
 Бертетти (Bertetti J.) 389  
 Берти (Berti T.) 645  
 Берто (Bertho A.) 551  
 Бертон (Burton H. S.) 249  
 Бертон (Burton R. B.) 155, 341—343, 346, 347, 349, 358, 363  
 Бертэ (Berthet J.) 200  
 Бёрд (Bird H. L., Jr.) 646  
 Бизерт (Biserte G.) 404, 405, 443, 476, 477  
 Биккель (Bickel H.) 446  
 Бина (Bina K.) 243  
 Бинк (Bink B.) 310  
 Бланд (Bland D. E.) 330—332, 768  
 Бланшар (Blanchard P. H.) 261  
 Бласс (Blass J.) 277  
 Блаттна (Blattna J.) 603  
 Блейк (Blake G. G.) 186  
 Блисс (Bliss C. A.) 368  
 Блок (Block R. J.) 5, 184, 416, 435, 466  
 Блум (Bloom B. M.) 335  
 Блумберг (Blumberg P.) 479  
 Блэк (Black S.) 411  
 Блэкбурн (Blackburn S.) 204, 477  
 Блэкуэлл (Blackwell R. Q.) 185  
 Богс (Boggs L. A.) 269, 284  
 Богуцкая (Bogucka J.) 627, 628  
 Боданская (Bodanszky A.) 341  
 Боде (Bode F.) 438  
 Бодо (Bodo G.) 492, 493  
 Бодэ (Baudet J.) 560, 561  
 Бозекен (Boeseken J.) 88  
 Бойд (Boyd G. E.) 56  
 Бойлен (Boylen J. B.) 179  
 Болдинг (Boldingh J.) 236  
 Боман (Boman H. G.) 498  
 Бондживанни (Bongiovanni A. M.) 338, 344—346, 362  
 Бонетти (Bonetti E.) 416  
 Боргвардт (Borgwardt G.) 534  
 Борель (Borel E.) 179, 277  
 Боренштайн (Borensztajn D.) 628  
 Боретти (Boretti G.) 302, 303  
 Борецкий (Borecký J.) 385  
 Борковский (Borkowski T.) 287  
 Боровский (Borowski E.) 646  
 Босер (Boser H.) 247, 437, 509  
 Боскотт (Boscott R. J.) 146, 213, 342, 345, 351, 357, 543, 544  
 Боудеп (Bowden C. H.) 169, 184, 451, 452  
 Боурснелл (Boursnell J. V.) 199  
 Бояркин А. Н. 269  
 Бражникова М. Т. 638, 649  
 Брайант (Bryant F.) 241, 247  
 Брандт (Brandt E.) 466  
 Брант (Brante G.) 170, 607  
 Браун (Braun P.) 443, 444, 446  
 Браун (Brown B. T.) 373  
 Браун (Brown D. J.) 618  
 Браун (Brown F.) 232—234, 243, 284, 604  
 Браун (Brown G. M.) 616  
 Браун (Brown J. A.) 603, 607, 608, 610, 613, 615, 625, 626  
 Браун (Brown R.) 176, 183  
 Браунитцер (Braunitzer G.) 475, 476, 478, 488  
 Брауэрман (Brawerman E.) 515, 516  
 Брдлик (Brdlik V.) 26  
 Бредфилд (Bradfield A. E.) 163, 267, 326  
 Брей (Bray H. G.) 302, 392, 393, 595, 729  
 Брейнигер (Bräuniger H.) 89, 534  
 Бремнер (Bremner J. M.) 384, 386  
 Бреннер (Brenner M.) 136, 432  
 Бреслер С. Э. 56, 519  
 Брид (Breed N. D.) 640  
 Бриджес (Bridges R. G.) 654, 655  
 Бриндл (Brindle H.) 533, 546  
 Брода (Broda E.) 89, 196  
 Бройер (Breuer H.) 359  
 Брокман (Brockmann H.) 209, 647—650  
 Бросси (Brossi A.) 540  
 Броуде (Broude L. M.) 505  
 Брукер (Brooker R. M.) 549, 550  
 Брукс (Brooks C. J. W.) 84  
 Брумберг Э. М. 162, 510  
 Бруш (Brush M. K.) 414, 431, 434  
 Брэди (Brady R. O.) 359  
 Брэдли (Bradley W.) 663  
 Брэдлоу (Bradlow H. L.) 379  
 Брэдфорд (Bradford L. W.) 663

- Брэккет (Brackett J. W.) 663  
 Буассона (Boissonas R. A.) 93, 165, 405, 422, 431, 437, 486, 490, 647  
 Будвиг (Budwig J.) 189, 204  
 Бук (Buck R. R.) 341  
 Буланже (Boulanger P.) 95, 404, 405, 426, 440, 443, 508, 509, 512—514  
 Булирш (Bulirsch R.) 76, 78—80, 566  
 Булл (Bull H. B.) 185, 436, 490  
 Булл (Bull J. P.) 259  
 Буркерт (Burkert H.) 260  
 Бурма (Burma D. P.) 73, 142, 146—148, 418, 421, 422, 696, 698  
 Бурн (Bourne E. J.) 273  
 Буссмар (Boussemart E.) 529  
 Буссье (Bouissiere G.) 196  
 Бух (Buch M. L.) 242, 243, 245  
 Бухан (Buchan J. L.) 269  
 Бух (Buch J. E.) 335, 336, 338, 339, 341, 342, 344—346, 349, 351, 357, 358, 360, 362, 364, 366  
 Бьюкенен (Buchanan J. G.) 267, 510, 514, 515  
 Бэдли (Baddiley) 617  
 Бэкон (Bacon J. S. D.) 261  
 Бэссил (Bassil G. T.) 342  
 Бяла (Biala J.) 645, 646
- Ваврух (Vavruch I.) 268, 405  
 Вагнер (Wagner G.) 84, 392, 393, 394, 533, 534, 540, 595, 598  
 Вагнер (Wagner H.) 238, 305, 310  
 Вагнер (Wagner J. G.) 379  
 Ваек (Vaecck S. V.) 703, 713  
 Вайат (Wyatt G. R.) 514  
 Вайнгард (Winegard H. M.) 415  
 Вайнинг (Vining L. C.) 647  
 Вайтхед (Whitehead J. K.) 421  
 Валашек (Walaszek E. J.) 535  
 Валента (Valenta M.) 574, 633  
 Вальенфельс (Wallenfels K.) 186, 266, 277, 500, 501  
 Вальдрон (Waldron D. M.) 270, 282, 283  
 Вальдрон (Waldron N. M.) 472  
 Вальдрон-Эдвард (Waldron-Edward D. M.) 383  
 Вальдшмидт-Лейтц (Waldschmidt-Leitz E.) 463, 479, 487  
 Ван Дален (van Dalen E.) 683  
 Ван дер Вант (van der Want G. H.) 209  
 Ванечек (Vaněček S.) 133, 529, 546  
 Ванкмюллер (Wankmuller A.) 585, 595  
 Ваннер (Wanner H.) 274  
 Ван Ос (van Os) 538  
 Ван Хальтерен (van Halteren B.) 432  
 Ван Эркелен (van Erkelen P. C.) 204  
 Вас (Vas K.) 230, 244  
 Вахтмейстер (Wachtmeister C. A.) 88, 258, 302, 305, 310—312, 331  
 Вацек (Vacek J.) 152  
 Вастаг (Vastagh G.) 372, 545, 546  
 Вебер (Weber R.) 165  
 Вевалка (Wewealka F.) 499  
 Вегнер (Wegner E.) 536, 587  
 Вей (Way J. T.) 24
- Вейганд (Weygand F.) 266  
 Вейд (Wade H. E.) 287  
 Вейделек (Vejdelek Z. J.) 527, 534, 547, 549  
 Вейль (Weil H.) 21, 25, 32, 129, 197, 204  
 Вейсман (Weissmann B.) 513  
 Вейсс (Weiss A.) 675  
 Вейсс (Weiss F.) 370  
 Вейсс (Weiss H.) 202  
 Вейхерт (Weichert R.) 85, 393, 426  
 Велик (Welick S. F.) 203, 471  
 Веллингтон (Wellington E.) 438  
 Вендер (Vender M.) 704  
 Веннинг (Venning E. H.) 363  
 Вентурелло (Venturello G.) 690, 695, 713  
 Верле (Werle E.) 536  
 Вернер (Werner A. E.) 155, 379, 380  
 Версорезе (Versorese W.) 654  
 Верцеллоне (Vercellone A.) 575, 577  
 Вессели (Wessely F.) 471  
 Вестермарк (Westermarck T.) 110  
 Вестфаль (Westphall O.) 283  
 Ветштейн (Wettstein A.) 339, 340, 341, 346, 349  
 Вечера (Večeřa M.) 222, 383, 385, 594, 599, 761  
 Вибаут (Wibaut J. P.) 539  
 Виганд (Wiegand O. F.) 99, 100  
 Вигнацо-Вамос (Vigyazo-Vamos L.) 269  
 Видиц (Vidic E.) 540  
 Викберг (Wickberg B.) 283  
 Викстрём (Wickström A.) 394, 523, 524  
 Виланд (Wieland O. P.) 619, 622  
 Виланд (Wieland Th.) 108, 189, 204, 213, 247, 248, 251, 405, 412, 413, 416, 422, 425, 427, 460, 466, 510, 511, 521, 522, 541, 542, 616  
 Вильдеман (Wildeman L.) 606  
 Вильсон (Wilson J. N.) 45, 47  
 Вильштеттер (Willstätter R.) 26  
 Винендаль (Veenendaal H. J.) 414, 428  
 Винзауер (Winsauer K.) 233  
 Винник (Winnick T.) 778  
 Винь (Vigne J. P.) 585, 657  
 Вирт (Wirth L.) 189, 466  
 Виртанен (Virtanen A. I.) 126, 248, 251, 420—422, 440, 441, 763  
 Виснер (Wiesner K.) 27  
 Витек (Vitek V.) 171, 302  
 Витоло (Vitolo E.) 595  
 Витуцци (Vitucci) 617  
 Вишер (Vischer E.) 511, 517  
 Властиборова (Vlastiborová A.) 377, 378  
 Вогноут (Vohnout S.) 201  
 Войвод (Woiwod A. J.) 131, 414, 430, 437  
 Воллеман (Wollemann P.) 394  
 Волленбергер (Wollenberger A.) 479, рис. 190  
 Вольдан (Voldan M.) 505  
 Вольмар (Volmar Y.) 710, 711  
 Вольф (Wolf H.) 394  
 Вольф (Wolf H. P.) 269  
 Вольф (Wolff K.) 164  
 Вольфсон (Wolffson W. Q.) 137  
 Вржешталь (Vřeštál J.) 25  
 Вуд (Wood D. J.) 317, 324  
 Вуд (Wood J. L.) 464, 576

- Вуд (Wood S. E.) 63  
 Вуд (Wood T.) 94, 95, 509  
 Вудворд (Woodward C. C.) 167, 266, 417  
 Вудруф (Woodruff H.) 624  
 Вудхед (Woodhead H. B.) 533  
 Вулф (Woolf L. I.) 259  
 Вулфром (Wolfrom M. L.) 267  
 Вульф (Wulf W.) 542  
 Вундерли (Wunderly Ch.) 125, 437  
 Вутон (Wooton V.) 352
- Габерман (Habermann E.) 368, 370  
 Гак (Hack W.) 243  
 Гакман (Hackman R. H.) 279, 402  
 Гал (Geal E. M.) 414, 428, 434  
 Галиновский (Galinovsky F.) 550  
 Гамерман (Hamerman D.) 293  
 Гангули (Ganguli N. C.) 132, 137, 142, 450  
 Гапон Е. Н. 21, 39  
 Гапон Т. Б. 21  
 Гарвалик (Harvalik Z. V.) 161  
 Гарделл (Gardell S.) 291  
 Гарден (Garden L.) 84  
 Гарднер (Gardner K. J.) 276  
 Гаркина И. Н. 350, 363, 364, 366  
 Гарман (Harman R. E.) 362  
 Гартман (Hartman J.) 125  
 Гаспарич (Gasparič J.) 184, рис. 124, рис. 125, 3, 82, 382, 385, 391, 590, 599  
 Гассманн (Gassmann B.) 608  
 Гаттнер (Gattner H.) 185  
 Гаудиано (Gaudiano A.) 607, 609, 610, 612  
 Гаузер (Hausner E. P.) 328  
 Гаусс (Gauss K.) 487  
 Гацаперкова (Hacaperková J.) 105  
 Гедтке (Gaedtker K.) 574  
 Ге (Ghe A. M.) 690, 695, 713  
 Гейдж (Gage J. C.) 174  
 Гейдж (Gage T. G.) 317, 318, 320, 322, 324  
 Гейлинг (Geiling E.) 547  
 Гейлорд (Gaillard B. D. E.) 260  
 Гейндрикс (Heyndrickx A.) 606  
 Гейндрикс (Heyndrickx P.) 694  
 Гейсгем (Heusghem C. J.) 344, 351, 356, 358  
 Гейсман (Geissman T. A.) 303, 317, 318, 320, 322  
 Геккер (Hecker E.) 66, 67  
 Гемптон (Hampton E.) 260  
 Генри (Henry R.) 360  
 Герлах (Gerlach E.) 519, 520  
 Германин (Hermann J.) 100  
 Герхардс (Gerhards E.) 11, 336, 346, 347  
 Гейтман (Heftmann E.) 343, 356, 366, 372  
 Гийом (Guillame J.) 233  
 Гиллер (Hiller E.) 436  
 Гиллеспи (Gillespie J. M.) 500, 501  
 Гиллиган (Gilligan D. R.) 447  
 Гилтроу (Giltroou J.) 414  
 Гилфорд (Gilford S. R.) 185  
 Гильдебранд (Hildebrand J. H.) 68  
 Гирдз (Geerdes J. D.) 213, 262, 760  
 Гиря (Giri K. V.) 129, 130, 132, 179, 211, рис. 130, 262—264, 269, 272, 277, 387, 411, 413, 433, 438, 500, 501, 607, 610, 741  
 Гирст (Hirst E. L.) 276, 278, 284, 286, 296
- Гисволд (Gisvold O.) 368  
 Гискок (Hiscox E. R.) 232, 233  
 Глазко (Glazko A. J.) 399  
 Глегр (Glegg R. E.) 261  
 Глюкауф (Glückauf E.) 54, 57  
 Гмелин (Gmelin R.) 600  
 Гобан (Hoban N.) 261, 764  
 Годин (Godin P.) 278  
 Голасек (Holasek A.) 232  
 Голейшовский (Holeyšovský V.) 136, 213, 432  
 Голлер (Göeller J. P.) 510, 511  
 Голумбик (Golumbic C.) 81, 86  
 Гольдбаум (Goldbaum L. R.) 530, 552  
 Гольдбах (Goldbach H. G.) 523  
 Гольдберг (Goldberg H. J. V.) 447  
 Гольдшмидт (Goldschmidt S.) 260  
 Гоппельсрөдер (Goppelsröder F.) 21—24, 70, 108, 163, 166, 660, 662, 666  
 Гор (Gore D. N.) 243, 532  
 Гор (Gohr H.) 582  
 Горак (Horák F.) 212  
 Горак (Horak V.) 598, 599  
 Горбах (Gorbach G.) 403  
 Гордон (Gordon A. H.) 23, 27, 92, 122, 134, 403, 667  
 Гордон (Gordon H. T.) 672, 696, 697  
 Горина (Horyna) 594  
 Госс (Goss B. K.) 283  
 Госсфельд (Hossfeld R. L.) 302  
 Гото (Goto H.) 667  
 Готъес (Gootjes J.) 379  
 Гоуард (Howard F. D.) 134  
 Гоулден (Goulden J. D. S.) 186  
 Гофман (Hofman H.) 266  
 Гофман (Hofmann H. A.) 350, 362  
 Гофман (Hofmann K.) 463  
 Гохштейн (Hochstein F. A.) 531, 543, 544  
 Гран (Grahm M.) 385  
 Гранди (Grundy W. E.) 644  
 Грант (Grant E. W.) 550  
 Грассман (Grassmann W.) 408, 413, 436, 491  
 Грегг (Gregg D. H.) 368  
 Грегори (Gregory F. J.) 647  
 Грейнджер (Grainger A.) 637, 639, 640, 642  
 Грейхен (Graichen C.) 663  
 Грёне (Gröne H.) 648, 650  
 Григ (Grieg A.) 523  
 Гриммер (Grimmer G.) 373  
 Грин (Green J.) 604  
 Грин (Green J. P.) 605  
 Гринберг (Greenberg G. M.) 414, 428  
 Гринберг (Greenberg G. R.) 618, 619, 621, 622  
 Грис (Gries G.) 582  
 Гриффитс (Griffiths J. M.) 695, 705  
 Гриффон (Griffon H.) 551  
 Гроббелаар (Grobhelaar N.) 440  
 Гросс (Gross A. M.) 420, 425  
 Гросс (Gross D.) 160, 167, 262, 274  
 Гросс (Gross J.) 448, 450, 452  
 Гротте (Grote) 722  
 Грубгофер (Grubhofer N.) 184  
 Грунау (Grunau G.) 435  
 Грюнвальд (Grünwald H. M.) 166  
 Грюне (Grüne A.) 21, 102, 103

- Грюсс (Grüss J.) 24, 129  
 Грюттнер (Grüttner R.) 185  
 Гуарино (Guarino S.) 170  
 Гуд (Good P. N.) 618, 619  
 Гудечек (Hudeček S.) 138, 302, 304, 306  
 Гудолл (Goodall R. R.) 174, 639, 642  
 Гуелин (Huelin F. E.) 229  
 Густавсон (Gustafson C.) 275  
 Густавсон (Gustafson O.) 184  
 Гюбнер (Gübner G.) 524  
 Гюнзел (Günzel Chr.) 370  
 Гюнтер (Günther B.) 581  
 Гюнтер (Günther F.) 548, 549
- Д'Анс (D'Ans) 114  
 Давидек (Davidek J.) 633  
 Дайбинг (Dybing F.) 368, 552  
 Дайнинггер (Deiningger R.) 523, 524  
 Далглиш (Dalgliesh C. E.) 85, 93, 393, 415, 426  
 Далеруп (Dahlerup H.) 479  
 Дальстром (Dahlstrom R. V.) 174  
 Даниельссон (Danielsson C. E.) 212  
 Данн (Dunn M. S.) 127, 143, 185  
 Дарденне (Dardenne U.) 338  
 Дас (Das D. B.) 260  
 Датта (Datta S. P.) 134, 135, 160, 603  
 Даттлер (Dattler G.) 666  
 Даттон (Dutton G. G. S.) 275  
 Даусон (Dawson R. M. C.) 241  
 Дворжак (Dvořák J.) 32  
 Де-Вай (De Vay J. E.) 576  
 Де-Велли (De Whalley H. C. S.) 268, 275  
 Де-Вердые (de Verdier C. H.) 404  
 Де-Вольт (de Vault D.) 45, 47, 57  
 Дедонде (Dedonder R.) 269  
 Дей (Day D. T.) 24  
 Дейли (Daly M. M.) 507  
 Дейч (Deutsch A.) 519  
 Деккер (Decker P.) 136, 178, 179, 214, 402, 425  
 Де-Ли (De Ley J.) 281  
 Де-Лох (De Loach W. S.) 709  
 Деморе (Demorest H. L.) 199  
 Де-Мурлоозе (De Moerloose P.) 539  
 Денисон (Denison F. W., Jr.) 242, 243  
 Дент (Dent C. E.) 92, 93, 151, 403, 409, 416, 419, 422, 430, 432—435, 443, 445, 446  
 Дере (Dhéré Ch.) 25  
 Де-Ридер (Reeder P. L.) 597  
 Деррум (Durum E. L.) 185, 503  
 Десбауме (Deshaumes P.) 662  
 Десай (Desai R. M.) 269  
 Де-Сильва (De Silva M. D.) 606, 689  
 Дёринг (Döring H. J.) 519  
 Дёрфель (Dörfel H.) 277, 279, 281, 282, 438  
 Де-Фриз (De Vries C.) 187, 683  
 Дешуссе (Deshusses J.) 662  
 Джанич (Janjič T.) 700  
 Джевсберри (Jewsbury A.) 700  
 Джеймс (James A. T.) 27  
 Джеймс (James W. O.) 394  
 Джепсон (Jepson J. B.) 95, 415, 417, 449, 460, 568
- Джермин (Jermyn M. A.) 85, 255—258, 268, 270—272, 500—502  
 Джеффри (Jeffrey R. N.) 536  
 Джинз (Jeanes A.) 141, 255, 263, 266  
 Джокерс (Jockers K.) 666, 667  
 Джонс (Jones A.) 563  
 Джонс (Jones J. K. N.) 276, 277, 278, 284—286, 294, 296  
 Джонс (Jones J. W.) 197, 201, 202, 700  
 Джонс (Jones R. L.) 249  
 Джонс (Jones T. S. G.) 416, 546, 649  
 Джонсон (Johnson A. W.) 618, 619  
 Джонсон (Johnson B. C.) 563, 564  
 Джонсон (Johnson E. A.) 510, 521, 525  
 Джонсон (Johnson G.) 310  
 Джонсон (Johnson M.) 519  
 Джонсон (Johnson M. J.) 640  
 Джукс (Jukes T. H.) 623  
 Джурачка (Juracka F.) 594  
 Ди-Лева (Di Leva E.) 606  
 Дильман (Dihlmann W.) 585, 586  
 Димлер (Dimler R. J.) 277, 765  
 Диршерль (Dirscherl W.) 117, 336, 338, 346, 347  
 Диттерова (Ditterová V.) 535  
 Дитц (Dietz W.) 523  
 Добен (Dauben W. G.) 379  
 Догнал (Dohnal M.) 637, 641, 645, 646  
 Дозе (Dose K.) 413  
 Доман Н. Т. 100, 105, 195, 287  
 Дораф (Dorough G. D.) 515—517  
 Доун (Done J.) 440  
 Древои (Drevon B.) 630  
 Дрей (Drey R. E. A.) 538  
 Дрейк (Drake N. A.) 162, 176, 338  
 Дрелл (Drell W.) 401  
 Дринкард (Drinkard C.) 709  
 Дрискол (Driscoll C. A.) 615  
 Дункан (Duncan R. E. B.) 232  
 Дунал (Dupal J.) 185  
 Дуст-Блази (Doust-Blazy L.) 140  
 Дуйфф (Duff R. B.) 277  
 Дьёрдь (György P.) 175  
 Дэвис (Davies R. L.) 713  
 Дэвис (Davis R. B.) 364  
 Дэвис (Davis W. W.) 186  
 Дэм (Dam H.) 605  
 Дюрент (Durant J. A.) 303
- Евстигнеева Г. 411  
 Еленков Д. (Elenkov D.) 84  
 Елисеева Г. В. 73, 670—672, 695  
 Ерхель (Jerchel D.) 561—563, 572
- Жаминэ (Jaminet F.) 548, 550, 551  
 Желлот (Gelotte B.) 513  
 Женишек (Ženišek A.) 6, 95, рис. 96, 575  
 Женишек (Ženišek Z.) 185  
 Жуховицкий А. А. 26, 60, 70
- Заградник (Zahradník R.) 236  
 Заградничек (Zahradniček M.) 190  
 Закржевский (Zakrzewski S. F.) 620—622

- Залокар (Zalokar M.) 663, 665  
 Зангер (Sanger F.) 416, 460, 463, 465—467, 469, 470, 473, 474, 479, 492, 494  
 Зандберг (Sandberg A. A.) 362  
 Заппи (Zappi F.) 249, 250  
 Запрометов М. Н. 317  
 Заттлер (Sattler L.) 269, 283  
 Зауберлих (Sauberlich H. E.) 619  
 Заффарони (Zaffaroni A.) 340, 341, 342, 346, 347, 349, 360—363, 369, 371  
 Збудовска (Zbudovská O.) 356, 357  
 Звольский (Zvolský K.) 234, 236, 237, 762  
 Зейлер (Seiler H.) 672, 704  
 Зелигман (Seligman R. B.) 228, 229  
 Зибер (Sieber K.) 103  
 Зигель (Siegel A.) 136, 221, 223, 242, 302, 307, 761, 767  
 Зильберман (Silbermann H.) 186, 371, 521  
 Зоеринг (Soehring K.) 523  
 Зоммер (Sommer G.) 669, 670, 687  
 Зулзер (Sulser H.) 185  
 Зуман (Zuman P.) 180, 191
- Иасуда (Yasuda H.) 698  
 Иваинский (Iwainsky H.) 477, 479  
 Иергенсен (Jørgensen C.) 307  
 Инагаки (Inagaki C.) 632  
 Инграм (Ingram V. M.) 470, 481, 484, 485  
 Иноуэ (Inouye Y.) 236—238  
 Иноуэ (Inoue M.) 576, 762  
 Иоганнесен (Johannesen B.) 629, 630, 633  
 Иогансон (Johanson R.) 268  
 Иоси (Joshi G. V.) 242  
 Ирвинг (Irving M. H.) 668, 669  
 Ирреверр (Irreverre F.) 137  
 Исйда (Ishida N.) 638, 644  
 Исйда (Ishida Y.) 661, 662  
 Ислам (Islam M. F.) 650  
 Иствуд (Eastwood D.) 277  
 Ишервуд (Isherwood F. A.) 78, 85, 105, 126, 152, рис. 79, 230, 231, 235, 242, 245, 249, 256—258, 268, 270—272, 286, 288, 290, 510, 519, 667, 707  
 Иштван (István K.) 406
- Йенике (Jaenicke L.) 618, 619, 621  
 Йенсен (Jensen K. B.) 345, 366—369, 372, 373  
 Йеншовский (Jenšovský L.) 428  
 Йирачек (Jiráček V.) 177  
 Йиргенсонс (Jirgensons B.) 146, 423  
 Йиргл (Jirgl V.) 93, 442  
 Йирса (Jirsa M.) 583  
 Йокл (Jokl J.) 78, 83, 301  
 Йори (Jori H.) 585  
 Йосидзава (Yosizawa Z.) 271, 290
- Кабиб (Cabib E.) 500, 501  
 Кавалини (Cavallini D.) 245, 247—250, 763  
 Каверау (Kawerau E.) 128, 412, 460  
 Каван З. С. 105, 287  
 Казьяк (Kazyak L.) 530, 552  
 Кайзер (Kaiser F.) 366, 367, 369, 371
- Кайзер (Kaiser H.) 377, 585  
 Какач (Kakač B.) 6, 163, 519, 616, 617, 666, 677, 695  
 Какита (Kakita Y.) 667  
 Каламар (Kalamar J.) 243  
 Калвин (Calvin M.) 195, 296, 350  
 Калмыков К. Ф. 25  
 Кальбе (Kalbe H.) 230, 242, 246  
 Кальбе (Kalbe J.) 78  
 Калькварф (Kalkwarf D. R.) 186  
 Кальц (Kalz) рис. 198  
 Кальянкар (Kalyankar G. D.) 433  
 Камбер (Camber B.) 343, 358  
 Каменьский (Kamienski B.) 187  
 Камиенски (Kamienski E. S.) 384  
 Канауэй (Canawary R. J.) 126  
 Кандела (Candela M. J.) 696  
 Канисс (Kaniss N.) 651  
 Каннел (Cannel J. S.) 129  
 Канский (Kánský M.) 447  
 Кар (Kar A. B.) 543, 544  
 Карвало (Karvalo) 699  
 Каргин 101  
 Кардини (Cardini C. E.) 291  
 Кари (Kari S.) 441  
 Карионе (Kariyone T.) 223, 247, 522, 530, 534, 761  
 Карлесс (Carless J. E.) 533, 547  
 Карлесон (Carleson G.) 200, 680, 682, 686, 691—693, 695  
 Карль (Carles J.) 131  
 Карман (Carman O. C.) 63  
 Карновский (Karnovscky M. L.) 640, 643, рис. 234  
 Карпентер (Carpenter D. C.) 515  
 Карпентер (Carpenter F. H.) 486  
 Каррер (Karrer P.) 26, 541, 542, 612, 613  
 Картер (Karter C. E.) 510, 513, 515, 517, 519  
 Картер (Carter H.) 649  
 Кассиди (Kassidy H. G.) 65, 68, 101, 102, 105, 108, 141, 144, 145, 147, 148  
 Кастиль (Castille P.) 539  
 Кастильони (Castiglioni A.) 586  
 Катбертсон (Cuthbertson W. F. J.) 562, 564, 565, 623  
 Катона (Katona K.) 539  
 Каугилл (Cowgill R. W.) 576—578  
 Каукабани (Kowkabany G.) 105, 141, 144, 145, 147, 148, 254  
 Кауфман (Kaufmann H. P.) 168, 189, 204, 223, 224, 234, 236, 238  
 Кауч (Couch J. F.) 324  
 Кайфнер (Kuffner F.) 560—563, 565  
 Катц (Katz A.) 368  
 Катц (Kácl K.) 151, 419  
 Качиоппо (Cacioppo F.) 607  
 Квентин (Quentin K. E.) 709  
 Квинке (Quincke E.) 202  
 Квитка С. К. 24  
 Квостел (Quastel J. H.) 500, 501, 503  
 Кебрле (Kebrle J.) 541  
 Кейл (Keil B.) 98, 133, 184, 411, 422, 434, 436, 471, 475, 776  
 Кейн (Cain L.) 183, 389, 445, 578, 773  
 Келлер (Keller G. J.) 227

- Кель (Kehl R.) 580, 581  
 Кемали (Kemali D.) 446  
 Кембер (Kember N. F.) 681, 699, 703, 705  
 Кембл (Kemble A. R.) 414, 437  
 Кемула (Kemula W.) 191, 192  
 Кеннеди (Kennedy E. E.) 550  
 Кеннеди (Kennedy E. P.) 243  
 Кеннер (Kenner G. W.) 471, 486  
 Кент (Kent P. W.) 283, 291, 292  
 Кентен (Kenten R. H.) 384  
 Керзон (Curzon G.) 414  
 Керр (Kerr S. E.) 509  
 Кестон (Keston A.) 203  
 Кестон (Keston A. S.) 203  
 Керби (Kerby G. P.) 283  
 Кёрбл (Körbl J.) 677  
 Кёрёш (Körös Z.) 519  
 Кieber (Kieber R. J.) 290  
 Кидд (Kidd D.A.A.) 543  
 Килгор (Kilgour G. L.) 275  
 Кинзингер (Kinsinger W. G.) 101  
 Кирби (Kirby H.) 127  
 Кирби (Kirby K. S.) 514, 525  
 Кирби-Берри (Kirby-Berry H.) 99, 183, 302, 387, 415—422, 424, 435, 443, 445, 446, 578, 730, 773  
 Кирк (Kirk M. R.) 340, 341, 353  
 Кирквуд (Kirkwood S.) 449, 452  
 Кирмсе (Kirmse W.) 228, 346  
 Кирхнер (Kirchner J. G.) 110, 227, 637  
 Кис (Kis J.) 192  
 Кларк (Clarke) 481  
 Кларксон (Clarkson T. W.) 415  
 Классон (Claesson S.) 164  
 Клевстранд (Klevstrand R.) 268  
 Клегг (Clegg D. L.) 63, 138, 139, 141, 185  
 Клейтон (Clayton R. A.) 425  
 Клеменшиц (Klementsitz W.) 537—539  
 Клерк-Бори (Clerk-Bory M.) 573  
 Клинсберг (Klingsberg E.) 665  
 Клудас (Kludas K. H.) 503  
 Клуенер (Kluener R. G.) 640  
 Кнессл (Knessl O.) 377, 378  
 Кноблох (Knobloch E.) 327  
 Кнудсон (Knudson A. G., Jr.) 415  
 Князятова Е. И. 105  
 Кобрл (Kobrl V.) 236  
 Коган (Kogan L.) 522  
 Кодичек (Kodiček E.) 363, 365, 562—564, 603  
 Козени (Kozeny J.) 63  
 Коитио (Koichio K.) 583  
 Койама (Koyama J.) 229  
 Колдуэлл (Coldwell B. B.) 661, 662  
 Колдуэлл (Caldwell P. C.) 166  
 Коллонич (Kollonitsch J.) 341  
 Колмейер (Kohlmeyer H. G.) 223, 224  
 Колоушек (Koloušek J.) 96, 105, 125, 196, 435, 439, 440, 447, 535  
 Кольб (Kolb J. J.) 173, 412, 460  
 Комаркова (Komárková A.) 6, 578, 581  
 Коменда (Komenda J.) 619  
 Комуцци (Comuzzi B.) 140, 164  
 Кон (Cohn W. E.) 513  
 Конвей (Conway W.) 189  
 Кондо (Kondo S.) 585  
 Конзелмен (Conzelman G. M., Jr.) 649  
 Коннел (Connell G. E.) 434, 437, 777  
 Коноп (Konop R.) 5, 100, рис. 78  
 Консен (Consden R.) 23, 27, 28, 51, 73, 74, 93—95, 122, 134, 143, 147, 152, 404, 412—414, 418—423, 469, 470, 649, 667  
 Коп (Core C. L.) 363  
 Копецкий (Kopecký A.) 604  
 Копольдова (Kopoldová J.) 93, 94, 428, 435, 443, 445  
 Коппе (Koeper R. E.) 576  
 Корбац (Corbaz R.) 649  
 Корвин (Corwin L. M.) 580  
 Корен (Koren H.) 186  
 Коржистек (Kofistek S.) 146, 170, 212, 328, 329  
 Корнфорт (Cornforth J. W.) 411, 427  
 Кorte (Korte F.) 618, 620  
 Косиковский (Kosikovsky F. V.) 435  
 Косимура (Koshimura E.) 357  
 Котакэ (Kotake M.) 406  
 Коувин (Khouvine Y.) 438  
 Коулсон (Coulson C. B.) 105, 428, 435  
 Коунсел (Counsell J. N.) 145, 264  
 Кофод (Kofod H.) 307, 387  
 Кофрани (Coffrányi E.) 413, 438  
 Кох (Koch J.) 536  
 Кохакян (Kochakian Ch. D.) 342, 358, 359  
 Кочент (Kočent A.) 613  
 Коштирж (Koštir J. V.) 26, 109, 146, 147, 227, 228, 247, 249, 389, 547  
 Коштойяц Х. С. 25  
 Коэн (Cohen S. S.) 280, 289, 290  
 Кравчинский (Krawczynski J.) 525  
 Крал (Král J. A.) 95, рис. 184, 447, 575, 578  
 Крамер (Crammer J. L.) 611  
 Краут (Kraut H.) 606  
 Крафт (Kraft D.) 533, 536  
 Крацль (Kratzl K.) 331  
 Кребс (Krebs H. A.) 519  
 Крейг (Craig L. C.) 37, 54  
 Крекельс (Krekels A.) 476  
 Кремер (Cremer H. D.) 503  
 Крессман (Kressmann T. R. E.) 108, 110  
 Кретович В. Л. 411  
 Криппа (Crippa A.) 172  
 Кристиан (Christian W.) 186  
 Кристман (Christman J. F.) 615  
 Кричевский (Kritchevsky D.) 340, 341, 350, 353  
 Кричевский (Kritchevsky T. H.) 342, 350  
 Крокерт (Crokaert R.) 617  
 Крокер (Crocker C.) 415, 449—451, 460  
 Кроль (Krol S.) 581  
 Кросби (Crosbie G. W.) 508  
 Кроузер (Crowther J.) 712  
 Круисчанк (Cruickshank D. H.) 245, 249  
 Крумплер (Crumpler H. R.) 433, 446  
 Крумплер (Crumpler T. B.) 675, 689  
 Крюкель (Kruechel B.) 521  
 Кудзин (Kudzin S. F.) 302, 330  
 Кузин А. М. 133  
 Кузмано (Cusmano F.) 505  
 Кузнецов Г. 668  
 Куилли (Quilley E.) 310

- Кук (Cook A. H.) 459  
 Кук (Cook J. W.) 656—658  
 Кук (Cook R. P.) 364, 365  
 Куксон (Cookson G. H.) 581  
 Кулонен (Kulonen E.) 250  
 Кумпф (Kumpf W.) 486  
 Кумэ (Kumé S.) 165, 380  
 Кун (Kuhn R.) 26, 428, 551  
 Кунц-Краузе (Kunz-Krause H.) 22  
 Курти (Curti R.) 72  
 Кутачек (Kutáček M.) 5, 207, 439, 730  
 Кучера (Kučera J.) 214, 350, 351, 364  
 Кушинский (Kuschinsky G.) 518  
 Кхорана (Khorana H. G.) 471, 486  
 Кьер (Kjaer A.) 600  
 Кюн (Kühn A.) 186  
 Кюршнер (Kürschner K.) 100
- Ларг (Lugg J. W. H.) 244  
 Ла-Грутта (La Grutta G.) 607  
 Ладеманн (Lademann R.) 303, 317, 326  
 Лайтбоун (Lightbown J. W.) 645  
 Лаквилл (Luckwill L. C.) 175, 573  
 Лакс (Lax E.) 114  
 Лакур (Lacourt A.) 188, 673, 688, 694, 703, 704, 710, 713  
 Лакшминараян (Lakshminarayan K.) 129  
 Лангер (Langer A.) 188, 683, 743  
 Ландманн (Landmann W. J. A.) 463, 464, 479, 481, 482  
 Ландуа (Landua A. J.) 146, 403, 437  
 Ланнинг (Lanning M. C.) 280  
 Ланьо (Lagneau C.) 330, 331  
 Лاپин (Lapin H.) 372  
 Ларсон (Larson L. M.) 109, 646  
 Ласковский (Laskowski D. E.) 688, 689  
 Латинак (Latinák J.) 82, 83, 301, 390, 397, 591, 592, 594, 595  
 Латураз (Laturaze J.) 241  
 Лаутер (Lowther A. G.) 477  
 Лаутнер (Lautner V.) 185  
 Лауфер (Laufer L.) 509  
 Лауч (Lautsch W.) 108, 757  
 Лафарг (Lafargue A.) 367  
 Лапарус (Lazarus M.) 402  
 Левант (Levant A. J.) 366  
 Леви (Levi A. A.) 87, 174, 642  
 Леви (Levy A. L.) 429, 430, 434, 438, 459, 472, 474, 478, 479, 481  
 Левин (Levine J.) 128, 548, 549, 645, 646  
 Ледвина (Ledvina M.) 151, 419, 523  
 Ледерер (Lederer E.) 26, 682, 709  
 Ледерер (Lederer M.) 108, 139, 196, 232, 392, 398, 521, 599, 663, 664, 671, 682, 689, 692—694, 698, 700, 707—710, 712  
 Ле Жетте (Le Gette J.) 474, 779  
 Лейзерсон (Leiserson L.) 536, 537  
 Лейн (Lein M.) 416  
 Лейтгардт (Leuthardt F.) 94, 269  
 Лейфер (Leifer E.) 563  
 Лелуар (Leloir L. F.) 145, 146, 184, 291, 520  
 Леммон (Lemmon R. M.) 452  
 Лемье (Lemieux R. U.) 267, 284  
 Ленс (Lens J.) 486
- Леонгарди (Leonhardi G.) 571, 573  
 Леонис (Leonis J.) 128  
 Леопольд (Leopold A. C.) 569, 574  
 Леопольд (Leopold B.) 331, 332  
 Лерман (Lerman L. S.) 212, 213  
 Ле-Розен (Le Rosen A. L.) 72  
 Лерх (Lerch P.) 200  
 Лестранж (Le Strange R. J.) 5, 142  
 Леффлер (Löffler J. E.) 189, 243, 247  
 Лёв (Löw I.) 551  
 Лейшнер (Leuschner F.) 562—565  
 Лёфгрен (Löfgren N.) 515  
 Ли (Lea C. H.) 239  
 Ли (Li C. H.) 458, 474  
 Либих (Liebig J.) 24  
 Ливермор (Livermore A. H.) 427  
 Ливингстон (Livingston C. H.) 99  
 Лизеганг (Liesegang R. E.) 23, 134  
 Лин (Lin P. H.) 563, 564  
 Линггуд (Linggood F. V.) 430  
 Линд (Lind E. F.) 584  
 Линдберг (Lindberg M. C.) 341  
 Линдберг (Lindberg O.) 199, 612  
 Линдерстрем-Ланг (Linderström-Lang K.) 98  
 Линдквист (Lindquist B.) 232, 233  
 Линднер (Lindner G.) 100, 444  
 Линдстедт (Lindstedt G.) 312, 313, 324  
 Линзер (Linsner H.) 572, 575  
 Линн (Lynn W. S., Jr.) 228  
 Линскенс (Linskens H. F.) 706  
 Лисицкий (Lissitzky S.) 196, 200, 452  
 Лист (List P. H.) 169, 534  
 Лит (Leete E.) 535  
 Литтл (Little J. A.) 509  
 Лихтенберг (Lichtenberger M. J.) 242  
 Лихштейн (Lichstein H., C.) 615  
 Лич (Leach B. E.) 650  
 Ло Бьянко (Lo Bianco S.) 93, 405  
 Лоб (Loeb G.) 242  
 Локкарт (Lockhart J. M.) 384  
 Ломбардо (Lombardo M. E.) 360  
 Лонг (Long A. C.) 398  
 Лонг (Long A. G.) 230, 233, 243  
 Лонг (Long A. J.) 707  
 Лонгенекер (Longenecker W. H.) 110  
 Лорд (Lord K. A.) 653, 654  
 Лоспаллито (Lospalluto J.) 203  
 Лоуренс (Laurence D. J. R.) 184  
 Лукас (Lucas R.) 62  
 Луссман (Lussman D. J.) 539  
 Льюис (Lewis J. A.) 695, 705  
 Льюис (Lewis J. C.) 649  
 Льюис (Lewis L.) 625  
 Льюис (Lewis P. R.) 178  
 Лэмбуй (Lambooy J. P.) 426  
 Любарт (Lewbart M. L.) 361  
 Люббс (Lubbs) 481  
 Лютер (Luetcher J. A., Jr.) 363  
 Люттрингхаус (Lüttringhaus A.) 306
- Ма (Ma R. M.) 129  
 Магази́к (Magasanik B.) 248, 510, 512, 513  
 Маги (Magee R. L.) 696, 697  
 Магнус (Magnus K. E.) 153

- Мак-Вильям (Mac William I. C.) 268  
 Мак-Дональд (McDonald E. J.) 283  
 Мак-Дональд (McDonald J. W.) 509  
 Маки (Maki M.) 271  
 Макино (Makino K.) 176, 587  
 Мак-Интайр (McIntyre R. T.) 690  
 Мак-Комб (McComb E. A.) 245  
 Мак-Коннел (McConnell W. B.) 479  
 Мак-Креди (McCready R. M.) 275, 281  
 Мак-Кроне (McCrone W. C.) 688, 689  
 Мак-Лин (McLean D. A.) 63  
 Мак-Магон (McMahon J. M.) 340, 350  
 Мак-Муллен (McMullen W. H.) 543, 545  
 Мак-Оми (McOmie J. F. W.) 672, 675, 682, 684  
 Мак-Фаррен (McFarren E. F.) 266, 275, 402, 423, 424, 426  
 Макферсон (Macpherson H. T.) 414, 437  
 Мальпресс (Malpress F. H.) 259, 287  
 Мангольд (Mangold H. K.) 237—239  
 Маннеринг (Mannering G. J.) 529  
 Мапсон (Mapson L. W.) 632  
 Мардашев С. Р. 432  
 Маринетти (Marinetti G. V.) 239, 240  
 Марини-Беттоло-Маркони (Marini-Bettolo-Marconi C. B.) 170  
 Марквардт (Markwardt F.) 357  
 Маркгам (Markham R.) 162, 508, 510—514, 522  
 Маркес (Markees S.) 249  
 Маркович (Markovič O.) 535  
 Марнияма (Maruyama J.) 505  
 Мартен (Marten G.) 608  
 Мартин (Martin A. J. P.) 23, 27, 36, 45, 50, 51, 56, 75, 76, 134, 230, 255, 258, 437, 667  
 Мартин (Martin J. V.) 705  
 Мартин (Martin R. P.) 364  
 Мартин (Martin S. M.) 243  
 Мартин (Martin W.) 137  
 Мартинович (Martinovich R. J.) 691—693, 696, 697  
 Мархлевский (Marchlewski) 25  
 Марч (March R. B.) 177, 656—658  
 Марш (March M. M.) 607, 608, 610, 613, 615  
 Маршал (Marshal J. G.) 131, 132  
 Масамуне (Masamune H.) 271, 290  
 Масси (Massey J. L. M.) 176  
 Матес (Mathes P.) 537—539  
 Матоулкова (Matoulková V.) 618, 624, 623  
 Матрка (Matrka) 594  
 Маттиас (Matthias W.) 132, 137, 160  
 Маттокс (Mattox V. R.) 362  
 Матту (Mattu F.) 140, 164  
 Мауль (Maul W.) 616  
 Мадек (Masek K.) 5, 60, 61, 79, 88, 100, 105, 116, 122, 133, 152, 173, 221, 227, 230, 254, 279, 280, 337, 338, 361, 384, 394, 399, 497—499, 501, 527—530, 533—535, 540, 545—550, 552, 560, 566, 585, 682  
 Мацукава (Matsukawa T.) 607, 608  
 Мацуо (Matsuo Y.) 432  
 Мачак (Mačak V.) 535  
 Машбеф (Macheboeuf M.) 349, 513, 522, 527, 529, 530, 531  
 Мейгх (Meigh D. F.) 221, 222, 229  
 Мейдер (Mader W. J.) 341  
 Мейер (Meyer A. S.) 341  
 Мейнхард (Meinhard J. E.) 37, 98, 110  
 Мейсон (Mason H. L.) 360  
 Мейсон (Mason M.) 85, 392  
 Мелвил (Melville D. B.) 615  
 Меллон (Mellon E. F.) 476  
 Мелоун (Meloun B.) 6, 99, 178, 464  
 Менап (Mesnard P.) 367, 529  
 Ментцер (Mentzer C.) 172  
 Мередит (Meredith P.) 128  
 Мерилл (Merill E. W.) 351  
 Мерфи (Murphy H. W.) 41, 54, 367, 373  
 Меткаф (Metcalf R. L.) 177, 657, 658  
 Меткаф (Metcalf T. G.) 505  
 Мерц (Merz H.) 541, 542  
 Миеггивен (Miettinen J. K.) 126, 185, 420, 422  
 Микеш (Mikeš O.) 99, 136, 422, 432, 434, 436, 468  
 Милетти (Miletti M.) 127, 414, 534  
 Миллер (Miller J. B.) 267  
 Миллер (Miller J. M.) 110  
 Миллер (Miller R. P.) 638  
 Миллз (Mills C. F.) 428  
 Миллз (Mills G. J.) 475  
 Миллз (Mills J. S.) 155, 379, 380  
 Миранда (Miranda D.) 662  
 Мистретта (Mistretta A. G.) 646  
 Миттвер (Mittwer T.) 131, 132  
 Миттельман (Mittelmann R.) 437  
 Митчелл (Mitchell H. K.) 209, 619  
 Митчелл (Mitchell K. H.) 502, 503  
 Митчелл (Mitchell L. C.) 654, 655, 664  
 Миура (Miura K.) 429  
 Михалец (Michalec C.) 6, 230, 237, 350, 352, 363, 364, 365, 581, 583  
 Михалик (Michalik S.) 447  
 Михеель (Micheel F.) 108, 109, 237, 258, 262, 292, 307, 389, 663, 664  
 Михель (Michel R.) 196, 200, 759  
 Михль (Michtl H.) 509, 510, 522  
 Мидуно (Mitsuno M.) 311, 314, 316  
 Мияки (Miyaki K.) 182, 609  
 Мозли (Moseley P. B.) 71  
 Моисео (Moisio T.) 185  
 Мойнихан (Moynihan P.) 654, 655  
 Молостер (Moloster Z.) 663  
 Момосэ (Momose T.) 221, 222, 376, 761  
 Монзелизе (Monselise J. J.) 662  
 Монтрей (Montreuil J.) рис. 109, 508, 509, 512—514, 777  
 Монье (Monier R.) 477  
 Моравек (Morávek L.) 78, 150, 328, 682  
 Морган (Morgan D. M.) 287  
 Морган (Morgan J. F.) 411, 412  
 Морган (Morgan W. T. J.) 291  
 Моргю (Mourgue M.) 388  
 Мори (Mori I.) 182, 186, 585  
 Моррис (Morris C. J. O.) 598  
 Моррисон (Morrison A. B.) 259  
 Мортимер (Mortimer D. C.) 249, 262, 286—289  
 Мортрейль (Mortreuil M.) 438  
 Мотье (Motier M.) 661  
 Мой (Maw G. A.) 389

- Моулд (Mould D. L.) 41  
 Мраз (Mráz V.) 306, 310, 768  
 Мур (Moore A. M.) 179  
 Мур (Moor J. R.) 447  
 Мур (Moore S.) 27, 75, 101, 404, 437, 443, 444  
 Мурата (Murata A.) 667  
 Муртхи (Murlthy Vasudeva A. R.) 691, 692  
 Мус (Moos W.) 587  
 Мэй (Mai S. H.) 110  
 Мюкке (Muecke I. C.) 427  
 Мюллер (Müller A. F.) 94  
 Мюллер (Mueller G. C.) 403, 404  
 Мюллер (Müller K.) 260  
 Мюллер (Müller K. H.) 317  
 Мюллер (Müller R.) 572  
 Мюллер (Müller R. H.) 63, 138, 139, 141, 142, 161, 185  
 Мюльбергер (Mühlberher F. H.) 330  
 Мюльман (Mühlmann R.) 657, 658  
 Мюнье (Munier R.) 90, 382, 385, 522, 527, 529—532, 538, 540, 543—545, 550, 551, 562, 564, 565  
 Мютинг (Mütting D.) 411, 413, 443, 444, 741  
 Нагабушанам (Nagabhushanam A.) 411, 413, 741  
 Нагер (Nager U.) 416  
 Нагский (Naghski J.) 326  
 Наир (Nair J. H.) 233  
 Найт (Knight C. A.) 463  
 Накабаси (Nakabashi T.) 178  
 Накабаяси (Nakabayashi T.) 209, 304, 305, 312, 327  
 Накано (Nakano N.) 713  
 Наннинга (Nanninga L.) 310  
 Нараян (Narayan V. A.) 691, 692  
 Наута (Nauta W. T.) 379  
 Наход (Nachod F. C.) 44  
 Небель (Nebel H. J.) 290—292, 767  
 Негер (Neher R.) 339—341, 346, 349  
 Ней (Neu R.) 317  
 Нейгебауер (Neugebauer L.) 329  
 Нейкомм (Neukomm S.) 200  
 Нейман М. Б. 109, 146, 228  
 Нейрат (Neurath H.) 468, 487  
 Нейш (Neish W.J.P.) 250  
 Неринг (Nehring K.) 129, 130, 439  
 Ниволи (Nivoli M.) 586  
 Нигем (Nigam V. N.) 263, 269, 272, 277  
 Нидзян 519  
 Ник (Nys J. F.) 340  
 Никитин В. Н. 101  
 Никол (Nichol C. A.) 176, 620—622  
 Николас (Nicholas D.J.D.) 696  
 Николас (Nicholas R.E.H.) 577, 579, 580  
 Николсон (Nicholson D. E.) 412  
 Нил (Neal A. L.) 176  
 Нильсен (Nielsen S.) 489  
 Нильсон (Nilsson R.) 519  
 Нисиды (Nishida S. J.) 304, 305, 630  
 Нитш (Nitsch W. H.) 234, 236  
 Новажинский (Nowaczynski W.) 340, 341  
 Новелли (Novelli A.) 597  
 Новелли (Novelli L.) 216, 269  
 Новорытко (Noworytko J.) 411, 413  
 Нода (Noda M.) 237  
 Нордал (Nordal A.) 268  
 Нордман (Nordman J.) 247  
 Нордман (Nordman R.) 241, 242, 245, 246  
 Нуñez (Nunez G.) 236, 603  
 Ньюкомб (Newcombe A. G.) 331, 332  
 Ньютон (Newton G. G. F.) 640, 642  
 Нэфталин (Naftalin L.) 436  
 Нэш (Nash H. A.) 549, 550, 646  
 Оверелл (Overell B. T.) 241, 243, 247  
 Огава (Ogawa S.) 631  
 Огур (Ogur M.) 507  
 Ока (Oka Y.) 667  
 О'Каллаган (O'Callaghan C. H.) 629  
 Окасаки (Okasaki S.) 357  
 Окерфельдт (Acerfeldt S.) 182  
 Оклэр (Auclair J. L.) 173, 411, 416  
 О'Колла (O'Colla P.) 654, 655  
 Окснер (Ochsner F.) 537  
 Окуда (Okuda S.) 550  
 Олбон (Albon N.) 160, 166, 261, 262, 274  
 Олкок (Alcock M.) 129  
 Олли (Olley J.) 239, 241  
 Опарян А. Н. 257, 260, 261  
 Опеньска-Блаут (Opieska-Blauth J.) 156, 196, 230, 259, 260, 286, 287  
 Орескес (Oreskes I.) 142, 411—413  
 Ортен (Orten J. M.) 580  
 Орчин (Orchin M.) 81  
 Осборн (Ochorn G. H.) 700  
 Осима (Oshima Y.) 209, 312, 324, 326, 401  
 Остё (Osteaux R.) 233, 241, 426, 476, 477  
 Отиан (Ochiai E.) 550  
 Отосаи (Otosai K.) 165, 682  
 Оттезен (Ottesen M.) 479  
 Оттер (Otter I. K. H.) 656  
 Оу (Ough L. D.) 166  
 Оулегла (Oulehla B.) 105, 146  
 Офнер (Ofner P.) 358  
 Павличкова (Pavličková) 395  
 Падр (Pádr Z.) 505, 507, 519  
 Пазур (Pazur J. H.) рис. 107  
 Паладини (Paladini A. C.) 145, 146, 184, 520  
 Парди (Pardee A. B.) 78, 459  
 Парик (Parikh S. N.) 278  
 Парихар (Parihar D. B.) 211  
 Парк (Parke T. V.) 186  
 Паркер (Parker G.) 513  
 Партридж (Partridge C.W.H.) 217  
 Партридж (Partridge S. M.) 151, 266, 268, 271, 272, 290, 292, 296, 421, 422, 632  
 Пасика (Pasicka A. E.) 411, 412  
 Пасини (Pasini C.) 575, 577  
 Пасхина Т. С. 437  
 Патон (Patton A. R.) 173, 412, 414, 416  
 Патт (Patt P.) 131, 132, 210, 650  
 Патте (Patte F.) 624  
 Пауль (Paul A. G.) 545, 546  
 Паульсен (Paulsen A.) 540

- Пачкий (Patschky A.) 630  
 Патеко (Pacheco H.) 572, 574  
 Пезе (Pesez M.) 167, 340  
 Пейн (Payne W. J.) 290  
 Пельцова (Pelcová V.) 342  
 Пем (Pöhm M.) 546, 547, 550  
 Пенасс (Pénasse L.) 477  
 Пенни (Penney J. R.) 434  
 Пено (Péneau J. R.) 576, 577  
 Перила (Perilä O.) 232, 238  
 Пернис (Pernis B.) 437  
 Перциваль (Percival E.) 280  
 Петерсен (Petersen R.) 551  
 Петерсон (Peterson D. H.) 644  
 Петерсон (Peterson E. A.) 212, 213, 497, 614  
 Петтинга (Pettinga C. W.) 649  
 Петуел (Petuely F.) 292  
 Пехан (Pechan L.) 188  
 Пехет (Pechet M. M.) 345, 346, 361  
 Пехман фон (von Pechmann E.) 500, 501  
 Пецакова (Pecáková L.) 164  
 Пик (Peek R. L.) 63  
 Пинтерик (Pinteric L.) 185  
 Пирпонт (Pierpont W. S.) 616, 617  
 Пирчо (Pircio A.) 547  
 Платнер (Plattner P. A.) 416  
 Платц (Platz H.) 22  
 Плуммер (Plummer A. J.) 521  
 Полиг (Poulig M. D.) 185  
 Поллард (Pollard A.) 259  
 Поллард (Pollard A. L.) 644, 645  
 Поллард (Pollard F. H.) 133, 669, 672—677, 680—682, 684, 685, 687, 690—694, 696, 697, 700, 704, 705  
 Полсон (Polson A.) 183, 184, 402, 408, 429, 435  
 Пон (Pon G.) 283  
 Попьяк (Popják G.) 237  
 Порат (Porath J.) 167  
 Портер (Porter R. R.) 474, 479  
 Портер (Porter W. L.) 210, 261, 536  
 Портеус (Porteous J. W.) 232  
 Порцеллатти (Porcelatti G.) 446  
 Постернак (Posternak T.) 225, 226  
 Потер (Poter W. L.) 663  
 Поттерат (Potterat M.) 277, 661  
 Прайс (Price T. D.) 183, 184, 186  
 Прасад (Prasad A. L.) 500  
 Пратт (Pratt J. J.) 411  
 Придгам (Pridham J. B.) 277  
 Прост (Proszt J.) 192  
 Прохазка (Procházka Z. G.) 5, 7, 144, 173, 207, 212, 213, 228, 301, 327, 341, 344, 352, 354, 355, 548, 551, 566, 569, 570, 573, 629, 631, 632, 768  
 Прум (Proom H.) 131  
 Пршбил (Přibil R.) 677  
 Пти (Petit E. L.) 503  
 Пуарье (Poirier P.) 167  
 Пустовалов В. Л. 236  
 Пуштай (Pusztai A.) 614  
 Пфайль (Pfeil E.) 523, 524  
 Пфенниг (Pfennig N.) 431  
 Пью (Pugh C. T.) 646  
 Пээбо (Pääbo K.) 426  
 Рабек (Rábek V. T.) 123, 124, 127, 146, 147, 247, 389, 623, 626  
 Рабидо (Rabideau G. S.) 167, 266, 417  
 Равентос (Raventos J.) 523, 524  
 Раджимаманга (Ratsimamanga A. R.) 346  
 Радхакришнамурти (Radhakrishnamurty R.) 606  
 Райдон (Rydon H. N.) 413, 503  
 Райл (Ryle A. P.) 465, 494  
 Райли (Riley J. F.) 151, 575, 578  
 Райс (Reiss R. V.) 260  
 Райс (Rice R. G.) 222  
 Райт (Wright J. T.) 523  
 Райт (Wright L. D.) 615  
 Райт (Wright N. G.) 411  
 Райт (Wright S. E.) 373  
 Райхельт (Reichelt J.) 393, 537—540  
 Райхерт (Reichert M.) 199  
 Райхль (Reichl E. R.) 76, 77, 80, 189, 230, 243, 247, 566  
 Райхштейн (Reichstein T.) 367, 369  
 Ракузен (Racusen D. W.) 197  
 Рам (Rahm J.) 594  
 Рамачандран (Ramachandran L. K.) 479, 481  
 Рамстед (Ramsted E.) 368  
 Рао (Rao C. L.) 695  
 Рао (Rao K. R.) 479  
 Рао (Rao N. A. N.) 129, 179  
 Рао (Rao N. R.) 663, 665  
 Рао (Rao P. S.) 263  
 Рао (Rao T.) 387  
 Рао (Rao V. K. M.) 130  
 Раппопорт (Rappoport D. A.) 580  
 Раттер (Rutter L.) 109, 129, 130, 137, 166  
 Рауэн (Rauen H. M.) 619  
 Рахандраха (Rahandhraha T.) 346  
 Рачинский В. В. 32, 41, 105, 271  
 Регнелт (Rehnelt K.) 586  
 Регуэра (Reguera R. M.) 509, 519  
 Редди (Reddi K. K.) 562, 563, 564  
 Редлих (Redlich P.) 234, 236, 237  
 Редфилд (Redfield R. R.) 431, 436  
 Рейд (Reid L. L.) 232  
 Рейд (Reid S. G.) 331, 332  
 Рейд (Reid W. W.) 498, 500, 501  
 Рейнбольдт (Rheinboldt) 22  
 Рейнгардт (Reinhardt F.) 521  
 Рейндель (Reindel F.) 413, 460  
 Рейнеке (Reineke L. M.) 344, 348, 644  
 Рейт (Reit W. S.) 471, 472  
 Рейтер (Reuter F. W.) 530, 534  
 Релинг (Röhling A.) 201  
 Ренья (Regna P. P.) 644, 646  
 Респланди (Resplandy A.) 528, 529  
 Рестл (Restle H.) 479  
 Рёш (Rösch S.) 412  
 Ржетовский (Retovský R.) 26  
 Рибарж (Rybář D.) 146, 595, 596  
 Ривс (Reeves W. A.) 675, 689  
 Рид (Reed L. J.) 427, 609, 610  
 Риддел (Riddell Ch.) 364, 365  
 Ридль (Riedl K.) 329  
 Ризл (Rýzl M.) 405  
 Римингтон (Rimington C.) 577, 579—581  
 Рис (Rees M. W.) 466, 490

- Риффарт (Riffart W.) 402  
 Ричард (Ritchard W.) 470  
 Ричардсон (Richardson E.) 359  
 Ризнитс (Rienits K. G.) 283  
 Робертс (Roberts E.) 444  
 Робертс (Roberts E. A.) 317, 324  
 Робинсон (Robinson F. A.) 505  
 Робсон (Robson A.) 204  
 Ровери (Roverly M.) 477  
 Родригес (Rodrigues L. D.) 606  
 Розбек (Rosebeck S.) 412  
 Розен (Rosen G.) 507  
 Розенкрантц (Rosenkrantz H.) 340  
 Рокланд (Rockland L. B.) 127, 143, 147, 185, 199, 200, 400—402, 423  
 Рокланд (Rockland L. S.) 427, 430, 431  
 Роланд (Roland J. F., Jr.) 420, 425  
 Романо (Romano C.) 523, 551  
 Ромейке (Romeike A.) 537, 538  
 Роминский И. П. 283  
 Росси (Rossi A.) 606  
 Рост (Rost) 164  
 Ротариу (Rotariu G. J.) 68  
 Ротман (Rothman S.) 447  
 Роуэн (Rowen J. W.) 587  
 Рохатжи (Rohatgi S.) 367  
 Рош (Roche J.) 387, 447—451, 481  
 Рубин (Rubin B. L.) 335, 359, 360  
 Рубинштейн (Rubinstein K.) 600  
 Руланд (Rhuland L. E.) 411, 426  
 Рунге (Runge F. F.) 21, 129, 666  
 Рус (Roos P.) 483  
 Руссос (Roussos G. G.) 647  
 Руэлиус (Ruelius H. W.) 428  
 Рюэггер (Rüegger A.) 273, 532, 545, 546  
 Рюзман (Ruhemann S.) 407
- Савард (Savard K.) 336, 347, 358, 359  
 Савари (Savary P.) 237  
 Саенко Г. Н. 133  
 Саито (Saito A.) 650  
 Сайфер (Saifer A.) 142, 411, 412, 413  
 Сакагучи (Sakaguchi T.) 169, 698, 739  
 Сакамото (Sakamoto S.) 611  
 Саклавска-Шимонова (Saklavska-Szymo-  
 нова C.) 287  
 Салливан (Sullivan M. B.) 447  
 Сальвесен (Salvesen B.) 394, 523, 524, 540  
 Самарина О. П. 422  
 Самсонов Г. В. 25  
 Санваль (Sanwal B. D.) 196  
 Саннье (Sannié C.) 341, 372, 528, 663  
 Сано (Sano I.) 214  
 Сансоне (Sansone G.) 505  
 Сапожников Д. И. 584  
 Сарма (Sarma B.) 699  
 Сарма (Sarma P. S.) 606  
 Сарнецкая-Келлер (Sarnecka-Keller M.) 411, 413  
 Сасакава (Sasakawa Y.) 367, 369  
 Сатаке (Satake K.) 235, 762  
 Сато (Sato J.) 405  
 Свендсен (Svendsen A. B.) 241, 327, 345, 540
- Свенссон (Svensson H.) 216  
 Сवेशников 25  
 Свободова (Svobodová S.) 136, 150, 611, 612  
 Северин С. Е. 133, 576  
 Сегмиллер (Seegmiller C. G.) 281  
 Селигсон (Seligson D.) 248  
 Семина Л. А. 432  
 Семпинская (Sempinska E.) 509, 510  
 Сен (Sen S. P.) 418, 421, 569, 574, 598  
 Сенси (Sensi F.) 85  
 Сенси (Sensi P.) 645  
 Серки (Serchi C.) 356  
 Серки (Serchi G.) 612  
 Серл (Searle J. M.) 446  
 Сибата (Shibata M.) 662—664, 686, 691, 698, 699  
 Сибата (Shibata S.) 303  
 Сибликова (Sibliková O.) 6, 334, 376  
 Сикор (Secor G. E.) 255  
 Сикора (Sykora V.) 228  
 Силипранди (Siliprandi D.) 607, 609  
 Силипранди (Siliprandi N.) 607, 609  
 Силлен (Sillen L. G.) 56  
 Симидзу (Shimizu S.) 497, 595  
 Симон (Simon K.) 505  
 Симонарт (Simonart P.) 501  
 Симпсон (Simpson M. E.) 212, 213  
 Симпсон (Simpson S. A.) 363  
 Симпсон (Simpson T. H.) 84, 312  
 Синг (Synge R. L. M.) 27, 28, 36, 41, 45, 50, 51, 56, 71, 402, 411, 423, 428, 649  
 Синклер (Sinclair A. O.) 638  
 Сиронваль (Sironval C.) 585  
 Сисакян Н. М. 431  
 Ситон (Seaton D. L.) 515—517  
 Скалицкий (Skalický L.) 591  
 Скейнс (Scanes F. S.) 474  
 Скиппер (Skipper H. E.) 509  
 Скотт (Mc Nair Scott D. B.) 289, 290  
 Скотт (Scott R. W.) 243  
 Скрауп (Skraup L.) 23  
 Славик (Slavík J.) 542, 543  
 Славик (Slavík K.) 109, 177, 178, 227, 228, 249, 617, 618, 621, 623  
 Славикова (Slavíková L.) 542, 543  
 Славикова (Slavíková-Matoulková V.) 618  
 Слама (Sláma L.) 185  
 Сметана (Smetana) 594  
 Смит (Smit W. M.) 45  
 Смит (Smit D. C. C.) 258  
 Смит (Smith D. M.) 26  
 Смит (Smith E. L.) 415, 417, 427, 460, 487, 623, 624  
 Смит (Smith F.) 243, 267, 278, 280, 281, 284, 292, 294, 368  
 Смит (Smith G. N.) 399  
 Смит (Smith J.) 93, 95, 404, 412, 413, 415—417, 419, 428, 430, 451  
 Смит (Smith J. D.) 162, 508, 510—512, 514, 522  
 Смит (Smith J. N.) 587  
 Смит (Smith K. C.) 508  
 Смит (Smith L. L.) 364

- Смит (Smith M. J. H.) 310  
 Смит (Smith P. W. C.) 413  
 Смит (Smith P. W. G.) 503  
 Смочкевич (Smoczkieviczowa A.) 607  
 Сморг (Smrt J.) 426  
 Смасши (Smashey A. R.) 646  
 Снайдер (Snyder J. Q.) 614, 615  
 Снелл (Snell E. E.) 616, 617  
 Снелл (Snell N. S.) 649  
 Снелман (Snellman O.) 513  
 Собер (Sober H. A.) 212, 213, 479, 497, 504, 760  
 Соболева Г. А. 317  
 Сокольский (Sokolski W. T.) 645, 649  
 Соломонс (Solomons I. A.) 644, 646  
 Солук (Solook E.) 521  
 Сольмс (Solms J.) 215  
 Сом (Soma) 632  
 Соуркес (Sourkes T.) 426  
 Соутар (Soutar T. H.) 260  
 Соухон (Souchon F.) 435  
 Спадони (Spadoni A.) 606  
 Спарк (Spark A. H.) 640  
 Спеккер (Specker H.) 696  
 Сперлих (Sperlich H.) 223, 224, 330  
 Спитеря (Spiteri J.) 234, 236  
 Сполдинг (Spalding D. H.) 505  
 Спорер (Sporer A. H.) 585  
 Спристерсбах (Spriestersbach D.) 243  
 Спростон (Sproston T.) 605  
 Стадтман (Stadtman E.) 235  
 Стадтман (Stadtman E. R.) 617  
 Стамп (Stamp C.) 332  
 Старк (Stark J. B.) 243, 246  
 Стейн (Stein W. H.) 27, 75, 101, 404, 437, 443, 444  
 Стефанович (Stefanovic G.) 693, 694, 700  
 Стивенс (Stevens B. J.) 568  
 Стивенс (Stevens H. M.) 696  
 Стивенс (Stephens J.) 637, 639, 640, 642  
 Стидворти (Stidworthy G.) 342, 358, 359  
 Стил (Steel A. E.) 595, 681, 697  
 Стокласа (Stoklasa J.) 26  
 Сторгардз (Storgards I.) 232, 233  
 Сторп (Storp C. B.) 227, 229, 379  
 Стотц (Stotz E.) 239, 240  
 Стоу (Stowe B. B.) 569, 570, 574  
 Стоун (Stone W. R.) 590  
 Стоффин (Stoffyn P. J.) 292, 767  
 Стрейн (Strain H. H.) 26, 32, 41, 54, 63, 110, 584  
 Стронг (Strong F. M.) 425  
 Стьюард (Steward F. C.) 254, 402, 408, 417, 418, 420, 428, 429, 430, 438, 440  
 Стюарт (Stuart R. G.) 173, 412  
 Сугава (Sugawa T.) 546, 547  
 Сурак (Surak J. G.) 691 — 693, 696, 697  
 Сухи (Suchý K.) 699  
 Сушкова А. С. 283  
 Суэйн (Swain T.) 230, 329  
 Сьёвалл (Sjovall J.) 353, 354, 356  
 Сэвидж (Savage R. I.) 269, рис. 135  
 Сэкал (Sakal E. H.) 351  
 Сэки (Seki T.) 235, 762  
 Сэммонз (Sammons H. G.) 128  
 Сю (Shu) 128  
 Табон (Tabone J.) 213  
 Тадра (Tadra M.) 152, 279, 280  
 Тайлер (Tyler V. E., Jr.) 532, 535, 546  
 Тайра (Taira) 642  
 Тайтэс (Titus E.) 202  
 Такахася (Takahashi B.) 650  
 Такеда (Takeda K.) 354, 355  
 Талер (Thaler H.) 662  
 Таллер (Tuller E. F.) 427  
 Талмуд Д. Л. 425  
 Там (Tam N. D.) 491  
 Тамм (Tamm Ch.) 514  
 Танака (Tanaka K.) 354, 355, 546, 547  
 Тананаев Н. А. 21  
 Тарбелл (Tarbell D. S.) 377  
 Таубер (Tauber H.) 503  
 Таучстон (Touchstone J. C.) 362  
 Тауэрс (Towers G. H. N.) 249—251  
 Тегетгофф (Tegethoff B.) 629  
 Тевари (Tewari S. N.) 536, 691  
 Тейге (Teige K.) 709  
 Тейлор (Taylor D. A. H.) 366  
 Тейлор (Taylor T. J.) 292  
 Тэйн (Thain E. M.) 617  
 Тейфель (Täufel K.) 260  
 Теннент (Tennent D. M.) 338, 360, 363  
 Теннис (Toennies G.) 173, 412, 460, 464  
 Теннью (Tennöe K.) 366, 369  
 Тешпель (Töppel O.) 131, 139  
 Теренин 101  
 Тернер (Turner R. A.) 490  
 Терьесен (Terjesen S. G.) 27, 87  
 Течче (Tecce G.) 606, 607  
 Тиба (Chiba Y.) 584  
 Тизелиус (Tiselius A.) 26, 40, 61, 71, 342, 350, 423, 425, 497, 499, 503  
 Тильден (Tilden D. H.) 661, 662  
 Тимманн (Thimann K. V.) 569, 570, 574  
 Тис (Thies H.) 530, 534  
 Тиц (Tietz A.) 237  
 Тиц (Tietz H.) 657, 658  
 Тод (Todd A.) 613  
 Тозеланд (Toseland P. A.) 472  
 Тозер (Toser B. T.) 474  
 Токштейн (Tockstein A.) 5, 52  
 Томашек (Tomášek V.) 422, рис. 182, 183  
 Томпсон (Thompson A. R.) рис. 222, 232, 234, 235, 492, 762, 763  
 Томпсон (Thompson E. O. P.) 467, 474  
 Томпсон (Thompson J. F.) 254, 402, 408, 429, 438  
 Томпсон (Thompson R. H. S.) 249  
 Торо (Thaureaux J.) 463  
 Торп (Thorpe R. H.) 186, 371  
 Трайбер (Treiber E.) 186  
 Трапп (Trappe) 112  
 Тревеллан (Trevelyan W. E.) 266  
 Трей (Trey H.) 23, 129, 130  
 Трикойс (Trikojus V. M.) 279  
 Тристам (Tristam G. R.) 465  
 Тройер (Troyer J. R.) 326  
 Тужон (Tuzson J.) 372, 545, 546

- Тумова (Tumová) 342  
 Туппи (Tuppy H.) 387, 388, 416, 460, 463, 466, 468, 492, 493  
 Турба (Turba F.) 471, 473, 475, 519  
 Турба (Turba N.) 519  
 Туркельтауб И. М. 60, 70  
 Тыхий (Tichý R.) 534, 536
- Уайз (Wise C. S.) 161  
 Уайз (Wise E. N.) 201  
 Уайлд (Wild G. M.) 77, 255  
 Уайт (White L. M.) 255  
 Уайт (White W. F.) 463, 464, 487  
 Уивинг (Weaving A. S.) 384  
 Уиггинс (Wiggins L. F.) 412  
 Уилер (Wheeler G. P.) 509  
 Уилсон (Wilson R.) 363  
 Уильямс (Williams K. T.) 261, 330  
 Уильямс (Williams R. H.) 127  
 Уильямс (Williams R. J. P.) 671  
 Уильямс (Williams R. T.) 587  
 Уильямс (Williams T. J.) 32  
 Уильямс (Williams T. N. W.) 404  
 Уинго (Wingo W. J.) 201  
 Уинн (Wynn V.) 104, 404  
 Уинстон (Winsten W. A.) 174, 614, 624, 640, 644  
 Уинтерингэм (Winteringem F. P. W.) 136, 137, 199—201, 204, 205, 654, 655  
 Уитби (Whitby L. G.) 612, 613  
 Уитл (Wittle) 617  
 Уятли (Whitley A.) 693  
 Ульман (Ulmann M.) 629, 630  
 Умбаргер (Umbarger H. E.) 248  
 Ундервуд (Underwood J. C.) 400, 427, 430, 431  
 Уно (Uno H.) 229  
 Уодман (Wadman W. H.) 273, 277  
 Уокер (Walker D. G.) 288  
 Уокер (Walker J.) 543  
 Уокер (Walker J. B.) 433  
 Уокер (Walker J. T.) 523  
 Уокер (Walker T. B.) 536, 537  
 Уокер (Walker W. R.) 560, 692  
 Уоллер (Waller J.) 663  
 Уолш (Walsche J. M.) 446  
 Уорд (Ward P. F. W.) 283  
 Уорд (Ward L. D.) 604, 605  
 Уорк (Work E.) 427, 439  
 Уоррел (Worrel C. S.) 399  
 Уоррен (Warren F. I.) 288  
 Урбан (Urbán) 26  
 Урбах (Urbach K. F.) 99  
 Уэйгл (Wagle G. L.) 521  
 Уэллер (Weller L. E.) 574  
 Уэлс (Wells R. A.) 127, 681, 699, 703—705, 712  
 Уэндер (Wender S. H.) 614, 615  
 Уэст (West C. B.) 575, 578  
 Уэст (West G. B.) 151  
 Уэстман (Westman A. E. R.) 707, 710  
 Уэстолл (Westall R. G.) 76, 77, 148, 302, 304, 311, 312, 317, 325, 443, 446, 566, 581
- Фабр (Fabre C.) 477  
 Фадерл (Faderl N.) 560—563, 565  
 Фаллаб (Fallab S.) 675  
 Фальк (Falk J. E.) 580  
 Фантес (Fantes K. H.) 624, 629  
 Фарес (Phares E. F.) 242, 243  
 Фардиг (Fardig O. B.) 640  
 Фаррел (Farrel G. L.) 363  
 Фауден (Fowden L.) 434, 437, 440  
 Фаулер (Fowler H. D.) 182  
 Федорова В. Н. 133, 576  
 Фейгль (Feigl F.) 21, 167, 327  
 Феликс (Felix K.) 476  
 Феллеги (Fellegi J.) 185  
 Фельд (Feld U.) 247  
 Фер (Fehr K. L. A.) 505  
 Фернандо (Fernando Q.) 689  
 Фецер (Fetzer W. R.) 166  
 Фиалова (Fialová Z.) 173, 440  
 Филлипс (Phillips D. M. P.) 143, 414, 474  
 Филлипс (Phillips J. D.) 259  
 Филлипс (Phillips J. P.) 689  
 Филлипс (Phillips W. F.) 645, 646  
 Финк (Fink K.) 235, 246  
 Фянк (Fink R. M.) 195, 235, 246, 447  
 Фирон (Fearon W. R.) 415  
 Фишбах (Fischbach H.) 128, 548, 549, 645, 646  
 Фишер (Fischer A.) 208, 210, 214, 572, 579  
 Фишер (Fischer E.) 24, 666, 669  
 Фишер (Fischer F.) 247, 248, 251  
 Фишер (Fischer F. G.) 277, 279—282, 290—292, 438, 767  
 Фишер (Fischer H.) 669  
 Фишер (Fischer R. B.) 182, 274, 434  
 Флавин (Flavin M.) 463  
 Флекенштейн (Fleckenstein A.) 519  
 Флетчер (Fletcher E.) 287  
 Флодин (Flodin P.) 167  
 Флуд (Flood A. E.) 267, 276, 296, 297  
 Флуд (Flood H.) 24, 109, 163, 666, 667  
 Флудгейт (Floodgate G. D.) 251  
 Фокс (Fox S. W.) 401  
 Фомина М. П. 389  
 Фондарэ (Fondarai J.) 585  
 Фонтэн (Fontaine T. D.) 129  
 Форд (Ford J. E.) 624, 625  
 Форман (Foreman E. M.) 414  
 Форрест (Forrest H. S.) 613, 619  
 Форсайт (Forsyth W. G. C.) 177, 268  
 Фортер (Forter W.) 612, 613  
 Форхейер (Vorheier D.) 578  
 Фосдик (Fosdick L. S.) 185  
 Фосетт (Fawcett D. M.) 451, 452  
 Фостер (Foster G. E.) 527, 538, 546, 547  
 Фостер (Foster J. C.) 624  
 Фрайерсон (Frierson W. J.) 195, 197, 201, 202, 207, 208, 700, 704  
 Франк (Franck B.) 649  
 Франкенбург (Frankenburg W. G.) 561  
 Франклин (Franklin A. E.) 499—501, 503  
 Франкс (Franks F.) 139, 590  
 Франц (Franc J.) 78, 82, 83, 301, 377, 397, 591, 600, 637, 660, 775  
 Франц (Franc Z.) 433, 435, 436  
 Фрей-Висслинг (Frey-Wyssling) 101

- Фрейдленберг (Freudenberg K.) 199, 330  
 Френкель-Конрат (Frankel-Conrat H.) 479, 482, 483, 484  
 Френч (French D.) 77, 255, 256  
 Фрёмминг (Frömming K. H.) 377  
 Фридберг (Friedberg F.) 401  
 Фридбергер (Friedberger E.) 24  
 Фридкин (Friedkin M.) 521  
 Фридрих (Friedrich W.) 627  
 Фримэн (Freeman J. H.) 306, 310  
 Фрис (Fries N.) 511  
 Фромажо (Fromageot C.) 434, 486, 490, 491  
 Фронталли (Frontali N.) 245, 248, 249, 250, 763  
 Фрост (Frost A. A.) 186  
 Фудзивара (Fujiwara M.) 609  
 Фудзисава (Fujisawa Y.) 85  
 Фуджита (Fujita H.) 63  
 Фузари (Fusari S. A.) 649  
 Фукс (Fuchs L.) 546, 547  
 Фукусима (Fukushima D. K.) 342  
 Фуллер (Fuller R. C.) 610  
 Фучик (Fučík K.) 170, 212, 328, 534, 536  
 Фюстер (Fewster M. E.) 305  
  
 Хаак (Haack E.) 366, 372, 373  
 Хаберланд (Haberland G. L.) 392  
 Хагдаль (Hagdahl L.) 212, 425  
 Хадсон (Hudson P. B.) 186  
 Хайден (Hayden A. L.) 372  
 Хайс (Hais I. M.) 5, 21, 24, 27, 32, 78, 87, 92, 95, 96, 100, 105, 122, 142, 150, 155, 160, 163, 164, 169, 177, 180, 186, 196, 202, 328, 329, 356, 357, 399, 400, 424, 426, 435, 436, 447, 575, 600, 602, 637, 729, 775  
 Халм (Hulme A. C.) 230, 259  
 Хамада (Hamada M.) 387  
 Хант (Hunt E. C.) 127, 712  
 Харасава (Harasawa S.) 691, 693  
 Харборн (Harborn J. B.) 384  
 Харди (Hardy T. L.) 429, 431  
 Харрис (Harris G.) 268  
 Харрис (Harris J. J.) 458, 479, 483  
 Харрис (Harris L. E.) 379  
 Харрисон (Harrison A.) 199  
 Харрисон (Harrison J. S.) 176, 615—617  
 Харткамп (Hartkamp H.) 696  
 Хасбанд (Husband L. J. B.) 140  
 Хасенмайер (Hasenmaier G.) 377  
 Хасидзуме (Hashizume T.) 563  
 Хасимото (Hashimoto Y.) 186, 247, 522, 530, 534, 595, 761  
 Хаскинс (Haskins A. J.) 342  
 Хаскинс (Haskins F. A.) 209  
 Хаслвуд (Haslewood G. A. D.) 352, 354  
 Хассалл (Hassall C. H.) 153  
 Хатчингс (Hutchings B. L.) 619, 622  
 Хатчинсон (Hutchinson D. J.) 621  
 Хаф (Hough L.) 224, 225, 269, 283, 284, 292, 296  
 Хаяси (Hayashi K.) 316, 325  
 Хевел (Hewel C. A.) 673, 696, 697  
 Хегедюш (Hegedüs H.) 366  
 Хегль (Högl Ö.) 185  
  
 Хед (Head M. J.) 126  
 Хеден (Hedén C. G.) 140  
 Хейзер (Heuser E.) 100  
 Хейл (Hale C. W.) 640, 642  
 Хейл (Hale D. K.) 108, 757  
 Хейман (Heimann W.) 630  
 Хейненен (Heinänen P.) 595, 598  
 Хейнс (Hanes C. S.) 78, 105, 126, 152, 230, 231, 235, 242, 255, 286, 290, 427, 474, 510, 519, 667, 707  
 Хейнс (Haines W. J.) 162, 338  
 Хейнс (Heyns K.) 419, 463  
 Хелльстрем (Hellström B.) 201  
 Хемс (Hems R. I.) 518, 519  
 Херлок (Hurlock B.) 363  
 Хессе (Hesse G.) 25, 26  
 Хёрхаммер (Hörhammer L.) 317  
 Хики (Hickey R. J.) 645, 646  
 Хинмен (Hinman J. W.) 649  
 Хирасе (Hirase S.) 269  
 Хисм (Chism P.) 412  
 Хок (Hock C. W.) 101  
 Хокенхал (Hockenhull D. J. D.) 251, 267  
 Холдсвер (Holdsworth E. S.) 624, 627  
 Холиди (Holiday F. R.) 510, 521, 545  
 Холли (Holley A. D.) 470  
 Холли (Holley R. W.) 470  
 Холман (Holman W. I. M.) 563  
 Холмгрен (Holmgren I.) 23  
 Холмс (Holmes R.) 182  
 Холнесс (Holness H.) 590  
 Холтер (Holter) 98  
 Хомиллер (Homiller R. R.) 464  
 Хоппе (Hoppe W.) 413, 460  
 Хопф (Hopf P. P.) 667  
 Хорешовский (Horešovský O.) 424—426  
 Хорн (Horn M. J.) 466  
 Хорн (Horne R. E., Jr.) 644, 645  
 Хорнер (Horner L.) 75, 228, 346, 422  
 Хоррокс (Horrocks R. H.) 269  
 Хоторн (Hawthorne J. R.) 276  
 Хотчис (Hotchiss R. D.) 512, 514  
 Хрды (Hrdý O.) 372  
 Хуксема (Hoeksema H.) 651  
 Хуммель (Hummel J. P.) 199, 612  
 Хупер (Hooper I. R.) 640  
 Хэдридж (Headridge J. B.) 696, 697  
 Хэлл (Hall D. A.) 305, 499  
 Хэлл (Hall L. P.) 232, 233  
 Хэлл (Hall N. F.) 98, 110  
 Хюбнер (Huebner C. F.) 562  
 Хюбнер (Hübner G.) 523  
 Хюнкекенс (Huennekens F. M.) 612, 616  
  
 Цан (Zahn H.) 394, 663, 664  
 Цвейг (Zweig G.) 5  
 Цвет М. С. 5, 24—27, 182, 602, 603, 666  
 Цейсс (Zeiss O.) 463  
 Цзо (Tso T. C.) 536  
 Церар (Cerar D.) 411  
 Цербан (Zerban F. W.) 269, 273  
 Цербулис (Cerbulis J.) 278, 279  
 Цехмейстер (Zechmeister L.) 32, 210  
 Циммер (Zimmer U.) 392

- Циммерман (Zimmerman G.) 129, 130, 358, 360, 479, 503  
 Цинголани (Cingolani E.) 612  
 Цифонелли (Cifonelli J. A.) 267, 278, 284, 368  
 Цсазар (Csaszár J.) 429
- Чайков (Chaikoff I. L.) 450  
 Чакрабартти (Chakrabarti S.) 697  
 Чакрабортти (Chakraborty H. C.) 142  
 Чакрабортти (Chakraborty K. P.) 450  
 Чаннинг (Channing D. M.) 437  
 Чантрен (Chantrenne H.) 427  
 Чаргафф (Chargaff E.) 268, 415, 427, 508, 509, 512, 515—517  
 Чау (Chow K. Y.) 501  
 Чейн (Chain E.) 290, 519  
 Чекал (Cekan Z.) 377, 379  
 Чемберс (Chambers R. W.) 486  
 Чен (Chen Y. T.) 633  
 Чериотти (Ceriotti G.) 175  
 Черный (Cerný J.) 222, 614, 615  
 Чеше (Tschesche R.) 366, 370—373, 551, 618—620  
 Чжен Тен-Цу (Chien Tien Hsu) 362  
 Чибнелл (Chibnall A. C.) 490  
 Чима (Cima L.) 645  
 Чичестер (Chicherster D. F.) 638  
 Чокли (Chalkley D. E.) 671  
 Чу (Chu E. J.) 581  
 Чу (Chu T. C.) 133, 577, 579—581  
 Чунг (Chung D.) 430, 479, 481
- Шааль (Schaal L. A.) 310  
 Шабика (Shabica A. C.) 521  
 Шамрай (Schamraj E. F.) 137  
 Шамрай (Schamraj M. F.) 629  
 Шанда (Sanda V.) 182, 231, 570, 633  
 Шанкар (Shankar J.) 695  
 Шапиро (Shapiro B.) 248  
 Шарбонье (Charbonier A.) 582  
 Шауэр (Schauer H. K.) 76, 78—80, 566  
 Шаффер (Schaffer N. K.) 460  
 Шваб (Schwab G. M.) 666, 667  
 Шван (Schwan H.) 422  
 Швартинг (Schwarting A. E.) 532, 546  
 Шварц (Schwartz F.) 550  
 Шварц (Schwartz S.) 579  
 Шварц (Schwarz W.) 341  
 Швейерс (Schweers W.) 331  
 Швеппе (Schweppe H.) 232, 237, 258, 262, 292, 307, 389, 759  
 Швердтфегер (Schwerdtfeger E.) 131, 132, 137, 437  
 Шверт (Schwert G. W.) 468, 487  
 Шемякин Ф. М. 167  
 Шенбейн (Schoenbein C. F.) 21, 22, 42, 666  
 Шенк (Schenk G.) 377  
 Шенкер (Schenker E.) 369  
 Шефтель (Cheftel R. I.) 242—244, 246, 247  
 Шёквист (Sjöquist J.) 481  
 Шёнфельд (Schönfeld T.) 89, 196  
 Шид (Schied U.) 479  
 Шиллинг (Schilling J. A.) 92, 403, 435
- Шимек (Šimek J.) 129  
 Шимков Я. П. 433  
 Шимона (Szymona M.) 287  
 Шиндлер (Schindler O.) 367, 369  
 Шихо (Šicho V.) 609, 616, 617  
 Шихофер (Seehofer F.) 366, 371  
 Шлак (Schlack P.) 486  
 Шлегль (Schlögl K.) 136, 221—223, 242, 302, 307, 761, 767  
 Шленк (Schlenk H.) 237  
 Шлюйтерман (Sluyterman L. A.) 414, 428  
 Шмерцлер (Schmerzler G.) 490  
 Шмид (Schmid H.) 541, 542  
 Шмидмер (Schmidmer E.) 24, 666  
 Шмидт (Schmidt F.) 578  
 Шмидт (Schmidt H.) 362, 629, 630, 633  
 Шмидт (Schmidt O. T.) 303, 317, 326  
 Шмитт (Schmitt W.) 227, 229  
 Шнайдер (Schneider H. G.) 649  
 Шнайдер (Schneider J.) 92  
 Шнайдер (Schneider J. J.) 361  
 Шнайдер (Schneider W. C.) 507  
 Шноль (Schnol S. E.) 609  
 Шорм (Šorm F.) 415, 426, 464, 474  
 Шоу (Shaw B. L.) 84, 312  
 Шоу (Shaw G. B.) 627, 628  
 Шоу (Shaw K. N. H.) 401  
 Шпакман (Spackmann P. H.) 470  
 Шпарманн (Sparmann G.) 92  
 Шполер (Spohler E.) 650  
 Шранк (Schränk A. R.) 99, 100  
 Шредер (Schroeder W. A.) 474, 779  
 Шрейер (Schreier K.) 243, 574  
 Штарке (Starke K.) 138  
 Штайнергер (Steinegger E.) 537  
 Штауб (Staub A. M.) 283  
 Штаудингер (Staudinger H.) 103  
 Штаудингер (Staudinger H. J.) 350, 362, 629, 630, 633  
 Штейермарк (Steyermarck P. R.) 340  
 Штейнгардт (Steinhardt J. F.) 467  
 Штейнер (Steiner M.) 384  
 Штих (Stich W.) 580  
 Штолль (Stoll A.) 273, 532, 545, 546  
 Штолль (Stoll Al.) 551  
 Шторп (Storp C. B.) 227, 229, 379  
 Штрассен (Strassen J. E.) 690  
 Штрауб (Straub J.) 696  
 Штраус (Strauss D.) 530  
 Штрибель (Striebel P. R.) 367  
 Штрөмингер (Strominger D. B.) 521  
 Шу (Shu P.) 277  
 Шулл (Shull G. M.) 335, 340, 351  
 Шульте (Schulte K. E.) 227, 229, 379  
 Шульц (Schultz O. E.) 530  
 Шульц (Schulz O. E.) 600  
 Шуте (Schute J. B.) 40, 60, 75, 88, 89, 150, 154, 534  
 Шух (Schuh V.) 174, 628
- Эбель (Ebel J. P.) 707, 710—712  
 Эберлейн (Eberlein W. R.) 228, 344, 345, 346, 362  
 Эбрей (Ebrey P.) 151, 402, 403, 434, 438  
 Эванс (Evans G. G.) 471

- Эверед (Evered F. D.) 443, 444, 446  
 Эггит (Eggitt P. W.) 604, 605  
 Эгглстон (Eggleston L. W.) 518  
 Эдвард (Edward J. T.) 270, 282, 283, 489  
 Эдельман (Edelman J.) 261  
 Эджер (Eger Ch.) 186  
 Эдингтон (Edington R. A.) 280  
 Эдман (Edman P.) 419, 422, 431, 469, 472, 479, 480, 481, 483  
 Эдмондс (Edmonds M. D.) 228  
 Эдстрём (Edström J. E.) 508, 510, 511, 517  
 Эйбрахам (Abracham E. P.) 640, 642  
 Эйген (Eigen E.) 174, 614, 624, 644, 654  
 Эйдингер (Eidinger D.) 260  
 Эйлер (Euler V. S.) 217  
 Экланд (Acland) 49  
 Экман (Ekman B.) 595  
 Элбейн (Elbein I. I. M.) 704  
 Эллиассон (Eliasson R.) 217  
 Эллис (Ellis S.) 212, 213  
 Эллфольк (Ellfolk N.) 411  
 Элмор (Elmore D. T.) 472, 509  
 Эль Гавари (El Hawary M. F. S.) 249, 763  
 Эльке (Elke M.) 519  
 Эме (Oehme F.) 186, 187  
 Энглер (Engler C.) 24  
 Эндрюс (Andrews P.) 295, 296  
 Эофф (Eoff W. H.) 536  
 Эппштейн Я. А. 389  
 Эрбринг (Erbring H.) 131, 542  
 Эрдем (Erdem B.) 429  
 Эриксен (Eriksen L.) 577, 580  
 Эриксон (Ericson L. E.) 619, 625  
 Эрленмейер (Erlenmeyer H.) 677, 681, 697  
 Эрнест (Ernest A.) 26  
 Эрспамер (Erspamer V.) 302, 303, 569, 572, 573  
 Эртель (Oertel G.) 129, 350  
 Эствуд (Eastwood D.) 277  
 Эшби (Ashby D. R.) 363, 365, 603  
 Юденфренд (Udenfriend S.) 203, 471  
 Юльте (Ultée A. J.) 598  
 Юльте (Ultée A.J., Jr.) 99  
 Юнг (Jung Z.) 366  
 Юнг (Young L.) 84  
 Юнг (Young G. T.) 437  
 Юруги (Yurugi S.) 607, 608  
 Ютиш (Jutisz M.) 470, 490  
 Яарма (Jaarma M.) 204  
 Яги (Yagi K.) 611, 613  
 Якобс (Jacobs W.) 561—563  
 Яковиц (Yacowitz H.) 627  
 Якубец (Jakubec I.) 190, 597  
 Ямагита (Yamagita T.) 505  
 Ямагути (Yamaguchi K.) 707  
 Ямагути (Yamaguchi M.) 134  
 Ямада (Yamada Y.) 221, 222, 761  
 Яманиши (Yamanishi T.) 575, 578  
 Яматодани (Yamatodani S.) 638, 642  
 Янда (Janda) 190  
 Янке (Janke J.) 519  
 Янлоз (Jeanloz R. W.) 292, 767  
 Яновский (Yanofsky C.) 217  
 Яцкевич (Jatzkewitz H.) 491

## Предметный указатель

- Абеквоза 272, 283  
Абрин 568, 569  
Автоматическая регистрация 185, 186, 200, 201  
Автоматические вспомогательные устройства 140  
Авторадиография 197, 198, 452  
Агаровая подложка 173, 175, 500, 501  
Агматин 384  
Агроклавин 545, 552  
Адениловая кислота 184, рис. 108, 509, 512—521, 616  
— — мышечная 512, 514  
Аденин 509—520, 617  
Аденинцанкобамид 625  
Аденозин 145, 514—520, 617  
Аденозиндифосфат 515—521  
Аденозинмонофосфат 512—521, 617  
Аденозинполифосфорные кислоты 518—521  
Аденозинтрифосфат 145, 515—521, 614  
Аденокарпин 548  
Адипиновая кислота 245, 246, 394, рис. 130  
Адонит 279  
Адреналин 168, 176, 384, 394  
Адреностерон 346, 359  
Адренохром 168  
АДФ 515—521  
Азасерин 649  
Азетидин-2-карбоновая кислота 441  
Азокармин В 503  
Азокрасители 662, 663  
Азосоединения фенолов 302  
Азосочетание 170, 171, 389—391, 595, 749  
с R-кислотой 395, 398  
N-этил- $\alpha$ -нафтиламина 595  
Азотная кислота 242  
Азулены 377, 378  
Аймалин 543, 544  
Аймалицин 543, 544  
Акацетин 318  
Аконитин 552, 556  
Аконитовая кислота 243, 245—247  
Акрифолин 551  
Активаторы 174, 175  
Активационный анализ 204  
Активность гормонов 176  
Актиний 699  
Актиномицины 638, 646  
Акцепторы протонов 67, 76, 116, 337, 346, 400  
— электронов 114  
Алакреатинин 388  
Аланилаланин 462  
Аланиларгинин 462  
Аланилглицилглицин 463  
Аланилглицин 410, 462, 473  
Аланилглутаминовая кислота 462  
Аланиллейцин 462  
Аланилсерин 462  
N- $\beta$ -Аланилцистеамин 635  
Аланин 81, рис. 39, 134, 145, рис. 105, 250, 263, 291, 400—457, 464, 466  
 $\beta$ -Аланин 408, 409  
Аланинол 491  
Ализарин 664, 676, 679, 680, 682  
Алифатические кислоты 230—253, 722—724, 762—764  
Алифатические спирты 221—226  
Алициклические многоатомные спирты 225, 226  
Алкалоид ЕК 115, 544, рис. 215, 547  
— X 548  
Алкалоиды 527—559, 747, 748, 785, 786  
вератровые 527, 534, 547—550  
группа кокаина 539  
— протоберберина 542  
— тропина 538  
— — определение 786  
— эрготоксина 546, 547  
желтокорня канадского 542  
карболиновые 543—545  
кураре 541  
лобелии 534, 536  
лупиновые 550  
опия 540  
пилокарпиновые 551  
плаунов 551  
систематический анализ 552—557  
спорыньи 133, 527, 529, 532, 533, 545—547, 552, 554, 555  
— гидролиз 786  
— определение 786  
табака 533, 536  
хинной коры 537, 539  
челибухи 551  
чистотела и других маковых 543  
Алкиламины 383—389  
Алкилизотиурониевые соли 598, 599, 787  
Алкилпиридины, окисление 561, 787

- Алкилсульфаты 590  
 Алкилтиомочевины 598, 599, 787  
 Алкоксикислоты 233  
 Аллийн 441  
 Аллиламин 384  
 3-Аллилиндол 569  
 Аллиловый спирт 223  
 5-Аллил-5-фенилбарбитуровая кислота 524  
 Аллитиамин 609  
 Аллобарбитал 524  
 Аллоза 257  
 Аллоизолейцин 648  
 Аллоксан 171, 412  
 Аллометилоза 257  
 Аллооксипролин 401, 417, 441  
 Аллотреонин 401, 409, 424  
 Аллофенилсерин 401  
 Аллоцимарин 367  
 Аллюлоза 257, рис. 135  
 Алое-эмодин 664  
 Альбогептозы 257  
 Альбомуцин 649  
 Альбумин 498, рис. 197  
 Альдегиды 227—229, 722—724  
 Альдобинозные кислоты 293, 294  
 Альдогексозы 254—277  
 Альдогексометилозы 256  
 Альдометилозы 257  
 Альдопентозы 254—277  
 Альдостерон 176, 344, 345, 362  
 Альдотетрозы 256  
 Альдрин 655  
 Альтроза 257  
 Альтрометилоза 257  
 Алюминий  
     изопропилат 769  
     определение 667, 673—677, 679, 685, 686, 689, 693—695, 700, 702, 704, 792  
     хлористый 317, 322, 323, 731  
 Алюминий 679, 682  
 Аметоптерин 621  
 Амилаза 500, 502  
*n*-Амиллизотиурониййодид 599  
 Амиловый спирт 223  
 Амилоза 256  
*n*-Амилфенол 307  
 $\alpha$ -Аминоадипиновая кислота 408, 418, 420, 426, 440, 443, 640  
 4-Аминоантипирин 303  
 Аминоантрахиноны 391  
 Аминобензойные кислоты рис. 75, 392, 565, 606  
*n*-Аминобензолсульфамид, производные 595  
 $\delta$ -Аминовалериановая кислота 408, 409, 420, 439  
*n*-Аминогиппуровая кислота 269, 727  
 $\alpha$ -Аминодиметиланилин 269  
 $\alpha$ -Амино- $\beta$ ,  $\beta$ -диметил- $\gamma$ -оксимасляная кислота 439  
 3-Амино-1,8-диметилфеноксазон-(2)-4,5-дикарбоновая кислота 649  
 2-Амино-4,7-диоксиптеридин-6-альдегид 620  
 2-Аминодифениламин 389, 391  
 4-Аминодифениламин 391  
 4-Амино-3-изоксазолон 649  
 $\alpha$ -Аминоизомасляная кислота 408, 409, 428  
 $\beta$ -Аминоизомасляная кислота 418, 420, 428, 430, 443, 445, 446  
 2-Амино-3-(индолил-3)-пропанол-1 567  
 $\alpha$ -Аминокaproиловая кислота 408, 409  
 $\epsilon$ -Аминокaproновая кислота 394, 408, 409, 428  
 3-Амино-3-карбоксипропилдиметилсульфоновая соль 441  
 Амино- $\tau$ -кислота 592  
 Амино- $\epsilon$ -кислота 592  
 Аминокислоты 250, 400—457, 528, 740, 773, 778, 779  
     в других продуктах обмена 446, 447  
     в крови 442—444  
     в моче 443—446  
     в растительном материале 439—441  
     в тканях 444  
     галоидированные 447—452  
     микроорганизмов 439  
     определение 774—778  
     свободные, в животном организме 441—447  
 $\alpha$ -Аминомасляная кислота 145, 400—457, 464, 466  
 $\gamma$ -Аминомасляная кислота 400—457  
 1-Амино-2-метилантрахинон 369  
 $\gamma$ -Амино- $\beta$ -метилемасляная кислота 440  
 4-Амино-10-метилптеридиновая кислота 622  
 Аминонафтолсульфокислоты 594  
 2-Амино-3-оксибензойная кислота 393  
 2-Амино-5-оксибензойная кислота 393  
 3-Амино-2-оксибензойная кислота 393  
 3-Амино-4-оксибензойная кислота 393  
 3-Амино-5-оксибензойная кислота 393  
 4-Амино-2-оксибензойная кислота 393  
 4-Амино-3-оксибензойная кислота 393  
 $\gamma$ -Амино- $\alpha$ -оксимасляная кислота 440  
 2-Амино-4-оксиптеридин 620, 621  
 2-Амино-4-оксиптеридин-6-овая кислота 620  
 2-Амино-4-оксиптеридин-7-овая кислота 620  
 2-Амино-4-окси-6-оксиметилптеридин 620  
 2-Амино-4-оксиптеридин-6-альдегид 620  
 2-Амино-4-окси-6-(1',2'-диоксипропил)-птеридин 620  
 2-Амино-4-окси-6-(диоксиэтил)-птеридин 620  
 2-Амино-4-окси-6-(тетраоксибутил)-птеридин 620  
 2-Амино-4-окси-6-(триоксипропил)-птеридин 620  
 4-Аминопентен-2-овая кислота 410  
 $\alpha$ -Аминопимелиновая кислота 408, 428  
 2-Аминоптеридин 621  
 4-Аминоптеридин 621  
 6-Аминоптеридин 621  
 Аминоптерин 622  
*n*-Аминосалициловая кислота 392, 393  
 5-Аминсалициловая кислота 391, 392

- Аминосахара 265, 290—292  
 дезаминирование 767  
 Аминоспирты 385, 490, 491  
 6-Амино-2-тиоурацил 521  
 2-Амино-4,6,7-триоксиптеридин 621  
 о-Аминофенол 269, 727  
 Аминофенолы 391—393  
 α-Амино-α-этилмасляная кислота 430  
 Амины 382—396, 737—740, 772  
 алифатические 383—389  
 ароматические 389—394  
 Амитал 524  
 Амицетил 645, 649  
 Амелин 587  
 Аммиак рис. 159, 322, 701, 702  
 Аммоний 386, 672, 697, 698  
 ванадат 243, 317, 732  
 молибдат 225, 243, 265, 286, 287, 710, 728  
 сульфид 678, 679, 682, 701  
 АМФ 512—521, 616  
 Анабазин 536, 537  
 Анагирин 548, 550  
 Анализ Цвета 24  
 Ангемидин 329  
 Ангидролейковрин 623  
 Δ<sup>1,4</sup>-Андростадие-3,17-дион 359  
 Δ<sup>1,4</sup>-Андростадие-17β-ол-3-он 359  
 5α-Андростан-3α,17β-диол 359  
 5α-Андростан-3β,17α-диол 359  
 5α-Андростан-3β,17β-диол 359  
 5β-Андростан-3α,17α-диол 359  
 5β-Андростан-3α,17β-диол 359  
 5α-Андростан-3α,17β-диол-16-он 359  
 5α-Андростан-3β,5-диол-17-он 359  
 5α-Андростан-3,17-дион 339, 340  
 5α-Андростан-3β-ол-16,17-дион 359  
 5β-Андростан-3α-ол-11,17-дион 359  
 5β-Андростан-17β-ол-3,11-дион 359  
 5α-Андростан-3α-ол-17-он 336  
 5α-Андростан-3β-ол-17-он 336, 348  
 5α-Андростан-17β-ол-3-он 359  
 5β-Андростан-3α-ол-17-он 336, 348, 359  
 5β-Андростан-17β-ол-3-он 359  
 5α-Андростан-3β, 16α,17β-триол 359  
 5β-Андростан-3β,11α, 17α-триол 359  
 Δ<sup>5</sup>-Андростен-3β,17α-диол 359  
 Δ<sup>5</sup>-Андростен-3β,17β-диол 359  
 Δ<sup>5</sup>-Андростен-3β,17β-диол-16-он 359  
 Δ<sup>4</sup>-Андростен-3,16-дион 350  
 Δ<sup>4</sup>-Андростен-3,17-дион 336, 339, 340, 350  
 Δ<sup>4</sup>-Андростен-3,17-дион-6α-ол 359  
 Δ<sup>5</sup>-Андростен-3β-ол-7,17-дион 359  
 Δ<sup>4</sup>-Андростен-6β-ол-3,17-дион 359  
 Δ<sup>9</sup>-5β-Андростен-3α-ол-17-он 359  
 Δ<sup>5</sup>-Андростен-3β-ол-17-он 336, 348  
 Δ<sup>5</sup>-Андростен-3β, 16α, 17β-триол 359  
 Андростана производные 336, 344, 358—360  
 Андростерон 336, 339, 340, 359  
 Андростерон-3β 359  
 Анестезин 393  
 n-Анизидин 269, 278, 284, 501, 728  
 Анизол 376  
 Анилин 390  
 Анилин  
 кислый оксалат 268  
 кислый фталат 265, 268, 269, 270, 277, 280, 284, 290, 510, 726  
 Анилин — дифениламин — фосфорная кислота 269, 727  
 Анилиновые красители 662  
 Анионы 706—713  
 Анисовый альдегид 330, 368  
 Аннотин 551  
 Аннотинин 551  
 Ансерин 446  
 Антибиотики 637—652, 753  
 Антигены 505  
 Антимицины 649  
 Антирринин 325  
 Антоцианидин 316, 325  
 Антоцианы 310, 313, 316, 325  
 Антрагалол 664  
 Антралоновый оранжевый 663, 664  
 Антралиловая кислота 305, 392  
 Антрахинондисульфокислоты рис. 219  
 Антрахиноновые красители 663  
 Антрахинонсультфокислоты рис. 219, 594  
 Антраценсульфокислоты 594  
 Антрон 265, 268, 277, 726, 765  
 Антроновые производные 663  
 Апигенидин 325  
 Апигенин 318—319  
 Апигенин-7-глюкозид 318—319  
 Апигенин-7-рамноглюкозид 318—319  
 Апоморфин 163, 537, 540, 552, 555  
 Арабиноза 254—277  
 Арабинозо-5-фосфат 289, 290  
 Арабит 279  
 Арабаскорбиновая кислота 632  
 Аралкиламины 394  
 Арахидоновая кислота 234, рис. 128  
 Аргинилаланин 462  
 Аргинилгликокол 462  
 Аргинилглутаминовая кислота 462  
 Аргиниллейцин 462  
 Аргинилтирозин 462  
 Аргинилтриптофан 462  
 Аргинилфенилаланин 462  
 Аргинин 134, рис. 96, 400—457, 466  
 разложение 95  
 Аргининол 491  
 Ареколин 552  
 Арилметаны 172  
 Арилоксиуксусные кислоты 302, 330, 307  
 Арицин 544  
 β-Ароилпропионовые кислоты 376  
 Ароматические кислоты 301—333, 729—733  
 Арсенаты 708, 709, 711  
 Арсениты 708, 709, 711  
 Аскорбиген 146, 571, 572, 567, 569, 574, 629, 632, 634  
 Аскорбиновая кислота 182, 303, 430, 431, 629—634  
 ацетонид 632  
 определение 790  
 Аспарагилгликокол 462  
 Аспарагилглутаминовая кислота 462  
 Аспарагилцистеиновая кислота 462

- Аспарагин 400—457  
 Аспарагиновая кислота 81, 134, 151, рис. 105, 250, 263, 400—457  
 Аспардиол 491  
 Ассоциация веществ 87, 151  
 Атмосфера камеры 136, рис. 195, 503  
 Атраяол 331  
 Атропин 528, 529, рис. 211, 534, 537, 538, 552, 555  
 АТФ 515—520  
 Ауранетин 318—319  
 Ауреомицин 645, 646  
 Ауреотрицин 638  
 Ауреузин 322  
 Ауроны 310, 322, 323  
 Ацетальдегид 228, 229  
 Ацетальфосфолипиды (см. плазмалогены) 239, 240  
 Ацетамидофенол 393  
 2-Ацетамино-2-оксибензойная кислота 393  
 2-Ацетамино-3-оксибензойная кислота 393  
 2-Ацетамино-5-оксибензойная кислота 393  
 3-Ацетамино-3-оксибензойная кислота 393  
 3-Ацетамино-4-оксибензойная кислота 393  
 4-Ацетамино-3-оксибензойная кислота 393  
 Ацетанилид 395  
 Ацетат 667, 708  
 Ацетат меди — родамин 590, 750  
 Ацетат меди — ферроцианид калия 236, 722  
 N-Ацетилацетальфосфолипид 239  
 Ацетилацетон 669, 729  
 Ацетилгитоксин 371  
 N-Ацетилглюкозамин 291  
 Ацетилдигитоксин 367, 371  
 Ацетилдигоксин 371  
 N-Ацетилиндоксил 568, 569  
 N-Ацетилиндолилацетон 569  
 N-Ацетилиндолилбутенон-3 569  
 Ацетилкоферменты А 617  
 Ацетил- $\beta$ -метилхолин 386  
 Ацетилсалицилоилхолин 386  
 N-Ацетилтриптамин 569  
 N-Ацетил- $i$ - $\alpha$ -дистеароилцефалин 239  
 Ацетилхолин 176, 386  
 Ацетилхолина йодид 386  
 Ацетилцеллюлоза 212, 213  
 N-Ацетил-N-этилтриптамин 569  
 o-Ацетоацетил-4-метилфенол 384  
 o-Ацетоацетилфенол 384, 737  
 Ацетованилон 332  
 Ацетовратрон 331, 332  
 Ацетогваякон 331  
 3 $\beta$ -Ацетоксиналлоэтиановая кислота 355  
 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Ацетоксинандростен-16-он 350  
 3 $\beta$ -Ацетокси-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -дибромандростан-17-он 350  
 3 $\beta$ -Ацетокси-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -дибром-5 $\beta$ -холестан 350  
 3 $\alpha$ -Ацетокси-12-кетохоленовая кислота (5) 355  
 5-Ацетоксиметилфураноптеридин 620  
 3 $\beta$ -Ацетоксинорхоленовая кислота (5) 355  
 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Ацетокси-25-норхолестен-25-он 350  
 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Ацетоксипрегнен-20-он 350  
 3 $\beta$ -Ацетоксиэтиленовая кислота(5) 355  
 Ацетон 228, 229  
 7-Ацетонилксантоптерин 620  
     диацетат 620  
 Ацетосирингон 331  
 Ацетоуксусная кислота 245, 398  
 Ацетоуксусный эфир 722  
 Ацилкоферменты А 617  
 Ацилфосфорные эфиры 235  
 Аэроспорины 646, 790  
 Байкалеин 318—319  
 Байкианин 418, 420, 428, 441  
 Барбитал 524  
 Барбитураты 522—524  
 Барий 667, 675, 681, 685, 686, 689, 696, 697, 702, 705  
 Бацитрацины 646  
 Белки 497—505  
     плазмы крови 499, 505  
     строение 465—494  
     удаление 92, 93, 403, 763, 764, 773  
 Белковые вещества 743—745  
 Бензальдегид 330  
 Бензалькумараноны 322  
 o-Бензамидофенол 393  
 Бензидин 169, 265, 277, 278, 284, 330, 389, 391, 503, 536, 564, 573, 654, 657, 676, 678, 680, 701, 733, 755  
     бис-диазотированный 302, 303, 317, 730  
 Бензидин — перекись водорода 745  
 Бензил 331  
 Бензиламин 384  
 N-Бензилглюкозиламины 273, 765  
 Бензилкумараноны 322  
 Бензилпенициллин 639  
 Бензилэгонин 539  
 Бензимидазол 577  
 Бензоилацетон 669  
 7-( $\gamma$ -Бензоилокси)-ацетонилксантоптерин 620  
 Бензоил хлористый 340  
 Бензоилхолин 386  
 Бензоилэгонин 537  
 Бензойные кислоты 37, 245, 305  
 Бензол 376  
 Бензолсульфокислоты 594  
 Бензотендроновая кислота 329  
 n-Бензохинон 302, 385, 737  
 3,4-Бензипрен 377  
 Берберин 542, 552, 554  
 Бергаптен 329  
 Бериллий 671, 676, 682, 688, 695, 696, 699  
 Биливвердин 582  
 Билицурпурин 582  
 Билирубин 582  
 Биоавтография 174—176, 416, 511, 616, 624, 628, 639

- Биотин 606, 615  
 ε-N-Биотиниллизин 615  
 Биотинсульфоокиси 615  
 Биоцитин 615  
 2,3'-Бипиридил-2',3-дикарбоновая кислота 565  
 2,3'-Бипиридил-3-карбоновая кислота 565  
 Биспартион рис. 235  
 Бойвиноза 367  
 Борат 709  
 Борная кислота 267, 278, 279, 324  
     комплексы 258, 267, 310, 312, 534, 548  
 Брадикинин 176  
 Брассидиновая кислота 234  
 Брассикастерол 365  
 Бром 380, 701, 743  
     Br<sup>82</sup> 198, 204, 205  
     Br<sup>81</sup> 204, 205  
 Бромат 703, 709  
 Бромид 708, 709  
 5-Бромизатин 413  
 4(5)-Бромимидазол 577  
 Бромирование 390, 773  
 Бромкрезоловый зеленый 394, 639, 664, 720  
 Бромкрезоловый пурпурный 232, 276  
 Бромкрезоловый синий 267  
 4β-Бром-5β-прегнан-17α,21-диол-3,11,20-трион-21-ацетат 348  
 N-Бромсукцинимид 656  
 N-Бромсукцинимид—флуоресцен 755  
 Бромтимоловый синий 232, 242, 664, 707, 720  
 Бромфеноловый синий 242, 278, 503, 509, 535, 549, 562, 664, 720  
 Бромфеноловый синий — борная кислота 726  
 Бромфеноловый синий — двухлористая ртуть 744  
 Бруцин 551, 552, 556  
 Бумага 100—110  
     ацелированная 109, 758  
     — частично 109  
     вес 103, 104  
     весовая характеристика 104  
     всасывающая способность 104  
     гидрофобная 107, 258  
     для препаративных целей 107  
     для стандартных анализов 107  
     для ускоренного анализа 107  
     емкость 103, 107, 117  
     загрязнения 104, 105, 151—153, 178  
     зольность 104  
     из стеклянного волокна 110  
     модифицированная 107  
     направление движения на вальцах 107  
     насыщение 116—117  
     обугливание 167  
     отмытая 107  
     производство 102  
     промывание 103, 144  
     пропитанная 153, 155, 688, 683  
     — бурой 332  
     — буферными растворами 332  
     пропитанная гидроокисью алюминия 24, 351, 667, 758  
     — ионитами 108, 689, 757  
     — парафиновым маслом 350  
     — раствором бромистого цетилтриметиламмония 109  
     — сульфитом натрия 332  
     пропитка 117, 118, 153, 349, 350, 758, 759, 780  
     разрезанная 712  
     свойства 102  
     содержание азота 104  
     сорбция жидкости 101, 102  
     сравнение сортов 105—107  
     толщина 103  
     элюирование 177—179  
     этерифицированная 109  
 Бутандиолы (бутиленгликоли) 223  
 Бутанон 228  
 1,2,4-Бутантриол 223  
 Бутен 320—321  
 n-Бутиламин 383—385  
 5-(втор-Бутил)-5-бромаллилбарбитуровая кислота 524  
 n-Бутилглюконид 599  
 n-тет-Бутилфенол 306, 307  
 Бутин 320—321  
 Бутиральдегиды 228, рис. 125  
 Бутирилхолин 386  
 Бутоформ 393  
 Буфовиридин 569  
 Буфотенидин 569  
 Буфотенин 568, 569  
 Буфотионин 569  
 Валериановая кислота 234, рис. 127  
 Валилглицин 463, 467  
 Валилглутаминовая кислота 463  
 Валициотеиновая кислота 463  
 Валин 134, 144, 145, 251, 291, 400—452, 648  
 Валинол 491  
 Валларотоксин 371  
 Ванадаты 794  
     определение 794  
 Ванадий 671, 630, 693, 694, 703, 705  
 Ванадил 667, 696  
 Ванилин 303, 305, 317, 324, 330—332, 389, 732, 742  
 Ванилин — хлорная кислота 278  
 Величина  $R_f$  53—56, 141—150, 687—689  
     влияние различных факторов 143—149  
     — pH 86, 87  
     — структурной формы фуранозы 256  
     — функциональных групп 75—79  
     воспроизводимость 141, 148  
     измерение 142, 143  
     — на колонке 214, 215  
     определение 142, 143  
     связь между строением и  $R_f$  254—258, 338, 366, 458, 459  
 Величина  $R_M$  78  
 Величина пробы 97  
 Вератрамин 548

- Вератридин 548, 552, 556  
Вератрин 550  
Вератровый альдегид 331, 332  
3-Вератроилверацевин 549  
Вератрол 376  
Верацевин 528, 548, 549, 552, 554  
Веродиген 372, 373  
Веронал 523, 524  
Ветивазулен 378  
Вещества, используемые для местной анестезии 392  
Вещество С 567, 569  
Вибурнит 226  
Винкамин 552, 556  
Винная кислота 81, 243—246, 263  
Виолуровая кислота 677, 681  
Вирус табачной мозаики 497  
Висмут 667, 671, 675, 676, 679, 685, 688, 690—692, 700, 701, 706, 794  
   $\text{Bi}^{210}$  202  
    определение 794  
Витамин А 363, 603  
  —  $\text{B}_1$  606—610  
  —  $\text{B}_2$ , см. рибофлавин  
  —  $\text{B}_6$  174, рис. 229, 614  
  —  $\text{B}_{12}$  623—629, 752  
  — — факторы 624, 625, 628  
  — С 629—633  
  — D 363—365  
  — Е 603  
  —  $\text{K}_1$  605  
  — —, 2,3-окись 605  
  —  $\text{K}_2$  605  
Витамины 602—634, 751—753, 788—790  
Влияние промасливания бумаги 184  
Вогонин 318—319  
Вода набухания 75, 101  
Водород 667  
   $\text{H}^3$  198, 203  
    роданистый 670  
Водородный мостик 66, 67, 74, 83, 112, 311, 312, 336, 338, 570  
Волемит 279  
Вомидин 551  
Воспроизводимые величины  $R_f$  141, 142, 148  
Восстановительное метилирование 484  
Восстановление  
  аминокислот 490, 784  
  белков 490  
  ДНФГ 248, 250  
  нитрогруппы 740  
Вспомогательные устройства автоматические 140  
Вульпиновая кислота 316  
Высокочастотные измерения 186, 187, 192  
Высота теоретической тарелки 55  
Вытеснительное проявление 26, 43, 57—59, 155  
  — — с носителем 59  
Вязкость смеси растворителей 137  
Гадолиний 699  
*d*-Гала-*l*-глюкоза 257  
*d*-Галакталь 283  
Галактан 256  
Галактоза рис. 40, 216, 296  
Галактозамин 291, 292  
Галактоманнан 296  
Галактометилоза 257  
*d*-Галактоновая кислота,  $\gamma$ -лактон 281  
Галактуроновая кислота 257, 272, 279, 282, 290  
*d*-Гала-*l*-манноза 257  
Галангин 318—319  
Галегин 535  
Галлацетофенон 680, 702  
Галлий 676, 682, 699  
Галловая кислота 304, 305, рис. 140, 326  
3-Галлоилглюкоза 326  
6-Галлоилглюкоза 326  
*l*-Галлокатехин 326  
*dl*-Галлокатехин 326  
*l*-Галлокатехингаллат 326  
Галлотанин 680  
Галогены 707, 708  
Галогидрирование 762, см. Хлорирование  
Галлоидзамещенные жирные кислоты 234, 237, 238  
Галофлуория 170  
Галохромия 170  
Гамамелитанин 326  
Гафний 699  
Геамин 649  
Гексаметилендиамин 394  
1-Гексанол 223  
Гексахлорциклогексан 204, 655  
*n*-Гексилальдегид 228, рис. 125  
Гексиламин рис. 158, 159  
Гексобарбитал 524  
Гематомовая кислота 311  
Гематопорфирин 579  
Гемин 579  
Геминный комплекс 503  
Гемоглобин 505  
Генетическая связь веществ 136  
Генины стероидных гликозидов 366—373  
Генистеин 548, 550  
Генкванин 318—319  
Гентизиновая кислота 309, 310  
Генциановый фиолетовый 501  
Генциобиоза 272  
Геомицины 646  
Гепарин 293  
Гептадеканон-2 228  
1-Гептанол 223  
Гептанон-4 228  
Гептахлорциклогексан 655  
*n*-Гептилальдегид 228  
*n*-Гептиламин 384  
Германий 699  
Гермин 548, 552, 554  
Гермитрин 548  
Герниарин 329  
Героин 552  
Гесперетин 320—321  
Гесперетин-7-глюкозид 320—321  
Гесперидин 320—321  
Гесперидинметилхалкон 320—321  
Гетероауксин, см. индолил-3-уксусная кислота

- Гетерофиллин 544  
 Гиацин 325  
 Гидантоины 585  
 Гидразиды кислот 235  
 Гидразин 330, 386, 733, 762  
 Гидразинолиз 488, 783  
 Гидразоны Жирара 228, 229  
 Гидрастин 542, 552, 557  
 Гидрастинин 542, 552, 554  
 Гидрогенизация 464  
 Гидроксамова проба 727  
 Гидроксамовые кислоты рис. 77, 229, 233, 234, рис. 127, 246, 616, 617, 643, 762  
     определение 790  
     стероидные эфиры 363  
 Гидроксиламин 386  
 Гидролиз щелочной алкалоидов спорыньи 786  
 — — нуклеиновых кислот 508, 509  
 — — пептидов 405  
 — — полисахаридов 767  
 — — углеводов 260, 261, 287, 293  
 Гидролиз 466—468, 547, 764, 778, 784, 785  
     ДНФ-производных 474, 781  
     ферментативный 467, 764  
     частичный 467  
     щелочной 466  
 Гидросульфитные реактивы, см. гидросульфит натрия  
 Гидротропные реактивы 345  
 Гидрофильные вещества 114—116  
 — группы 119  
 — растворители 114, 121  
 Гидрофобные вещества 118  
 — группы 119  
 — растворители 114, 121  
 Гидрохинон, диметиловый эфир 376  
 Гидратцеллюлоза 212, 262, 760  
 Гиосциамин 538  
 Гипафорин 568, 569  
 Гиперин 318—319  
 Гипнофер 524  
 Гипобромит 563  
 Гипоксантин рис. 202, 514—515, 517  
     дезоксирибозид 514  
     цианкобамид 625  
 Гипохлорит 387  
 Гишуровая кислота 305, 443  
 Гирсутидин 325  
 Гирсутидин-3-глюкозид 325  
 Гирсутидин-3,5-диглюкозид 325  
 Гирсутин, см. 3,5-диглюкозид гирсутидина  
 Гистамин 151, 176, 384, 408, 409, 410, 416, 418, 424, 575—578  
 Гистепс 524  
 Гистидиллейцин 462  
 Гистидин 81, 575, 577  
 Гистидинол 491  
 Гиталоксин 372, 373  
 Гитогенин 372  
 Гитоксигенин 366, 371  
 Гитоксин 366, 367, 371, 372  
 Гиторин 366, 371  
 Гликали 270, 282, 283  
 Гликодезоксихолевая кислота 354  
 $\alpha$ -Гликозидаза 501  
 $\beta$ -Гликозидаза 501  
 Гликозидные связи 257  
     влияние на величину  $R_f$  256—257  
 Гликозиды рода *Strophanthus* 309  
 Гликозиды 366—373, 551, 568, 600  
     — сердечные 366—372  
 Гликокол 73, рис. 39, 134, 144, 145, рис. 105, рис. 112, 250, 263, 459, 466  
 Гликоконваллозид 371  
 Гликоли 223, 224  
 Гликохеирилин 600  
 Гликохенодезоксихолевая кислота 354  
 Гликохолевая кислота 353, 354  
 Гликоциамидин 388  
 Гликоциамин 388  
 Глюкисоловая кислота 245, 250  
 Глицеральдегид-3-фосфат 289  
 Глицериды 238  
 $l$ - $\alpha$ -Глицерилфосфорилхолин 239  
 Глицерин 223, рис. 124, 224, 279  
 Глицериновая кислота рис. 105, 245, 263  
 Глицерин-1-фосфат 288, 289  
 $\beta$ -Глицеринофосфорная кислота 239  
 Глицилаланилглицин 463  
 Глицилаланин 462  
 Глициларгинин 462  
 Глициласпарагиновая кислота 462  
 Глицилвалин 463, 467  
 Глицилглициллейцин 463  
 Глицилглицин 424, 430, 462  
 Глициллейцин 410, 462  
 Глицилоксипролин 462  
 Глицилпролин 462  
 Глицилтирозилглицин 463  
 Глицилтирозин 462  
 Глицилтриптофан 410, 462  
 Глицилфенилаланин 462  
 Глобин-Zn-инсулин рис. 200  
 Глобулин рис. 197  
 Глутадиол 491  
 Глутамиларгинин 462  
 Глутамилгистидин 462  
 Глутамилфенилаланин 462  
 Глутамилцистеиновая кислота 462  
 Глутамин 400—452  
 Глутаминовая кислота 85, 134, 151, 204, 250, 263, 400—452  
 Глутаровая кислота 245  
 Глутатион 410, 418, 420, 424, 427, 428, 430, 443, 445, 609  
 $d$ -Глюкаль 283  
 Глюкогаллин 326  
 $d$ -Глюкогептоновая кислота,  $\gamma$ -лактон 281  
 $d$ -Глюко- $d$ -гулоза 257  
 Глюкоза 151, рис. 76, рис. 107, 277, 279, 282, 285, 430  
 Глюкозамин 272, 291, 384, 409, 410, 420, 421, 424, 430  
 Глюкозаминовая кислота 291  
 Глюкозо-1-фосфат 287—289, 501, 518, 520  
 Глюкозо-4-фосфат 289

- Глюкозо-6-фосфат 287—289, 518  
 Глюкозофосфат 389  
 Глюкометилоза 257  
 Глюконовая кислота 245  
    $\gamma$ -лактон 281  
    $\delta$ -лактон 281  
 Глюкурон 272, 279, 282  
 Глюкуроновая кислота 151, 245, 257, 272, 279, 281, 282  
 Голаррессимин 551  
 Голокаин 393  
 Гоматропин 529, рис. 211, 538, 552, 555  
 Гомогентизиновая кислота 309  
 Гомосерин 250, 418, 420, 424, 430, 439, 441  
 Гомоцистеин 412, 427, 430, 432  
 Гомоцистеиновая кислота 409  
 Гомоцистин 430  
 Гомоэриодиктиол 320—321  
 Горное солнце 162  
 Госсипетин 318—319  
 Госсипин 318—319  
 Госсипитрин 318—319  
 Гостин 551  
 Гостокаин 393  
 Градиент емкости 60, 62  
   — концентрации 59, 498, 499, 503  
 Градиентное проявление 59—62, 138, 139  
 Грамин 552, 555, 567, 569  
 Грамицидин С 649  
 Грамицидины 646  
 Гризезин 638  
 Групповая константа 78—80, 119, 337, 338, 527, 528, 566, 570, 571  
 S-Гуайазулен 378  
 Se-Гуайазулен 378  
 Гуанидин 387  
   производные 387—389  
 Гуанидиновые кислоты 387, 388  
   лактамы 387  
 Гуанидоаминокислоты 388  
   лактамы 388  
 Гуанидиномасляная кислота 420  
 Гуаниловая кислота 512—517, 520  
 Гуанилсерин 387  
 Гуанин 508, рис. 202, 511, 514—517  
 Гуаниндезоксирибозид 514—516  
 Гуанозин 514—517  
 Гуанозиндифосфат 521  
 Гуанозинмонофосфат 512—517, 520  
 Гуанозинтрифосфат 521  
 d-Гуло-*l*-галактоза 257  
 Гулоза 257, 272  
 Гулометилоза 257  
 d-Гуло-*l*-галактоза 257  
 Гулурон 279  
 Гулуруновая кислота 279, 281
- Дала кислота 592  
 Дамасценин 535  
 Дафнетин 329  
 Дважды меченные производные 203  
 ДДТ 204, 655  
 ДДЭ 655  
 ДЕАЕ-целлюлоза 504, 760  
 Дегалогидирование 449
- $\Delta^9(11)$ -Дегидроандростерон 349  
 Дегидроаскорбиновая кислота 629—633  
 Дегидробуфотенин 569  
 $\Delta^9(11)$ -Дегидродезоксикортикостерон 349  
 Дегидроизогермин 548  
 11-Дегидрокортикостерон 338, рис. 148  
 Дегидро- $\alpha$ -матридины 550  
 4,5-Дегидропибеколиновая кислота (бай-кианин) 418, 420, 428, 441  
 $\Delta^9(11)$ -Дегидропрогестерон 349  
 Дегидрохлорамфеникол рис. 163  
 Дегидрохолевая кислота 342, 354  
 7-Дегидрохолестерин 365  
 Дегидроэпиандростерон 339, 340, 342, 350  
 Дегидроэпиандростеронацетат 350  
 Дегидроэпиандростеронглюкуронид рис. 146  
 Дегидроэпиандростеронсульфат рис. 146  
 6-Дегидроэстрон 357  
 Деаминаза аденозина 502  
 Деаминарование аминокислот 431, 469, 779  
   — аминокислот 292, 767  
 Деацетилдезглицоланатозиды 366, 370  
 Деацетилланатозиды 366, 370, 371  
   определение 772  
 Деэгликоланатозиды 366  
 Дезоксиадениловая кислота 515  
 Дезоксиаденозин 514, 516  
 2-Дезоксигалактоза 283  
 2-Дезокси-*d*-глюкоза 283  
 Дезоксигуаниловая кислота 515  
 Дезоксигуанозин 514, 516  
 Дезоксиинозин 514, 516  
 Дезоксикинурины 85  
 Дезоксикортикостерон 336, 339, 340, 349  
 Дезоксикортикостеронацетат 339  
 Дезоксиметилпентозы 283  
 Дезокси-5-метилцитидин 514—515  
 Дезоксинуклеозиды 516  
 11-Дезокси-17 $\alpha$ -оксикортикостерон рис. 147  
 Дезоксирибоза 272, 283  
 Дезоксирибонуклеиновая кислота 507, 784  
 Дезоксисахара 265, 270, 282—283  
 Дезоксипуредин 514—515  
 Дезоксихолевая кислота 340, 341, 353—355  
 Дезоксицитидиловая кислота 515  
 Дезоксицитидин 514—516  
 Дезтиобiotин 615  
 Дейтеропорфирин 577, 579  
*n*-Деканал 228  
 Декарбоксилирование аминокислот 490, 784  
 Декстран 256  
 $\alpha$ -Декстрин—йод 238, 723  
 Декстротриоза рис. 107  
 Дельфин 325  
 Дельфин-3-глюкозид 325  
 Дельфинидин 325  
 Дельфинидин-3-галактозид 325  
 Дельфинидин-3-глюкозид 325  
 Дельфинидин-3,5-диглюкозид 325  
 Демекольцин 552, 557

- Десерпидин 543, 544  
 Десорбция 499  
 Десульфирование 464  
 Деклорирование 654, 655, 755  
 Дециловый спирт 223  
 N-Диазоацетил-*l*-серин 649  
 Диазореактив 582  
 Диазотирование 170, 171, 398, 576, 749  
 — на бумаге 739  
 Диазотированная нафтионовая кислота 302  
 Диазотированный *n*-аминоацетанилид 607  
 — 1-амино-4-бензоиламидо-2,5-ди-этоксibenзол 324  
 — 4-амино-3,6-диметокси-4'-нитро-азобензол 324  
 — *o*-дианизидин 751  
 —  $\alpha$ -нафтиламин 302  
 — 5-нитро-2-аминоанизол 324  
 — *n*-нитроанилин 302, 303, 328, 394, 572—573, 576, 594, 729  
 — *n*-нитробензолазодиметоксианилин 343, 735  
 — сульфаниламид 576, 729—730  
 Диализ крови и тканей 769  
 5,5'-Диаллилбарбитуровая кислота 524  
 Диал 524  
 1,4-Диаминобутан 384, 428  
 1,6-Диаминогексан 384  
 $\beta$ , $\epsilon$ -Диаминокапроновая кислота 649  
 $\alpha$ , $\gamma$ -Диаминомасляная кислота 418, 420, 424, 428, 649  
 1,2-Диамино-4-нитробензол, производные 251  
 $\alpha$ , $\epsilon$ -Диамино- $\beta$ -оксиимелиновая кислота 439  
 1,5-Диаминопентан 384, 428  
 $\alpha$ , $\epsilon$ -Диаминоимелиновая кислота 410, 418, 420, 426, 428  
 1,3-Диаминопропан 384  
 $\alpha$ , $\beta$ -Диаминопропионовая кислота 649  
 2,4-Диаминоптеридин 621  
 2,4-Диамино-1,3,5-триазины 586  
 1,2-Диаминоэтан 384  
*o*-Дианизидин диазотированный 751  
 — тетраазотированный 324  
 Диастаза 261  
 Диацетил рис. 125  
 Диацетилмоноксим — двухлористый никель 386  
 Диацетилморфин 537, 552  
 Диацетил- $\alpha$ -нафтол 644, 753  
 3,16-Диацетилцевагенин-*C*-ортоацетат 549  
 3,16-Диацетилцевин 549  
 Диацетон-2-кето-*l*-гулоновая кислота 632  
 Диазинон 657  
 Дибензилы 312  
 3,16-Дибензоилцевин 528  
 Дибромтирозин 448, 451  
 Дибромтиронин 448, 451  
 Диварикатиновая кислота 311  
 Диваровая кислота 311  
 3,6-Дигаллоилглюкоза 326  
 Дигетеролевулозаны 275, 282, 283  
 Дигидроауреузидин 322  
 Дигидробруцин 551  
 Дигидрокодеинон 537  
 Дигидрокортисон 338, 345  
 Дигидроморфин 534, 540  
 Дигидроморфинон 537  
 Дигидрооксикодейнон 537, 552, 556  
 7,8-Дигидро-6-оксиптеридин 621  
 Дигидрострептомицин 644  
 Дигидрохалконы 310, 322  
 Дигинатин 373  
 Дигиноза 367  
 Дигипурпурин 373  
 Дигиталоидные генины 370  
 Дигиталоидные гликозиды 368, 370  
*Digitalinum verum* 366, 371  
 Дигиталоза 367  
 Дигитоксигенин 371  
 Дигитоксин 367, 371—373  
 Дигитоксоза 367  
 Дигифолеин 373  
 Дигликолевая кислота 245  
 Диглицериды 239  
 Дигоксигенин 366, 367, 371  
 Дигоксин 367, 371  
 Ди-(индолил-3)метан 569  
 Дийодгистидин 449  
 Дийодтирозин 409, 418, 420, 424, 428, 430, 448—450  
 Дийодтиронин 448—450  
 Дикарбоновые кислоты 241—247  
 Дикетогулоновая кислота 630—632  
 Дикетониперазин, образование 467  
 Дикодид 534  
 Дикумарин 327, 328  
 «Дилан» 655  
 Дилаудид 534, 540  
 Димедон 561  
 5,6-Диметокситриптами 569  
 4,6-Диметилальтроза 285  
 Диметиламин 384  
 Диметиламиноазобензол 242  
*n*-Диметиламинобензальдегид 243, 247, 290, 341, 368, 377, 386, 389, 392  
*n*-Диметиламинобензилденроданин 677, 678, 680—682  
 Диметиламинокислоты 484, 485  
 3-Диметиламинометилиндо 568, 569  
 Диметиламинопептиды 782  
 2-Диметиламиноптеридин 621  
 2-Диметиламиноэтил-5-оксиндол 568, 569  
 Диметиланилин 284, 728  
 2,3-Диметиларабиноза 285  
 5,6-Диметилбензимидазолдианкобамид 625  
 2,4-Диметилгалактоза 285  
 2,6-Диметилгалактоза 285  
 3,4-Диметилгалактоза 285  
 4,6-Диметилгалактоза 285  
 Диметилглиоксим 669, 677, 680, 701  
 2,3-Диметилглюкоза 285, 286, 295  
 2,6-Диметилглюкоза 295  
 3,4-Диметилглюкоза 285  
 3,6-Диметилглюкоза 285  
 4,6-Диметилглюкоза 285  
 Диметилгуанидин 387

- Диметилдигидрорезорцин 561  
 Диметилдигидрорезорцин — хлорное же-  
 лезо 748  
 3,3'-Диметил-4,4'-диокси-5,5'-диметил-  
 дифенилметан (ДИМ-1) 306  
 Диметил-2,2-дихлорвинилфосфат 657  
 О,О'-Диметилизохондрондрии 543  
 3,7-Диметилксантин рис. 202, 514, 522  
 3,8-Диметилксантин 514  
 2,3-Диметилксилоза 285  
 2,4-Диметилксилоза 285  
 4,7-Диметилкумарин 329  
 О,О'-Диметилкурин 543  
 2,3-Диметилманноза 285, 296  
 3,4-Диметилманноза 285  
 4,6-Диметилманноза 285  
 N,N'-Диметилмочевина 387  
 Диметил- $\alpha$ -нафтиламин 269, 595  
 2,3-Диметил-7-нитроиндол 569  
 Диметил- $\beta$ -оксипропиловый сульфид 600  
 Диметил-*n*-трет-бутилфенол 306  
 Диметил-*o*-крезол 306  
 2,6-Диметил-*n*-крезол 306  
 2,4-Диметил-*o*-фенол 306  
 2,6-Диметил-*o*-фенол 306  
 Диметилпропионовая кислота 245  
 3,4-Диметилпирокатехин 306  
 3,5-Диметилпирокатехин 306  
 3,6-Диметилпирокатехин 306  
 4,5-Диметилпирокатехин 306  
 2,4-Диметилпиридин 565  
 2,6-Диметилпиридин 565  
 3,4-Диметилпиримидин 285, 286  
 N-Диметилтриптамин 569  
 2,3-Диметилфенол 307  
 2,4-Диметилфенол 307  
 2,5-Диметилфенол 307  
 2,6-Диметилфенол 307  
 3,4-Диметилфенол 307  
 3,5-Диметилфенол 307  
 3,4-Диметилфруктоза 285  
 1,5-Диметил-5'-циклогексенилбарбитуро-  
 вая кислота 524  
 $\beta,\beta$ -Диметилцистеин 409, 428, 432, 446  
 Динитроантрахиноны 397, 398  
 3,5-Динитробензамиды 772  
 3,4-Динитробензойная кислота 266  
 3,5-Динитробензойная кислота 736  
 эфиры спиртов 761  
*m*-Динитробензол 172, 342, 368, 734  
 Динитробензолы 398  
 Динитронафталины 397, 398  
 3,5-Динитросалициловая кислота 266,  
 277, 725  
 Динитрофенила производные, см. ДНФ  
 2,4-Динитрофенилгидразин рис. 125, 245,  
 249, 342, 379, 576, 732, 735  
 2,4-Динитрофенилгидразоны 227, 228,  
 247, 248, 250, 330  
 определение 763  
 гидрогенолиз 763  
 1,5-Ди-*n*-нитрофенил-2,4-дихлорацети-  
 до-1,5-пентадион 399  
 Динитрофенилирование 780  
 3,5-Динитрофталаты спиртов 222  
 3,6-Динитрофталаты спиртов 221, 222, 761  
 2,4-Динитрофторбензол 292, 473  
 Диоканин 393  
 4,7-Диокси-2-амино-8-ацетилптеридин 620  
 Диоксинаптон 632  
 2,4-Диоксибензальдегид 331  
 3,4-Диоксибензальдегид 331  
 2,3-Диоксибензойная кислота 305  
 2,4-Диоксибензойная кислота 305  
 2,5-Диоксибензойная кислота 305  
 2,6-Диоксибензойная кислота 84, 305  
 3,4-Диоксибензойная кислота 305  
 3,5-Диоксибензойная кислота 305  
*o*-Диоксибензол, определение 768  
 2,2-Диокси-5,5'-диметилдифенилметан  
 (ДИМ-2) 306  
 5,6-Диоксиндол 571  
 диметилловый эфир 571  
 монометилловый эфир 571  
 Диокси-*G*-кислота 592  
 Диоксималяные кислоты 81, 245  
 4,7-Диокси-6-метилптеридин 621  
 3,4-Диокси-2-метилфенилаланин 426  
 4- $\alpha$ -Диоксипропиофенон 331  
 2,4-Диоксиптеридин 620, 621  
 4,6-Диоксиптеридин 621  
 4,7-Диоксиптеридин 620, 621  
 6,7-Диоксиптеридин 621  
 4,7-Диоксиптеридин-6-альдегид 621  
 6,8-Диоксипуридин рис. 202, 514  
 2,3-Диоксифенилаланин 426  
 2,4-Диоксифенилаланин 426  
 2,5-Диоксифенилаланин 85, 426  
 3,4-Диоксифенилаланин 410, 418, 424,  
 428, 441  
 3,5-Диоксифенилаланин 426  
 3',4'-Диоксифлавоны 318—319  
 3,4-Диоксифлавонолы 318—319  
 4,8-Диоксихинолин 587  
 4,8-Диоксихинолин-2-карбоновая кисло-  
 та 587  
 Диоксихолестерин 350  
 $3\beta,17\beta$ -Диокси- $\Delta^5$ -холестерин 350  
 1,3-Диолеин 239  
 $\alpha$ -Диолы 264, 266, 278, 279, 284  
 Диосмин 318  
 1,3-Дипальмитин 239  
 Дишкриямин 385, 681, 737  
 2,2'-Дипиридил — хлорное железо 604,  
 751  
 Дипольный момент 68, 75, 82, 83, 301,  
 397, 401, 591  
 Дипропиламин рис. 158, рис. 159  
 Диптерекс 657  
 Диспрозий 699  
 Диссоциация 86, 87, 382, 400  
*l*- $\alpha$ -Дистеароиллецитин 239  
*l*- $\alpha$ -Дистеароиллецитин 239  
 4,4'-Дисульфокислота 594  
 Дитизон 669, 676, 679, 680  
 Дифенаты спиртов 222  
 Дифениламин 265, 269, 284, 708  
 5,5'-Дифенилгидантоин 585  
 1,2-Дифенил-3,5-диоксо-4-*n*-бутилпиразо-  
 лидиннатрий 586  
 Дифенилин 391  
 Дифенилкарбазид 678, 679

- Дифенилкарбазон 236, 678, 723  
 4-Дифенилсульфокислота 594  
 Дифенилтиокарбазон 675, 676  
 2,4-Дифенилфенол 306  
 2,5-Дифенилфенол 306  
 $\beta$ , $\beta$ -Дифенилэтиламин 384  
 2,3-Дифосфоглицериновая кислота 279, 289  
 2',4'-Дифосфоантотеновая кислота 617  
 Дифосфопиридиннуклеотид 145, 516, 517, 520, 521  
 Дифруктозоангидрид I 283  
 Дифруктозоангидрид II 283  
 Дифруктозоангидрид III 283  
 Ди-*d*-фруктопиранозидо-1,2:2,1-диангидрид 283  
 Диффузия 46, 54, 56, 155  
*n*-Дихлорбензол 376  
 2,6-Дихлорфенолиндифенол 168, 242, 616, 631, 698, 752  
 2,6-Дихлорхинонхлоримин, *см.* реактив Гиббса  
 Диэдрин 655  
 Диэтаноламин 385  
 Диэтиламин *рис.* 158, *рис.* 159  
 Диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЕАЕ) 212  
 5,5'-Диэтилбарбитуровая кислота 524  
 Диэтилдитиокарбамат натрия 669  
 Диэтиленгликоль 223  
 Диэтилкарбамазин 586  
 Диэтилкарбалилпиперазин 586  
 Диэтилкетон *рис.* 125  
 Диэтилникотинамид 565  
 О-Диэтил-О-(*n*-нитрофенил)-тиофосфат *рис.* 235  
 О,О-Диэтил-О-(*n*-нитрофенил)-тиофосфат *рис.* 235  
 О,О-Диэтил-О-(*n*-нитрофенил)-фосфат *рис.* 235  
 Диэтилстильбэстрол 358  
 Диэтилсульфоновые производные пентоз 292  
 Длинные полосы от стартовой линии 153  
 ДНФ-аминокислоты 292, 429, 438, 469—479, 780  
 — определение 777  
 — гидролиз 781  
 ДНФ-аминоспирты 490, 491  
 ДНФ-амино- $\delta$ -хлорвалериановая кислота 474  
 ДНФ-амины 383, 384  
 Добавление индикатора к растворителю 459  
*n*-Додецилальдегид 228, *рис.* 125  
 Додециловый спирт 223  
 Документация хроматограммы 172, 173  
 Доноры протонов 67, 76, 116, 346, 400  
 Допа, *см.* 3,4-Диоксифенилаланин  
 Дормираль 524  
 Дормифен 524  
 Дрожжи пекарские, суспензия 269, 727  
 Дульдит 256, 279  
 Дубильные вещества 310  
 Енолы 302  
 Железо 667, 668, 671, 674—676, 679, 685, 688, 693—695, 701, 704—706, 792, 794  
 закисная соль 563  
 окисная соль 385, 561, 748  
 определение 792, 794  
 роданид(II) 708  
 сульфат(II) 708, 755  
 Fe<sup>55</sup> 198, 202  
 хлорное 169, 235, 287, 302, 303, 317, 323, 389, 540, 550, 587, 604, 616, 631, 645, 707, 722, 730  
 Железоаммонийные квасцы 243, 303, 317, 731  
 Желчные кислоты 352—356  
 Жирные кислоты 222, 232, 238  
 Зажим для хроматограмм 160  
 Закон Гульдберга — Вааге 39  
 Закон распределения Нернста 39, 73  
 Замедление тока подвижной фазы 144  
 орто-Замещение 312  
 Зимостерол 365  
 Змеиный яд 505  
 Золото 668, 671, 677, 681, 698, 704  
 Зоны элюирования 48, 52  
 Иден 325  
 Идоза 257, 272  
 Идометилоза 257  
 Иервин 548  
 Изатин 171, 412, 417, 485, 568, 748  
 $\beta$ -Излучение 197—199  
 $\gamma$ -Излучение 198, 199  
 Излучение видимое 181  
 Изменение порядка чередования пятен 144  
 Измерение проводимости 187, 683  
 Изоаскорбиновая кислота 632  
 Изоаспарагин 410, 418, 420, 428  
 Изобергтапен 329  
 Изованилин 331  
 Изовогония 318—319  
 Изогермин 548, 549  
 Изоглутамин 420, 428  
 Изогуайазулен 378  
 Изодрин 655  
 Изозигаденин 548, 549  
 Изоймператорин 329  
 Изоверцятрин 318—319  
 Исколхицин 535  
 Изоксантоптерин 619, 620  
 Изолейциларгинин 462  
 Изолейцин 134  
 Изолейцинол 491  
 Изоллизергиновая кислота 544, 546, 552  
 оксипутиламид 546  
 Изомальтоза *рис.* 107, 269, 272  
 Изомасляная кислота 234  
 Изомерия 79—85, 255—258  
*трео-эритро*-Изомерия 84  
*цис-транс*-Изомерия 84, 700  
 Изомерия динитрофенилгидразона 248  
 Изомеры положения 301

- Изомитилит 226  
Изоникотиновая кислота 564, 565  
    амид 564, 565  
    гидразид 564, 565  
Изопельтьерин 539  
Изопентиламин 384  
Изопилокарпин 551  
Изопимпинеллин 329  
5-Изопропил-5-аллилбарбитуровая кислота 524  
Изопропиламин 384  
5-Изопропил-5-бромаллилбарбитуровая кислота 524  
Изопропиловый спирт 223  
Изопротоверин 548, 549  
Изородомиины 650  
Изородомиины 650  
Изосерин 418  
Изосистокс 657  
Изотерма адсорбции 33, 38, 70  
    — распределения 118  
Изофлаваноны 310  
Изофлавоны 310, 322  
Изофталевая кислота 398  
Илицицианин 325  
Имидазол 575  
Имидазолакриловая кислота 95, 575—578  
Имидазол-4(5)-альдегид 577  
4,5-Имидазолдикарбоновая кислота 577  
4(5)-Имидазолкарбоновая кислота 577  
    метиловый эфир 577  
Имидазолметанол 576  
Имидазолипириновинградная кислота 576  
Имидазолипропионовая кислота 575, 576  
Имидазолуксусная кислота 575, 576  
Имидазолы 575—578  
Иммунологическое обнаружение антигенов и антител 177  
Императорин 329  
Инактивация ферментов 502  
Инвертаза 261, 500  
Ингибирование роста 174  
Ингибирующие вещества, обнаружение 174, 175  
Ингибиторы 174  
1,2-Индандиол 84  
Индиго 95  
    дисульфонат 568  
Индиготин 568  
Индий 676, 682, 700  
Индикан 568  
Индикангликозид 568  
Индикатор универсальный ВОН 232, 242, 707, 708  
Индикаторные красители 663  
Индикаторы кислотно-основные 167, 231, 232  
Индирубин 568  
Индоксилсульфат 95, 568  
Индол 568, 569  
    производные 543—547, 566—575  
Индол-3-акриловая кислота 569  
Индол-3-альдегид 567, 569, 571  
Индол-3-ацетальдегид 567, 569  
Индол-3-ацетамид 567, 569  
Индол-3-ацетон 569  
Индол-3-бутанол 569  
1-(Индол-3)-бутен-1-он-3 567, 569  
Индол-3-диэтилацетамид 569  
γ-(Индол-3)-масляная кислота 567, 569  
    амид 569  
    метиловый эфир 569  
β-Индол-3-молочная кислота 567, 569  
    метиловый эфир 569  
Индол-3-пировиноградная кислота 567, 569  
    метиловый эфир 56  
Индол-3-пропандиол 569  
Индол-2-пропанол 569  
Индол-3-пропанол 569  
2-(Индол-3)-пропанол 569  
β-(Индол-3)-пропионовая кислота 567, 569  
    амид 569  
    метиловый эфир 569  
Индол-3-сульфокислота, калиевая соль 568  
Индол-3-уксусная кислота 175, 567, 569, 574  
    метиловый эфир 569  
    этиловый эфир 567, 569  
2-(Индол-3)-этанол 567, 569  
N-Индол-3-этилпиррол 569  
Индол-2-карбоновая кислота 566, 569  
    метиловый эфир 569  
Индол-3-карбоновая кислота 567, 569, 570  
    метиловый эфир 569  
Индол-3-производные 171  
Инозин 515—517  
Инозиндифосфат 520  
5-Инозинмонофосфат 515, 516, 520  
Инозиновая кислота 515—517, 520  
Инозинтрифосфат 520  
Инозит 225, 226, 506  
    гексафосфат 225  
    ортофосфат 225  
    тетрафосфат 225  
Инсектициды 653—659, 753—755  
Инсулин 467, рис. 200  
Интенсиметр 200  
Инулин 256  
Инфракрасное излучение 181  
Иохимбин 544, 552, 555  
Ионообменная емкость бумаги 107  
Иридий 698, 705  
История хроматографии на бумаге 21—31  
Итаконовая кислота 245  
Иттрий 676, 689, 699  
Йод 170, 237, 240, 342, 353, 384, 450, 500, 501, 530, 586, 607, 630, 719  
    J<sup>131</sup> 195, 198, 203  
Йодат 708, 709  
Йодат калия — йодид калия 243, 394, 740  
Йодгистидин 449  
Йодид 450, 667, 708, 709  
Йодид калия — крахмал 503  
Йодная кислота 265, 267, 276, 278, 284, 296, 368, 372, 510, 725, 742, 769

- Йодная кислота — бензидин 725  
Йодная кислота — бензидин —  $\text{KMnO}_4$  725  
Йодкрахмальный раствор 631, 744, 752  
Йодное число 189, 204  
Йодовисмутат 607, 751  
Йодолатинат 342, 415, 460, 607, 735  
    комплексы с алкалоидами 785  
5-Йодтиоурацил 521  
 $\text{J}^{131}$ -*n*-Йодфенилсульфохлорид 203
- Кадаверин 38, 428  
Кадмий 191, 667, 671, 674, 675, 678, 683, 685, 686, 689, 691, 692, 695, 696, 701, 702, 705, 794  
    определение 794  
Какотелин 631  
Калебассин 541  
Калебассинин 541  
Калий 607, 674, 675, 681, 683, 685, 697, 698, 702, 704, 751  
    бихромат 389, 708  
    гидроокись 732, 755  
    йодвисмутат 607, 751  
    йодилатинат 600, 657, 735  
     $\text{K}^{42}$  198, 201  
    определение 793  
    перманганат 168, 237, 243, 265, 328, 372, 415, 523, 554—557, 619, 654, 657, 708, 719  
    роданид 679, 680, 701  
    феррицианид 303, 387, 394, 501, 631, 739  
    ферроцианид 236, 243, 303, 416, 540, 678—680, 682, 722  
Кальцин 316  
Каллистегин 325  
Кальций 667, 670, 673, 674—677, 680, 685, 696, 702, 704, 705, 793  
    определение 793  
Кальциферолы 363—366  
Камеры хромотографические 123—131  
Камфора 379  
Канаванин 415, 418, 420, 428  
Канадин 542  
Каналин 433  
Капиллярная конденсация 101  
Капиллярное элюирование 100, 178  
Капиллярный анализ 23, 43, 666  
Каприловая кислота 234, рис. 127  
Каприновая кислота 234, рис. 127 и 128  
Капролактан 395  
Капроновая кислота 234, рис. 127  
Карбаминоилхолин 386  
5-Карбоксиванилин 331  
2-Карбоксииндолил-3-пропионовая кислота 569  
    диэтиловый эфир 569  
2-Карбоксииндолил-3-уксусная кислота 568, 569  
Карбоксильная бумага 108  
Карбоксиметилцеллюлоза 213  
Карбоксипептидаза 468, 782  
Карбоксипептидазный метод 469, 485—487
- Карбоксицеллюлоза, см. Оксицеллюлоза  
1-Карбометоксиметил-2,13-диметил-7-ацетокси-1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13-додекагидрофенантрен-2-карбоновая кислота 355  
    2-метилловый эфир 355  
Карбамицин 650  
Карбонат 708  
Кардиазол 586  
Карнозин 409  
Каротин 365, 584  
Каротиноиды 602, 603  
Каталитическое действие тяжелых металлов 137  
Катенулин 650  
Катехины 310, 313, 323, 324, 326  
Катионы 672—706  
Каучук 379  
Кацуранин 320—321  
Кварцит 226  
Квебрахит 225, 226  
Кверцемеритрин 320—321  
Кверцетин 318—319, 326, 675  
Кемпферитрин 318—319  
Кемпферол 318—319  
Кератин 485  
Кестоза 275  
Кетoadипиновая кислота 245  
2-Кетoарабоновая кислота 279  
2-Кетогалактоновая кислота 279  
Кетогексометилозы 256  
Кетогептозы 268  
 $\alpha$ -Кетоглутаровая кислота 245, 250  
Кетоглюконовые кислоты рис. 76, 279, 282  
2-Кетогулоновая кислота 632  
    метилловый эфир 632  
2-Кетoидоновая кислота 279  
2-Кетoизовалериановая кислота 245  
Кетокислоты 247—251, 265, 280  
2-Кетоманногептановая кислота 279  
Кетоманноновые кислоты 279  
 $\alpha$ -Кетомасляная кислота 245  
Кетоны 227—229, 722  
11-Кетопрогестерон, см.  $\Delta^4$ -прегнен-3,11, 20-трион  
17-Кетостероиды 358  
11-Кетотестостерон 359  
16-Кетозтрон 356  
Кефалины 240  
Киноплёнка рис. 194, 501, 744  
Кинуреновая кислота 309  
Кислая чернь 10В 503  
*перу*-Кислота 592  
F-Кислота 592  
G-Кислота 592  
I-Кислота 592  
R-Кислота 592  
 $\gamma$ -Кислота 592  
 $\delta$ -Кислота 592  
 $\varepsilon$ -Кислота 592  
Кислота баденская 592  
Кислота Броннера 592  
Кислота Коха 592  
Кислота Лаурента 592  
Кислота Невилль-Винтера 592

- «Кислоты расщепления» 326  
 Кислота Шеффера 592  
 Кислота Шоллкопфа 592  
 Кислоты, см. Алифатические кислоты,  
 Ароматические кислоты или Анионы  
 Кислоты Клеве 592  
 Китоновый светостойкий желтый 3 ГРЛ  
 664  
 Китоновый светостойкий красный ВГЛЕ  
 664  
 Клубенин рис. 183  
 Кобальт 191, 671, 674—676, 683, 685,  
 686—689, 695, 696, 700—702, 704—706,  
 712, 794  
 Со<sup>60</sup> 198  
 нитрат 523, 746  
 нитрит 697  
 определение 794  
 Кодезаминаза 615  
 Кодеин 531, 532, 534, 537, 555  
 Койевая кислота 674, 681  
 Кокаин 393, 537, 539, 552, 556  
 Кокарбоксилаза 520  
 Коламин 388, 418, 420, 424, 428, 491  
 Коламинкефалин 241  
 Коламинфосфат 409, 428  
 Количества разделяемых веществ 146  
 Количественное определение 180—192  
 биологические методы 181, 189  
 визуальная оценка 183  
 измерение поверхности пятна 182  
 колориметрия 190  
 метод эталонных добавок 182, 183, 191  
 методы 181, 182—189  
 оптические методы 181, 190  
 полярография 190, 192  
 радиометрические методы 181, 189,  
 198, 199  
 спектрофотометрия 190  
 с применением элюирования 180,  
 191, 189—192  
 ферментативные методы 181  
 флуорометрия 190  
 химические методы 181, 189  
 электрохимические методы 181  
 «Количественный мостик» 182, 585  
 Коллидин 560  
 Колодки, наполнение 213—215  
 Колхицин 535  
 Колхицин 535, 552, 557  
 Комбинация систем («Summarized pa-  
 pergram») 638  
 Комплекс вода—целлюлоза 255  
 Конваллатоксол 371  
 Конваллотоксин 367, 369, 371  
 Конваллотоксолозид 371  
 Конго красный 664  
 Кондуктометрия 181  
 Конессидин 551  
 Конессимин 551  
 Конессин 548, 551  
 Конинин 538, 552, 555  
 Конилин 551  
 Константа основной группы 78, 527, 528  
 Константа положения 338  
 Контактное фотокопирование 517  
 Контрастное окрашивание 168  
 Конформация  
 аксиальная 81, 82, 335  
 заместители 336  
 экваториальная 81, 82, 335  
 С-Концевые аминокислоты 465, 469,  
 485—492  
 N-Концевые аминокислоты 465, 469—485  
 Копропорфирин 577—580  
 Копростанол 365  
 Коптизин 542  
 Корамина 586  
 Кореоисин 320, 321  
 Коринантеидин 545  
 Коринантеин 545  
 Коринантидин 545  
 Коринантин 545  
 Коричные кислоты 84, 306  
 Коричный альдегид 330, 372, 416, 427,  
 460, 542, 546, 572, 736  
 Кортизол 338—340, 345, 360, рис. 147  
 Кортизон 339, 340, 342, 345, 347, 362,  
 рис. 147, рис. 148  
 Кортизонацетат 335, рис. 147, рис. 148  
 Кортизонпропионат 335  
 Кортикостерон 338, 339, 340, рис. 48  
 Кортикотропин А 487  
 β-Кортолонглюкуронид рис. 146  
 Корфинамид 626  
 Кослюцианин 325  
 Котарнин 552, 554  
 Кофеин 514, 522  
 Кофейная кислота 309  
 Кофермент А 615—617  
 Коферменты  
 активность 174  
 проявление 174  
 Коэффициент разделения 36  
 — распределения 33, 34, 53, 54, 60, 72,  
 73, 81, 86, 143, 670  
 Красители для окрашивания пищевых  
 продуктов 662  
 Красители для текстильного волокна 663—  
 665  
 Красители, содержащиеся в желчи 581, 582  
 Красящие вещества в листьях растений  
 583—585, 603  
 Креатин 388  
 Креатинин 147, 183, 388  
 определение 773  
 Крезол 81, 86, 306, 307  
 Крезоловый красный 664  
 Криптопин 552, 557  
 Кродеиновая кислота 592  
 Ксантгидрол 372, 574  
 Ксантин рис. 202, 514—517  
 производные 521, 522  
 Ксантогенаты 223, 761  
 Ксантозин 515—517  
 Ксантомицин 638  
 Ксантоптерин 620  
 Ксантоптеринацетат 620  
 Ксантоптеринкарбоновая кислота 620  
 Ксанторампин 320—321  
 Ксантотоксин 329  
 Ксантофилл 584

- Ксантоциллины 651  
 Ксантуреновая кислота 309, 587  
 Ксиленол 86, 306  
 Ксилит 279  
 Ксилоза рис. 40, 216  
 Ксилоза-3-фосфат 289  
 Ксилоза-5-фосфат 289  
 Ксилокаин 393  
 Ксилол 377  
 Ксилолсульфонокислоты 594  
 Ксиловая кислота,  $\gamma$ -лактон 281  
 Кубовые красители 665  
 Кумарин 327, 329, 330  
 Кумарины 326—329  
 Кумаровые кислоты 305, 329  
 Купферон 669  
 Курарин 541, 542
- Лаборатории для хроматографии на бумаге 155—157  
 Лактамы гуанидиновых кислот 387  
 — гуанилвалина 388  
 — гуанилизололейцина 388  
 Лактаразулен 377, 378  
 Лактилолмолочная кислота 245  
 Лактоза 256, рис. 135, 272, 277  
 Лактоны сахарных кислот 265, 281  
 проявление 766  
 Ланатозиды А, В, С 366, 367, 370, 371, 373  
 определение 772  
 Лантан 689, 699  
 Лантанин 409, 418, 420, 430, 432, 443, 466, 649  
 Лаппаконин 552  
 Лаппаконитин 552  
 Ларокаин 393  
 Латероспорины 646  
 Латостерол 365  
 Лауриновая кислота 234, рис. 128  
 Левулиновая кислота 245  
 Ледяная уксусная кислота 702  
 Лейковорин 622, 623  
 Лейкоптерин 620  
 Лейкоцианидин 177  
 Лейцилаланилглицин 463  
 Лейцилаланин 462  
 Лейциласпарагин 462  
 Лейцилвалин 463  
 Лейцилгистидин 463  
 Лейцилглициласпарагиновая кислота 463  
 Лейцилглицилглицин 463  
 Лейцилглициллейцилтриптофан 410  
 Лейцилглициллейцин 463  
 Лейцилглицин 463  
 Лейцилглутаминовая кислота 463  
 Лейциллейцин 463  
 Лейцилтриптофан 463  
 Лейцилцистеин 462  
 Лейцилцистеиновая кислота 462  
 Лейцин 71, рис. 39, 134, 145, 400—452  
 Лейцинамид 420  
 Лейцинол 491  
 Лептозидин 322  
 Лептозин 322  
 Лецитин, 239—241
- Лигнин, продукты окисления 768  
 Лигнины 330—332  
 Лизергиновая кислота 544—546  
 оксибутиламид 546  
 Лизилаланин 463  
 Лизиларгинин 463  
 Лизиллизин 463  
 Лизин 81, рис. 39, 134, 151, рис. 96, 204, 400—452  
 Лизинол 491  
 Лизолецитин 239  
 Лизофосфатидилэтаноламин 239  
 Ликвиритигенин 320—321  
 Ликорицианин 325  
 Ликсоза 257, 272, 292  
 Ликсофлавин 612  
 Лиметтин 329  
 Лимонная кислота 243—247  
 Линолевая кислота 234, рис. 128  
 галоидозамещенные 234  
 Линоленовая кислота 234  
 Линтер 102, 104  
 Липаза 500  
 $\alpha$ -Липоевая кислота 609, 610  
 $\beta$ -Липоевая кислота 609, 610  
 Липотиамид 609, 610  
 Липотиамидпирофосфат 609  
 Литий 187, 677, 681, 633, 697, 698  
 алюмогидрид 769  
 хлористый 216, 670  
 Литохоловая кислота 353  
 Лихениформины 646  
 Лобеламин 537  
 Лобеланидин 537  
 Лобелин 537, 552, 556  
 Лодочка 125, 126  
 Лума HgU 162  
 Лумистерол 365  
 Лумифлавин 611, 612  
 Лумихром 611  
 Лупанин 548  
 Лупенол 379  
 1,3-Лупинин 548  
 Луренол 379  
 Лутеолин 318—319  
 2,3-Лутидин 560  
 2,4-Лутидин 560  
 2,5-Лутидин 560  
 2,6-Лутидин 560  
 Лутидины 560, 561  
 Люминал 523, 524
- Магнамицин 650  
 Магний 675, 681, 635, 686, 689, 696, 697, 702, 704, 705, 793  
 ацетат 303, 662, 731  
 определение 793  
 Малатион 657, 658  
 Малениновая кислота 84, рис. 130, 244—246  
 Малоновый эфир 222, 721  
 Мальвидин 325  
 Мальвидин-3-галактозид 325  
 Мальвидин-3-глюкозид 325  
 Мальвидин-3,5-диглюкозид 325

- Мальвин 325  
 Мальтогексоза рис. 135  
 Мальтоза рис. 107, 256, 269, 272, рис. 135, 285, 501  
 Мальтопентоза рис. 135  
 Мальтотетроза рис. 135  
 Мальтотриоза рис. 135  
 Маннит 256, 279  
*d*-Манно-*l*-галактоза 257  
 Манноза 295, 296  
 Маннозидострентомидин 643—644  
 Маннозофосфат рис. 105  
 Маннометилоза 257  
 Маннурон 279  
 Маннуроновая кислота 257, 272, 279, 282  
    $\gamma$ -лактон 281  
 Манометрический метод 744  
 Марганец 667, 674, 675, 680, 685, 686, 688, 690, 695, 696, 701, 704, 706  
   определение 794  
 Масляная кислота 81, 234  
 Масляная синь 379  
 Матрицин 377  
 Маялозид 371  
 Медные комплексы аминокислот 428, 433, 437, 460  
 Медные мыла 236, 722  
 Медомин 524  
 Медь 191, 667, 670, 671, 674, 675, 678, 685—692, 695, 701, 704—706, 794  
   Cu<sup>66</sup> 198, 202, 204  
   определение 794  
 Мезаконовая кислота 84, 245  
 Мезобиливиолин 582  
 Мезоксалева кислота 245  
 Мезопорфирин 577, 579  
   метиловый эфир 577  
 Мекарпин 543  
 Мекоцианин 325  
 Меламин 586  
   производные 387  
 Меланогены мочевины 571  
 Мелибаза 261  
 Мелибиоза 272, 275  
 Ментон 379  
*d*- $\beta$ -Меркаптовалин 647  
 4-Меркаптоптеридин 621  
 6-Меркаптопурины 521  
 Меркурохром 242  
 Метаникотин 537  
 Метанол 223, рис. 123  
 Метелодин 538  
 2-Метиладенинцанкобамид 625  
 Метиладреналин 394  
 5-Метил-5'-аллилбарбитуровая кислота 524  
 3-Метилальтрометилоза 285  
 Метиламин рис. 156, 384, рис. 159  
 $\alpha$ - $\alpha$ -Метиламино- $\beta$ -(индолил-3)-пропионовая кислота 568, 569  
 N-Метиламиноокислоты 649  
 $\alpha$ -Метиламиномасляная кислота 409  
 2-Метил-4-аминоптеридин 621  
 2-Метиларабиноза 285  
 Метиларабинозиды 285  
 2-Метил-1-бутанол 223  
 3-Метил-1-бутанол 223  
 3-Метилбутанон-2, 228, рис. 125  
 Метилвалин 648  
 2-Метилгалактоза 285  
 4-Метилгалактоза 285  
 6-Метилгалактоза 285  
 Метилгалактозиды 285  
 2-Метилгипоксантинцанкобамид 625  
 Метилгистидины 409, 411, 416, 444, 446, 576, 577  
 $\alpha$ -Метилглутаминовая кислота 426  
 $\gamma$ -Метилглутаминовая кислота 409, 426, 440  
 2-Метилглюкоза 284, 285  
 3-Метилглюкоза 284  
 4-Метилглюкоза 284  
 6-Метилглюкоза 284, 285  
 $\alpha$ -Метилгликозид 501  
 Метилгликозиды 256, 284, 285  
 Метилгуанидин 388  
 Метилдикетохоланаты 354  
 2-Метил-4,6-диметилдофенол 306  
 4-Метил-2,6-ди(2'-окси-5'-метилбензил)-фенол (ТРИМ-1) 306  
 6-Метил-4-диоксиптеридин 621  
 3-Метил-5,5'-дифенилгидантоин 585  
 1-Метил-5,5'-диэтилбарбитуровая кислота 524  
 $\gamma$ -Метиленилглютамин 418  
 $\gamma$ -Метиленилглютаминная кислота 418, 440  
 3,3'-Метиленил-бис-(4-оксикумарин) 327, 328  
 Метилизопельтерин 539  
 1-Метил-5-изопропил-5'-аллилбарбитуровая кислота 524  
 1-Метил-5-изопропил-5'-бромаллилбарбитуровая кислота 524  
 Метилизосистокс 657  
 Метилизотиуроиййодид 599  
 3-Метилиндол 567  
 Метилирование 294—296, 534, 747  
   восстановительное 484, 485  
   полисахаридов 767  
 Метилированные альдозы 265  
 Метилированные кетозы 265  
 Метилированные сахара 283—286  
 Метил-12-кето-3-ацетоксихоланат 354  
 Метил-7-кето-3,12-диоксихоланат 354  
 Метил-12-кето-3-оксихоланат 354  
 Метил-12-кетохоланат 354  
 3-Метилксантин рис. 202, 514  
 7-Метилксантоптерин 620  
 2-Метилксилоза 285  
 Метил- $\alpha$ -*d*-ксилозид 285  
 3-Метилкумарин 329  
 4-Метилкумарин 329  
 Метил- $\beta$ -лактозид 285  
 Метиллантионин 649  
 Метил- $\beta$ -мальтозид 285  
 4-Метилманноза 285  
 Метил- $\alpha$ -*d*-маннозид 285  
 1-Метил-2-меркаптоямидазол 576  
 2-Метил- $\beta$ -метилальтрозид 285  
 N-Метилмиосмин 537  
 2-Метил-1,4-нафтохинон 605  
   димер 605

- Метилловый красный 242, 500, 560, 664  
 Метилловый красный — бромтимоловый синий 722  
 Метилловый фиолетовый 379, 664  
 3-Метилловый эфир аскорбиновой кислоты 632  
 $\Delta^4$ -16-Метил-16 $\beta$ -оксандростен-3-он 350  
 $\Delta^4$ -17 $\alpha$ -Метил-17 $\beta$ -оксандростен-3-он 350  
 $\gamma$ -Метил- $\gamma$ -оксиглутаминовая кислота 440  
 Метил-3-окси-7,12-дикетохоланат 354  
 Метил-12-окси-3,7-дикетохоланат 354  
 $\gamma$ -Метилоксипролин 441  
 4-Метил-5-оксизетилтиазол 607  
 $\Delta$ -Метил-5-оксизетилтиазол 607  
 $o$ -Метилол- $o$ -крезол 306  
 $n$ -Метилол- $o$ -крезол 306  
 2-Метилол- $n$ -крезол 306  
 Метиллолфенолы 306  
 Метилоранж 503, 664  
 Метилпентозы 265, 270, 276, 282  
 Метилпиперазин 586  
 2-Метил-6-(3'-пиридил)-тетрагидро-1,2-оксазин 537  
 2-Метилпиридин 565  
 3-Метилпиридин 565  
 4-Метилпиридин 565  
 N-Метил-3-пиридон-3-карбоновая кислота 565  
     амид 565  
 N-Метил-2-пиридон-5-карбоновая кислота 565  
     амид 565  
 3-Метилпирокатехин 306  
 4-Метилпирокатехин 306  
 2-Метил- $\Delta^4$ -прегнен-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-3,20-дион 348  
 2-Метил- $\Delta^4$ -прегнен-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-3,20-дион-21-ацетат 348  
 Метилтерородан 620  
 Метилпролин 418, 420, 441  
 2-Метил-1-пропанол 223  
 10-Метилтереоилглутаминовая кислота 622  
 4-Метилрамноза 285  
 Метил- $\alpha$ - $l$ -рамнозид 285  
 N-Метилсеротонин 569  
 Метилстрихнин 551  
 17-Метилтестостерон 339, 359  
 Метилтимоловый синий 677  
 5-Метилтиоурацил 521  
 6-Метил-2-тиоурацил 521  
 1-Метил-2-тиоцианомидазол 576  
 Метил-3,7,12-трикетохоланат 354  
 1-Метилтриптамин 569  
 N-Метилтриптамин 567, 569  
 4-Метилумбеллиферон 242, 562, 748  
 5-Метил-5'-фенилбарбитуровая кислота 524  
 3-Метил-1-фенилпиразолон 562  
 3-Метил-5-фенил-5'-этилгидантоин 585  
 $\beta$ -Метилфруктофуранозид 261  
 2-Метил-9 $\alpha$ -фтор- $\Delta^4$ -прегнен-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-3,20-дион 348  
 2-Метилфукоза 285  
 Метил- $\alpha$ - $l$ -фукозид 285  
 3-Метилхиновоза 285  
 Метилциклогексанон рис. 125  
 $l$ -S-Метилцистеин, сульфоксид 441  
 N-Метилцитизин 548, 550  
 5-Метилцитозин 514—515, 517  
 5-Метилцитозиндезоксирибозид 514—517  
 Метилэргобазин 544, рис. 214  
 Метилэтилкетон рис. 125  
 3-Метил-5-этилпирокатехин 306  
 4-Метил-5-этилпирокатехин 306  
 4-Метил-6-этилпирокатехин 306  
 1-Метил-5'-этил-5-фенилбарбитуровая кислота 524  
 2-Метил-5-этилфенол 307  
 3-Метил-5-этилфенол 86  
 Метямиян 650  
 Метиония 81, 134, рис. 62, 204, 415, 464, 466  
     сульфоксид 410, 418, 420, 421, 424, 430, 432  
     сульфоксим 439  
 Метиониясульфон 410, 415, 418, 420, 421, 424, 427, 430, 432, 464  
 Метод эталонных добавок 182, 183, 191  
 7-( $\gamma$ -метокси)-ацетонилксантоптерин 620  
 Метоксигидрохинон 305  
 8-Метоксикумарин 328  
 Метоксиморфинановые производные 540  
 $n$ -Метоксиз-2-нитроанилин 631, 633, 790  
 3-Метоксиз-4-оксигиппуровая кислота 309  
 3-Метоксиз-4-оксикоричная кислота 309  
 3-Метоксиз-4-оксиминдальная кислота 309  
 3-Метоксиз-4-оксипиرویиноградная кислота 309  
 3-Метоксиз-4-оксифенилпиرویиноградная кислота 309  
 3-Метоксиз-4-оксифенилпропионовая кислота 309  
 3-Метоксиз-4-оксифенилуксусная кислота 309  
 3-Метоксиципрокатехин 305  
 4-Метоксиципрокатехин 305  
 2-Метоксиптеридин 621  
 5-Метокситриптамин 569  
 6-Метокситриптамин 569  
 $n$ -Метоксифенилаланин 647  
 4'-Метоксифлавонол 318—319  
 7-Метоксифлавонол 318—319  
 «Метоксихлор» 655  
 Метчики 149, 241  
 Микробиологическое проявление 416  
 Микродиффузионный способ 189  
 Микропипетки 98  
 Микроскопические наблюдения 164, 165  
 Миллозид 367  
 Миндальная кислота 305  
 Минералайт 162, 510  
 Минерализация 703—705, 711  
 Миристиновая кислота 234, рис. 128, 237  
 Миристористеарин 239  
 Мирицетин 318—319  
 Мирицитрин 318—319  
 Митилин 226  
 Многократное проявление 167  
 Молибдат 671, 696, 710  
     определение 794  
 Молибден 680, 694—696, 703, 705

- Молочная кислота 80, 242, 243, 245, 246  
 Монобромтирозин 448, 451  
 Моноглицериды 239  
 Моноидогистидин 448, 451  
 Моноидотирозин 428, 448—450  
 Моноидотиронин 448, 450  
 Монокаин 393  
 1-Монолаурин 239  
 1-Монолинолеин 239  
 1-Мономиристин 239  
 1-Моноолеин 239  
 1-Монопальмитин 239  
 1-Моностеарин 239  
 Монохроматор 162  
 Моноэтаноламин 385  
 Морин 318—319  
 Морфин 191, 529, 531, 532, 537, 540, 554  
 Морфинан, производные 540  
 Моча 445  
 Мочевая кислота рис. 202, 514, 516, 517, 525  
 Мочевина 269, 284, 386, 403, 418, 420, 424, 727  
     определение 93, 405  
 Мукополисахариды 293  
 Муравьиная кислота 233—235, 241  
 Муцикармин 293, 729  
 Мышьяк 667, 671, 679, 685, 686, 693, 699, 701  
 Мышьяковистомолибденовая кислота 168, 341, 734, 765  
 Мышьяковосфосвольфрамовая кислота 545
- Нагревание хроматограммы 166  
 Найлон 66, 394  
 Найлоновое волокно 110  
 Нанесение проб 96—100, 215—217  
 — — радиоактивных веществ 196  
 Нарингенин 320—321  
     гликозид 320—321  
 Нарингин 320—321  
 Наркамон 524  
 Нарконумал 524  
 Наркотин 537, 540, 544, 552, 557  
 Нарцеин 552, 556  
 Насыщение атмосферы камеры 116, 123, 126, 137, 147, 498  
 Натрий 187, 675, 677, 681, 683, 685, 697, 698, 702, 704  
     бихромат 509, 519  
     гидрокись 227, 249, 680, 682, 701, 702, 734  
     гидросульфит 594, 679, 750  
     гипофосфит 701  
     карбонат 322  
     кобальтинитрит 681  
     нитропруссид 169, 303, 368, 377, 384, 387, 415, 417, 534, 543, 613, 722, 737  
      $\text{Na}^{24}$  198, 201  
     определение 793  
     перйодат 616, 765  
     пектат 501  
     этилат 227, 722
- Нафталин 376  
 Нафталиндисульфокислоты 594  
 $\alpha$ -Нафтиламин 222, 269, 385, 721, 727  
 $\beta$ -Нафтиламин 269  
 1-Нафтиламин-4-сульфокислота 707  
 Нафтиламинсульфокислоты 592—594  
 Нафтиламины 390  
 $o$ -2-Нафтилфенол 306  
 $N$ -(1-Нафтил)-этилендиамин 273, 277, 398, 563, 749  
 Нафтионовая кислота 592  
 $\alpha$ -Нафтол 305, рис. 140  
 $\alpha$ -Нафтол 268, 398, 415, 726  
 $\beta$ -Нафтол 304, 307, 595  
 Нафтол- $I$ -кислота 592  
 Нафтолсульфокислоты 592—594  
 Нафторезорцин 268, 282, 726  
 1,2-Нафтохинон-4-сульфонат 172, 415  
 1,4-Нафтохиноны 605  
 Начальная точка хроматограммы, см.  
     Стартовая линия 96, 97, 140  
 Неамин 650  
 Неидентифицированные пятна 150  
 Нейтральный красный 459, 664  
 Ненасыщенные кислоты, метиловые эфиры 236  
 Неогермитрин 548  
 Неогесперидин 320—321  
 Неодим 699  
 Неолановый зеленый БФ 664  
 Неолановый красный БРЕ 664  
 Неолановый розовый БЕ 664  
 Неолановый синий 2РБ 664  
 Неомидин 644, 645, 650  
 Неорганические вещества 666—715, 755, 756, 791—794  
 Неподвижная фаза 33, 36, 46, 53, 59  
 Непрерывная полярография элюата 192  
 Неринфоллин 367  
 Нетропсин 645  
 Нефрозопептид 409  
 Никель 667, 681, 675—677, 680, 685, 686, 688, 690, 695, 696, 701, 704, 706, 712, 794  
      $\text{Ni}^{65}$  202  
     определение 794  
 Никотин 536, 537, 552, 556  
 Никотиновая кислота 516, 537, 563—565, 606  
     амид 516, 537, 563—565, 606, 608  
     гидразид 564, 565  
 Никотирин 537  
 Нингидрин 171, 240, 243, 251, 265, 273, 290—292, 383, 384, 394, 411, 412, 417, 449, 459, 475, 490, 535, 546, 576, 578, 616, 740, 776, 777  
 Ниобий 712  
 Нисины 646  
 Нитрат 667  
 Нитрат серебра 168, 224, 233, 235, 236, 243, 265, 266, 278, 284, 290, 341, 361, 368, 387, 509, 519, 573, 594, 595, 600, 604  
 Нитрат серебра — бихромат натрия 745  
 Нитрат серебра — фенол 724  
 Нитрат серебра — эриохромцианин 723

- Нитритный реактив 540  
 5-Нитро-2-аминоанизол 324  
*n*-Нитроанилин, см. Диазотированный *n*-нитроанилин  
 Нитроанилины рис. 161, 391  
*n*-Нитробензолдiazоний, фтороборат 303  
 Нитрование 377  
*n*-Нитро- $\alpha$ -дихлорацетамидоацетофенон 399  
*n*-Нитро- $\alpha$ -дихлорацетамидо- $\alpha$ -оксиметил- $\beta$ -оксипропиофенон 399  
*n*-Нитрозодиметиланилин 303, 304, 731  
 Нитрозоморфин 191  
 $\alpha$ -Нитрозо- $\beta$ -нафтол 303, 415, 417, 449, 460, 669, 742  
 5-Нитроизатин 413  
 Нитрокрезолы 398  
 6-Нитро-2-метил-3-индолкарбоновая кислота 569  
 Нитропруссид, см. Нитропруссид натрия  
 Нитропруссид натрия — ацетальдегид 384, 534—535, 737  
 Нитропруссид натрия — трихлоруксусная кислота 747  
 Нитропруссид натрия — феррицианид калия 739  
 Нитропруссид натрия — цианистый натрий 750  
 Нитросоединения 397—399, 740  
*dl*-*trans*-1-(4'-Нитрофенил)-2-аминопропан-1,3-диол 399  
*n*-Нитрофенилгидразоны альдегидов 229, 273  
*n*-Нитрофенил- $\alpha$ -дихлорацетамидовинилкетон 399  
*n*-Нитрофенилстеарат, раствор 500, 743  
 Нитрофенолы 398, рис. 235  
 3-Нитрофталева кислота 398  
     метилловый эфир 761  
     моноэфиры 221—223  
 4-Нитрофталева кислота 398  
 Новокаин 393  
 Ноктал 524  
 Нонанон-2 228  
 Норадреналин 394  
 Норвалин 408, 411, 418, 420—422, 424, 428, 430  
 Норвогонин 318—319  
 Норлейцин 401, 409, 411, 418, 420, 421, 424, 428, 430  
 Норникотин 536, 537  
 Норпрогестерон 342  
 Нортангеретин 318—319  
 Носитель одной из фаз 27, 36, 39—41, 75  
 Нуклеиновые кислоты  
     гидролиз 508  
     компоненты 507—525  
 Нуклеозиды 508, 510, 513  
 Нуклеотиды 508, 510, 513  
 Нумал 524  
  
 Обезжиривание 93, 404  
 Обессоливание 93, 404—406, 575, 618, 764, 773  
  
 Обнаружение 160—177  
     в ультрафиолетовом свете 510  
     микробиологические способы, см. Биоавтография  
     образование азокрасителей 170, 171  
     реакции с неорганическими веществами 169, 170  
     с помощью электрического тока 165  
     ферментативные способы 173, 174  
     физические способы 161—164  
     фильтры 510  
     химические способы 165—173  
 Оборудование для хроматографии на бумаге 155—157  
 Образование комплексных соединений катионов 668, 669, 684, 685, 689, 690  
 — — — с борной кислотой 88  
 Образование «хвостов» 117, 150, 151, 153  
 Образование «язычков» 153, 154  
 Обращенная ретенция 181, 189, 247  
 Обращенные фазы 27, 102, 109, 118, 119  
 Общие способы применения реактивов 164—167  
 Овальбумин рис. 190  
 Однофазные системы 74  
 Окисление 168, 464, 768—770  
     алкилпиридинов 787  
     надмуравьиной кислотой 464, 465  
     ненасыщенных кислот 238, 775  
 Оксалат 708  
 Оксамицин 649  
 $\alpha$ -Окси- $\gamma$ -аминомасляная кислота 428  
 4-Окси-2-амино-5'-метилтиофано-2',3',6,7-птеридин 620  
 4-Окси-2-амино-5'-метилфурано-2',3',6,7-птеридин 620  
 $\gamma$ -Окси- $\alpha$ -аминоимелиновая кислота 428, 440  
 2-Окси-4-аминоптеридин 621  
 6-Окси-7-аминоптеридин 620  
 11 $\alpha$ -Оксиандростендион 344  
 14 $\alpha$ -Оксиандростендион 344  
 11 $\beta$ -Оксиандростендион 344  
 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Оксиандростен-16-он 350  
 3 $\beta$ -Окси- $\Delta^5$ -андростен-16,17-секодиксидион 355  
     диметилловый эфир 355  
 3-Оксиантрахиноловая кислота 309  
 Оксидантрахиноны 662  
 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Окси-21-ацетоксипрегнен-20-он 350  
*n*-Оксиацетофенон 331  
 Оксидбензальдегид 330, 331  
 5-Оксибензимидазолцианкобамид 625  
 4-Оксибензоилацетил 331  
 2-Оксибензойная кислота 84, 305, 308  
 3-Оксибензойная кислота 305, 308  
 4-Оксибензойная кислота 305, 308  
 Оксидбензойные кислоты 84  
 3 $\beta$ -Оксидибиснорхоленовая(5) кислота, метилловый эфир 355  
 Оксигидрохинон 305, рис. 140  
 Оксигиппуровые кислоты 308—309  
 $\gamma$ -Оксиглутаминовая кислота 428, 440  
 Оксидаса  $\alpha$ -аминокислот 649  
 17 $\alpha$ -Оксидезоксикортикостерон 335, 336, 339

- 17 $\alpha$ -Оксидезоксикортикостерон, 14 $\alpha$ - и 15 $\alpha$ -эпоксиацетаты 335  
 $\alpha$ -Окси- $\beta$ , $\beta$ -диметил- $\gamma$ -бутиролактон 617  
 6-Окси-4,7-диметилптеридин 621  
 2-Оксииндол 568, 569  
 5-Оксииндол 569  
 $\beta$ -(Оксииндолил-3)-пропионовая кислота 569  
 5-Оксииндолил-3-уксусная кислота 568, 569  
 7-Оксииндолил-3-уксусная кислота 569  
 3 $\beta$ -Окси-16-карбоксиандростадиеп (5,16), метиловый эфир 355  
 Окси- $\alpha$ -кетомасляная кислота 250  
 3 $\alpha$ -Окси-12-кетохоленовая(5)кислота 355  
 3 $\alpha$ -Окси-12-кетохоленовая(9) кислота, метиловый эфир 355  
 3-Оксикинурины 426  
 Оксикислоты 241—247  
 Оксикодейнон 552, 556  
 Оксикоричная кислота 309  
 Оксикоксицианин 325  
 4-Оксикумарин 327, 328  
 1,1-бис-(4'-Оксикумаринил-3')-пропен-1-ол-2 328  
 бис-(4-Оксикумаринил-3')-уксусная кислота 328  
 $\gamma$ -Оксилейцин 420—421  
 Окселизин 403, 409, 418, 420, 428, 443  
 $\delta$ -Окселизин 420, 439  
 Оксилупанин 548  
 Оксимасляные кислоты 245  
 N<sub>(10)</sub>-Оксиметилимидазол 577  
 n-Оксиметилфенол 306  
 4-Окси-7-метилптеридин 621  
 Оксиминдальные кислоты 308—309  
 Оксиморфиновые производные 540  
 Окиникотин 537  
 1-Окси-6-нитро-1,2,3-бензотриазол 249, 251  
 2-Оксинорлейцин 409  
 3 $\beta$ -Оксинорхоленовая(5) кислота, метиловый эфир 355  
 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Окси-25-норхолестен-25-он 350  
 7-( $\beta$ -Окси- $\alpha$ -оксипропил)-ксантоптерин 620  
 4-Оксипикололиновая кислота 441  
 5-Оксипикололиновая кислота 418, 421, 428, 441  
 4-Оксипиперидин-2-карбоновая кислота 441  
 5-Оксипиперидин-2-карбоновая кислота 441  
 Оксипировиноградная кислота 250  
 n-Оксипировиноградная кислота 245  
 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Оксипрегнен-20-он 350  
 21-Оксипрогестерон 337, 344  
 11 $\alpha$ -Оксипрогестерон 337, 342, 344  
 14 $\alpha$ -Оксипрогестерон 337, 344  
 17 $\alpha$ -Оксипрогестерон 337, 342, 344  
 11 $\beta$ -Оксипрогестерон 337, 344  
 Оксипролин 400  
 $\alpha$ -Оксипропионамид 331  
 $\alpha$ -Оксипропиосирингон 331  
 2-Оксптеридин 621  
 4-Оксптеридин 621  
 6-Оксптеридин 620, 621  
 7-Оксптеридин 620, 621  
 бис- $\alpha$ -Оксистрептомициламин 644  
 Оксистрептомицин 644  
 3-Оксисульфаниламид 595  
 11 $\alpha$ -Окситестостерон 344  
 14 $\alpha$ -Окситестостерон 344  
 11 $\beta$ -Окситестостерон 344  
 5-Окси-1,2,3,4-тетрагидронафталин 81  
 6-Окси-1,2,3,4-тетрагидронафталин 81  
 Окситетрациклин 645, 646  
 Окситиамин 606, 609  
 дифосфат 609  
 Окситирамин 394  
 5-Окситриптами 203, 568, 569  
 5-Окситриптофан 569, 571, 573  
 1-Оксифеназин 587  
 4-Оксифенилацетон 331  
 Оксифенилмолочные кислоты 308—309  
 o-Оксифенилмочевина 393  
 Оксифенилпировиноградные кислоты 308—309  
 Оксифенилпропионовые кислоты 308—309  
 Оксифенилуксусные кислоты 308—309  
 7-Оксифлаванон 320—321  
 4'-Оксифлаван 318—319  
 5-Оксифлаван 318—319  
 7-Оксифлаван 318—319  
 8-Оксихинолин 415, 460, 669, 674—676, 678—680, 702  
 3 $\beta$ -Осихоленовая(5) кислота 355  
 Оксигеллюлоза 102, 103, 108, 213, 405  
 o-Оксицианнаяоглицин 309  
 Оксипитролелаль 379  
 $\alpha$ -[3 $\beta$ -Оксиэстратриен(5,7,9)-17-ил]-пропионовая кислота, метиловый эфир 355  
 3 $\beta$ -Оксиэтиленовая(5) кислота, метиловый эфир 355  
 5 $\beta$ -Оксиэтил-4-метилтиазол 609  
 ацетильные производные 609  
 3 $\beta$ -Оксиэтиобилиеновая(5) кислота 355  
 4-Окси- $\alpha$ -этоксипропиофенон 331  
 Оксониевые соли, образование 668  
 Октагидротриптофан 464  
 Октадециловый спирт 223  
 Октаметилпирофосфорамид 657  
 n-Октанал 228  
 Октанол 223  
 Олеандрин 367  
 Олеиновая кислота 234, рис. 128  
 галоидозамещенные 234  
 Олеодинальмитин 239  
 Олеодистеарин 239  
 Оливетолкарбоновая кислота 311  
 1—4 $\alpha$ -Олигосахарид 273  
 1—6 $\alpha$ -Олигосахарид 273  
 1—3 $\beta$ -Олигосахарид 273  
 Олигосахариды 260, 268, 277  
 Олово 667, 671, 675, 679, 685, 686, 693, 702  
 хлорид 385; 398, 681, 699, 740  
 Омыление растворителей 121  
 Опережающие тени 104, 152  
 Определение строения полисахаридов 293—297  
 — — — белков 465—494, 778—784

- Опрыскивание из пульверизатора 165  
 Опрыскивание хроматограмм 165  
 Оптические изомеры 74, 84, 297, 416, 426, 546, 700, 775  
 Оптические методы определения 181  
 Оранжевый II 664  
 Орсепин 548  
 Ориентмицин 638  
 Орнитин 404, 408, 409, 411, 418, 420—421, 424, 428, 430, 444, 466  
   N-ацетилпроизводное 441  
 Ороксиллин А 318—319  
 Орселиновая кислота 311  
 Ортоформ 393  
 Орцин 268, 304, рис. 140, 330, 733, 742  
 Орцин — серная кислота 167  
 Орциндикарбоновая кислота, монометиловый эфир 311  
 β-Орцинкарбоновая кислота 311  
 Осмий 677, 682, 699  
 Основная группа 78  
 Остол 329  
 Острутин 329  
 Относительная влажность 123  
 Отстающие тени 104, 152  
 Оуабайн 369, 370
- Палладий 671, 675, 676, 682, 698, 699, 705  
 Пальмитиновая кислота 234, рис. 128, 237  
 Панкреатин рис. 195, 723  
 Паноза рис. 107  
 Пантезин 393  
 Пантетеин 617  
 Пантоил-β-аланилцистеамин 616  
 Пантоилгидроксамовая кислота 617, 790  
 Пантокаин 393  
 Пантонин 439  
 Пантотеновая кислота 606, 615—617  
 Папаверин 537, 540, 544, 557  
 Параоксон рис. 235, 657  
 Паратион 656—658  
 «Партогрид» 143  
 Патулетин 318—319  
 Паулиозид 367  
 Пахикарпин 548  
 Пектин 500  
 Пектинэстераза 500  
 Пеларгонидин 325  
 Пеларгонидин-3-глюкозид 325  
 Пеларгонидин-3,5-диглюкозид 325  
 Пеларгонин 325  
 Пеларгоновая кислота 234, рис. 127  
 Пелентан 327, 329  
 α-Пельтатин А 307  
 α-Пельтатин В 307  
 β-Пельтатин А 307  
 Пенниклавин 544  
 Пеницилламин 409, 432, 446, 647  
 Пенициллин 639—643  
   биоавтография 753  
 Пентанон-3 228  
 3,3',4',5,7-Пентаоксифлавонон 320—321  
 Δ<sup>2</sup>-Пентениленициллин 640  
 n-Пентиламин 384  
 Пентотал 524  
 Пеонидин-3-глюкозид 325  
 Пеонидин-3,5-диглюкозид 325  
 Пеонин 325  
 Пепсин 468, 490, 784  
 Пептиды 458—494, 778—784  
 Перекись водорода 680, 682, 701, 702, 707  
 Перишлогенин 366  
 Перийодат 709  
 Перкаин 393  
 Перлон L 394  
   — U 394  
 Перманганат калия — бензидин 753  
 Перманганат K — формальдоксим 753  
 Перманганат калия — хлорирование 746  
 Перноктон 524  
 Персикт 279  
 Перхлорат 667, 709  
 β-Пиколин 560  
 γ-Пиколин 560  
 Пиколины 561  
 Пикрилхлорид 386, 387, 562, 564, 737  
 Пикролаппаконитин 552  
 Пикраподофиллотоксин 307  
 Пиловин 551  
 Пилокарпин 551, 552, 556  
 Пимпинелин 329  
 Пинакриптоловый желтый 590  
 Пинастровая кислота 316  
 Пинит 225, 226, 279  
 Пинобаксин 320—321  
 Пинозембрин 320—321  
 Пиоцианин 587  
 Пишеколиновая кислота 411, 418, 420, 441  
 Пиперазины 586  
 Пиперидин-2-карбоновая кислота 441  
 Пиперия 538, 552, 557  
 Пиперонал 331  
 Пипсиламинокислоты 203  
 Пиразолон, производные 585  
 Пиретриновая кислота 653  
 Пиретрины 653, 654  
 Пиретролон 653  
 Пиридин 560  
   альдегиды 561  
   производные 536, 560—566  
 Пиридин—уксусный ангидрид 243  
 Пиридин-2,3-дикарбоновая кислота 565  
 Пиридин-2,4-дикарбоновая кислота 565  
 Пиридин-2,5-дикарбоновая кислота 565  
 Пиридин-2,6-дикарбоновая кислота 565  
 Пиридин-3,4-дикарбоновая кислота 565  
 Пиридин-3,5-дикарбоновая кислота 565  
 Пиридин-2-карбоновая кислота 565  
 Пиридин-3-карбоновая кислота 565  
 Пиридин-4-карбоновая кислота 565  
 Пиридин-2,4,5-трикарбоновая K-та 565  
 Пиридоксаль 174, рис. 229, 614  
   оксим 614  
 Пиридоксамин 174, рис. 229, 614  
 Пиридоксин 174, 606, 608, рис. 229, 614  
 4-Пиридоксиновая кислота 614  
 Пиридоксол, см. Пиридоксин  
   Пиридоксолфосфат 614  
 Пиримидины 507—525, 745—747, 784—785

- Пировиноградная кислота 81, 147, 245, 249, 250, 389, 466  
 Пирогаллол 304—306, 680, 682  
 Пирокатехин 304—306, 326  
 Пирокатехиновый фиолетовый 682  
 Пирофосфат 518, 609  
 Пиррол, производные 578—581  
 Пирролидонкарбоновая кислота 411, 413, 418, 420  
 Плазматены 240  
 Плазмалогены 240, *см. также* Ацеталь-фосфолипиды  
 Плакальбумин *рис.* 190  
 Платина 671, 675, 677, 682, 698, 705  
 Поверхностные явления 138  
 Поверхность бумаги  
   «влажная» 687  
   «сухая» 687  
 Поглощение  
   в ультрафиолетовой области 161, 510, 511  
   воды бумагой 116  
    $\beta$ -излучения 161  
   инфракрасных лучей 161  
   света 161  
 Подвижная фаза 34, 40  
 Подготовка проб 92—96  
 Подофиллин, производные 307  
 Подофиллотоксин 307  
 Подставка 125, *рис.* 486  
 Подъем жидкости по капиллярам 62  
 Показатель преломления 164  
 Полиамиды 394  
 Полигалактуроназа 501  
 Полимиксины 646  
 Полиоксэтилен 380  
 Полисахариды 292  
   гидролиз 767  
   метилирование 767  
   определение величины молекулы 294  
   — строения 295  
   степень разветвления 294  
 Полиуретаны 394  
 Полифенолы 302  
 Половые приманки 176  
 Полоний 700  
 Полярность 67  
 Полярография 437, 505, 659, 683, 704, 705  
   *in situ* 187—188  
 Помещение для хроматографирования 155, 156  
 Порог чувствительности 198  
 Порошок «Солка-Флок» 213  
 Порфирины 577—581  
 Порфобилиноген 581  
 Посредники вегетативной нервной системы, указание 176  
 Постоянная бумаги 78, 79  
 Потенциал течения 63  
 Потенциометрические измерения 181, 187, 247  
 Празеодим 699  
 $\Delta^{4,17(20)}$ -Прегнадиен-11 $\beta$ ,21-диол-3-он 348  
 $\Delta^{1,4}$ -Прегнадиен-17 $\alpha$ , 21-диол-3,11,20-трион 344  
 $\Delta^{1,4}$ -Прегнадиен-3,20-дион 344  
 $\Delta^{4,6}$ -Прегнадиен-3,20-дион 344  
 $\Delta^{4,9}$ -Прегнадиен-3,20-дион 344  
 $\Delta^{4,18}$ -Прегнадиен-3,20-дион 344  
 $\Delta^{5,16}$ -Прегнадиен-3 $\beta$ -ол-20-он 344  
 $\Delta^{4,18}$ -Прегнадиен-11 $\alpha$ -ол-3,20-дион 348  
 $\Delta^{1,4}$ -Прегнадиен-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-3,20-дион 344, 348  
 Прегнап, производные 336, 337, 344, 348, 360—363  
 Прегнан-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -диол 344  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -диол-11,20-дион 348  
 5 $\beta$ -Прегнан-6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -диол-11,20-дион 348  
 Прегнадиолглюкуронид *рис.* 146, 362  
 5 $\alpha$ -Прегнан-3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -диол-20-он 348  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -диол-20-он 348  
 5 $\beta$ -Прегнан-17 $\alpha$ ,21-диол-3,11,20-трион 344, 348  
 5 $\beta$ -Прегнан-17 $\alpha$ ,21-диол-3,11,20-трионацетат 344, 348  
 5 $\alpha$ -Прегнан-3 $\beta$ -ол-20-он 342  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,19,21-пентол-20-он 345  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-тетрол-20-он 344  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-тетрол-20-онди-ацетат 344  
 Прегнан-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -триол 344  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-11,20-дион 344  
 5 $\alpha$ -Прегнан-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-11,20-дион-21-ацетат 348  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-11,20-дион-21-ацетат 348  
 5 $\beta$ -Прегнан-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-3,20-дион 344  
 5 $\beta$ -Прегнан-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-3,20-дион-ацетат 344  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-11,20-дионди-ацетат 344  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-11,20-дион-глюкуронидди-ацетат 362  
 5 $\beta$ -Прегнан-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,21-триол-20-он 344  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-11 $\alpha$ ,21-диол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-11 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -диол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-14 $\alpha$ ,21-диол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-15 $\alpha$ ,21-диол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-17 $\alpha$ ,21-диол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -диол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-6 $\beta$ ,17 $\alpha$ -диол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-6 $\beta$ ,21-диол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-11 $\beta$ ,21-диол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-11 $\beta$ ,21-диол-3,20-дион-21-ацетат 344, 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-15 $\alpha$ ,21-диол-3,20-дион-21-ацетат 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-17 $\alpha$ ,21-диол-3,20-дион-21-ацетат 348  
 $\Delta^{4}$ -Прегнен-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -диол-3,20-дион 344, 348

- $\Delta^4$ -Прегнен-17 $\alpha$ ,21-диол-3,11,20-трион 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-17 $\alpha$ ,21-диол-3,11,20-трион-21-ацетат 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-3,20-дион 336, 339, 340, 344, 348, 350, 360  
 $\Delta^4$ -Прегнен-21-ол-3,20-дион 337, 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-11 $\alpha$ -ол-3,20-дион 337, 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-14 $\alpha$ -ол-3,20-дион 337, 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-15 $\alpha$ -ол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-16 $\alpha$ -ол-3,20-дион 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-17 $\alpha$ -ол-3,20-дион 337, 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-6 $\beta$ -ол-3,20-дион 344  
 $\Delta^4$ -Прегнен-11 $\beta$ -ол-3,20-дион 337, 344  
 $\Delta^4$ -Прегнен-15 $\beta$ -ол-3,20-дион 344  
 $\Delta^5$ -Прегнен-3 $\beta$ -ол-20-он 340, 344  
 Прегненолонульфат рис. 146  
 $\Delta^4$ -Прегнен-17 $\alpha$ -ол-3,11,20-трион 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-6 $\beta$ -ол-3,11,20-трион 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-21-ол-3,11,20-трион 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-21-ол-3,11,20-трион-21-ацетат 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ ,21-тетрол 344  
 $\Delta^4$ -Прегнен-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ , 21-тетрол-3-он-21-ацетат 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-6 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-3,20-дион 344  
 $\Delta^4$ -Прегнен-11 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-триол-3,20-дион 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-триол-3,20-дион-21-ацетат 344, 348  
 $\Delta^4$ -Прегнен-3,11,20-трион 337, 339, 344  
 Предварительное фракционирование 131, 132  
 Препарат АКТГ 176, 505  
 Примулин 325  
 Принцип «все или ничего» 61, 499  
 Природные смолы 379  
 Проазулены 377—379  
 Проактиномицин 650  
 Проба Хальфена—Хикса 380  
 Пробы, нанесение 96—100  
     подготовка 92—96  
 Прогестерон 336, 337, 339, 340, 344, 348, 350, 360  
 Продольные полосы 154  
 Продукты присоединения с ацетатом ртути 762  
 Пролиларгинин 463  
 Пролилфенилаланин 463  
 Пролин 76, рис. 39, 134, 145, 291, 400—452, 648  
 Проминал 524  
 Пролингликокол 463  
 Пролинол 491  
 Пропандиолы 225  
 Пропанол рис. 123, 222  
 1-Пропанол 223  
 2-Пропанол 223  
*n*-Пропиламин 384, рис. 159  
 1,2-Пропиленгликоль 223, рис. 124  
 1,3-Пропиленгликоль 223  
 3-Пропилидол 569  
 6-Пропил-2-тиоурацил 521  
*n*-Пропилтиурониййодид 599  
 Пропилфенолы 307  
 $\Delta^4$ -17 $\beta$ -Пропионилоксиандростен-3-он 350  
 Пропионилхолин 386  
 Пропионовая кислота 234, рис. 127  
 Пропионовый альдегид 228, рис. 125  
 Пропитывающая вода 101  
 Пространственные затруднения 88  
 Протамин рис. 200, 505  
 Протамин-Zn-инсулин рис. 200  
 Протеазы 501  
 Протеиназы панкреатического сока, смесь 449  
 Протекание жидкостей через бумагу 63  
 Протовератрины 548, 552, 555, 556  
 Протоверин 548  
 Протоген, см. Тиооктиновая кислота  
 Протокатеховая кислота 304, 305, 309  
 Протопорфирин IX 577, 579  
     метилловый эфир 577  
 Проточные счетчики 199  
 Прохамазулены 379  
 Прохинин 552, 556  
 Прочный красный В 324  
 Прочный синий В 324  
 Прочный синий ВВ 324  
 Прочный черный К 324  
 Псевдобаптизин 322  
 Псевдогермин 548  
 Псевдолейцин 401  
 Псевдопельтьерин 539  
 Псевдопротоверин 548  
 Псевдозигадинин 548  
 Псикаиин 393  
 Псорален 329  
 Птеридин 621  
     производные 617—623, 789  
 Птеройлглутам- $\gamma$ -глутам- $\gamma$ -глутаминовая кислота 622  
 Птеройлглутам- $\alpha$ -глутаминовая кислота 622  
 Птеройлглутам- $\gamma$ -глутаминовая кислота 622  
 Птеройлглутаминовая кислота 622  
 Птерониновая кислота 621, 622  
 Птерородин 620  
 Пульвиновая кислота 316  
     ангидрид 316  
 Пурины 507—525, 745—747, 784—785  
 Пуромидин 647  
 Пурпурин 664  
 Путресцин 384  
 Пчелиный яд 505  
 Пятна на хроматограмме  
     вилообразные 154  
     двойные 151, 152  
     изменение порядка чередования 146  
     многократные одного и того же вещества 151  
     на стартовой линии 152  
     неидентифицированные 150  
     однородность 135  
     перенос на другую хроматограмму 136  
     поперечные 154

- продольные 153, 154  
укорачивание при повторном хро-  
мографировании 133  
форма 142, 531
- Радиоактивные вещества 195—205  
Радиометрические методы 181, 198—201  
  in situ 199  
  после элюирования 199  
Разделение 112—157  
  алкалоидов 531  
  белков 498  
  восходящее 126—128, 141  
  горизонтальное 128  
  градиентное 43, 59, 62, 138, 139  
  двумерное 134—136  
  круговое 129—131  
  между двумя стеклянными пластина-  
  ми 138, 139, 302, 304, 306  
  нисходящее 123—126, 127  
  повторное 132—134, 141, 142  
  противоточное 140  
  с перетеканием 123, 126, 128, 141,  
  211, 212  
  спиральное 129  
  сравнение способов 140, 141  
Рамнетин 318—319  
Рамноза 255, 270, 272, 285, 367  
Рампоновая кислота,  $\gamma$ -лактон 281  
Распределение противоточное 34, 36,  
54  
Распределительная хроматография на  
  бумаге 38, 43, 73—75, 254, 667, 670,  
  671  
Раствор Лугола 560, 719  
Раствор перекиси водорода 501  
Раствор Solacet Fast Blue 2BS 395  
Растворимость 113, 114, 119  
Растворители, обладающие одинаковой  
  гидрофильностью (гидрофобностью) 114,  
  115  
Растительные вирусы 505  
Растительные ингибирующие факторы,  
  обнаружение 174, 175  
Растительные ростовые факторы, обна-  
  ружение 174, 175  
Раувольсии 544  
Рафиноза 256, 262, 272, 274, 275  
Реактив  
  Бальета 368, 370  
  Бенедикта 317, 732  
  Вогес-Проскауэра 387, 739  
  Гануша 237  
  Гернгросса—Фосса—Герфельда, *см.*  
   $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтол  
  Гиббса 172, 302, 390, 594, 614, 730  
  Гмелина 582  
  Гроте 169, 242, 482, 523, 576, 600,  
  722  
  Дениже 654, 754  
  Дише 510, 746  
  Драгендорфа 170, 342, 384, 389, 392,  
  395, 522, 530—553, 586, 600, 657,  
  747  
  Жирана 342, 353, 355, 358  
  йодазидный 169, 415, 428, 481, 600,  
  616, 639, 751  
  Кзэки 386, 737  
  Краута — Драгендорфа 342  
  Майера 551, 748  
  меченый 204  
  Миллона 172, 303, 416, 731  
  молибденовый 614, 616, 656, 712, 728  
  Моргана — Элсона 265, 290, 292, 644,  
  729  
  Несслера 243, 414, 742  
  Паули, *см.* Диазотированная сульф-  
  аниловая кислота  
  Прохазки 749  
  Раймонда 367, 734  
  Ру 750  
  Сакагути 169, 387, 415, 417, 460, 475,  
  535, 644, 739  
  Сальковского 572, 749  
  с медной солью 746, 765  
  Уилсона 317, 732  
  Фолина 168, 302, 413, 509, 741  
  Фолина — Деняса 303, 415, 543, 614,  
  631, 731  
  Фолина — Чокальте 303, 730  
  Фучика и Коржистека 328, 732  
  Циммермана 358, 360, 361, 734  
  Шиффа 267, 586, 616, 724,  
  750  
  Шлезингера 582, 749  
  Шомодьи 259, 276, 500—501  
  Шомодьи — Нельсона 277  
  Эрлиха 171, 417, 581, 582  
  Яффе 147, 387, 573, 739  
Реакции в пламени 166  
Реакция  
  Берга 582  
  Бертетти 389  
  биуретовая 169  
  Витали-Морино 538  
  Карра — Прайса 603  
  Кёнига 171, 560, 561, 748  
  Либермана 342, 363, 368, 379, 735  
  Маршалла 619  
  мезобиливиолиповая 582  
  Ноллера 380, 736  
  Портера — Зильбера 363, 771  
  Римини 265, 270, 414, 725  
  с бромцианом 536  
  аминобензойной кислоты 536, 564  
  анилина 536  
  барбитуровой кислоты 536  
  бензидина 536  
  тиобарбитуровой кислоты 536  
  1-фенилметилпиразолона 536  
  тиокарбамидная 521, 746  
  Тормэлена 573  
  Цвиккера 746  
  Яновского 397  
Редкоземельные элементы 676, 682, 689,  
699  
Редуктивная кислота 630, 632  
Редуктон 630, 632  
Резерпин 543, 544, 552, 557  
 $\gamma$ -Резорциловая кислота, *см.* 2,5-Диокси-  
бензойная кислота

- Резорцин 304—306  
     диметиловый эфир 376  
 Резорцин 265, 268, 675  
 Резорциловые кислоты 303, 309  
 Рейфоллин 318—319  
 Ренат 710  
 Рений 710  
 Реннин 501  
 Рентгеновские лучи 161  
 Ресцинамин 543, 544  
 Ретамин 548  
 Ретенционный анализ 181, 247, 452, 505  
 Ретинен 603  
 Регулин 551  
 Рибаль 283  
 Рибоза 257, 272  
 Рибозофосфаты 289, 290  
 Рибонуклеиновая кислота 507, 784  
 Рибофлавин 153, 606, 608, 611, 628, 788  
 Рибофлавинилглюкозид 612  
 Рибофлавинмонофосфат 612  
 Рибулозодифосфат рис. 105  
 Ризоновая кислота 311  
 Ризоптерин 622  
 Робинетин 318—319  
 Робинин 320—321  
 Родамин В 224, 233, 236, 279, 657, 679, 723  
 Родамин G 236  
 Родамин 6GB 590  
 Родамин 3GO 379  
 Роданид 667, 708  
     аммонийнортутный 680, 702, 756  
 Роданистоводородная кислота 670  
 Родизонат 677, 681, 702  
 Родий 677, 698, 705  
 Родозамин 650  
 Родомицины 650  
 Родомициноны 650  
 Рокогенин 372  
 Ротан 655  
 Ртутная разрядная трубка низкого давления 162, 510, 523  
 Ртуть 670—672, 675, 676, 678, 685, 686, 690—692, 701, 702  
     — сернокислая 523  
 Ртуть азотнокислая — сульфид аммония 509, 519, 745  
 Рубеановодородная кислота 677, 678, 680, 695, 701  
 Рубиадин 664  
 Рубидий 681, 697  
 Рулоны фильтровальной бумаги 212, 215  
 Рутений 682, 698  
     хлорид 521  
 Рутин 320—321, 326  
 Рутонал 524  
  
 Салигенин 306  
 Салицилальдоксим 676—677  
 Салициловая кислота 84, 89, 269, 305, 308  
 Салицилоилхолин 386  
 Салицин 501  
 Салициназа 501  
  
 Сальвианин 325  
 Самарий 699  
 Сангвинарин 543  
 Сапогенины 372  
 Саркозин 418, 420, 428, 430, 444, 648  
 Сарментогенин 366  
 Сарментоза 367  
 Сарментоцимарин 367  
 Сарпагин 544  
 Сахара 254—297, 367, 725—729, 764—767  
     выделение 93, 405  
     лактоны 280  
     определение 765  
     разделение 292  
     ферментативное определение 727  
     фосфорные эфиры 265, 286  
 Сахарные кислоты 265, 280  
     ангидриды 282  
     эфиры 280  
 Сахароза 254—277, 285, 303, 430  
 Сахароспирты 265, 278  
 Свинец 667, 672, 674, 675, 678, 683, 685, 686, 688, 689, 691, 692, 701, 705, 712, 794  
     Pb<sup>210</sup> 202  
 Свободная вода в бумаге 75, 650  
 Связанные красящие вещества 310  
 Связь между строением и хроматографическим поведением веществ 64, 75—79, 230, 255, 311—312, 334—338, 366, 397, 400—403, 458, 527, 547—549, 566, 660  
 Себациновая кислота 246, 394  
 Седогептулозофосфат рис. 105  
 Селенит 710  
 Семикарбазид 248, 386  
 Сера S<sup>35</sup> 198, 203, 205  
 Серебро 671, 672, 675, 676, 678, 685, 686, 690, 691, 700, 701  
     Ag<sup>111</sup> 198  
 Серилгистидин 463  
 Серилгликокол 463  
 Серилсерин 463  
 Серилтирозин 463  
 Серилцистеиновая кислота 463  
 Серин 81, 134, рис. 105, 250, 263, 466, 467  
 Серинкефалин 241  
 Серинол 491  
 Серинфосфат 409  
 Серная кислота 242, 245, 246, 342, 353, 389, 550, 554—557, 679, 700, 719  
     Серная кислота — сода 747  
 Сероводород 674, 708  
 Серотонин, с.м. 5-Окситриптамин 568, 569, 573  
 Серпентин 543, 544  
 Сеселин 329  
 Силикат 709  
 Силы взаимодействия между атомами и молекулами 64  
 Симпатомиметические амины 394  
 Синальбин 600  
 Синеролон 653  
 Синигрин 600  
 Синнематин 642  
 Синтетические красители 660—665  
 «Синтетоликмизис» 26

- Сиреневая кислота 309  
Сиреневый альдегид 305, 330, 331  
Сирингил 331  
Сирингилацетон 331  
Сирингоилацетил 331  
Система Заффарони 346, 349  
Систематический анализ неорганических веществ 677  
— — алкалоидов 552—557  
Системы растворителей Буша 344—346, 349, 351  
Систокс 656—659  
Ситостерол 365  
 $\beta$ -Ситостерол 365  
Скандий 676, 699  
Скатола 568, 569, 573  
Сквален 379  
Скиммин 329  
Скополамин 529, рис. 211, 534, 537, 538, 552, 555  
Скополетин 329  
Скополин 529, 537  
Скорость продвижения белков 499  
Скорость потока растворителя 58, 104, 137, 144  
Смеси растворителей  
  выбор 112—122  
  вязкость 137  
  гидрофильные 114, 121  
  гидрофобные 114, 121  
  омыление 121  
  старение 148  
  этерификация 121, 148  
Содержание воды 147  
  влияние на величину  $R_f$  145  
Соединения, содержащие серу 590—600, 750, 787  
Соламаргин 551  
Соланидин 548, 551  
Соланин 548, 551  
Соласонин 551  
Сольватация белков 497  
Соль Грэхема 711, 712  
Соляная кислота 242, 303, 317, 324, 331, 572, 631, 682, 702, 727, 753  
Сомалин 366  
Сорбит 256, 278, 279  
Сорбоза 257, 269, 373  
Сорбция жидкости 101, 102  
Спартеин 529, 548, 550, 552, 555  
Спектрофотометрия 190  
Спектры поглощения непосредственно на бумаге 163, 184, 552—557  
Спермин 384  
 $\alpha$ -Спинастерол 365  
Спирты 721, 761  
Стабилизация окраски 412, 741  
Стахидрин 535  
Стеариновая кислота 234, рис. 128  
Степень разветвления полисах  
Стеркобилин 582  
Стеркобилиноген 582  
Стероидные алкалоиды 551  
Стероидные амины 352  
Стероидные гликозиды 335, 366—  
Стероидные кислоты 352—356  
Стероидные сапонины 372  
Стероидные эфиры, определение 771  
Стероиды 334—373, 733—736, 768—772  
  получение апетатов 769  
Стероиды 363—366  
Стигмастерол 365  
Стилопсидин 320  
Стилопсин 320  
Стильбены 312  
Стойкий красный АВ 664  
Стрептолины 646  
Стрептомицин 624, 638, 643—645  
Стрептонивидин 651  
Стрептотрицин 638, 644, 645  
Стрихнин 551  
Стрихнин 529, 551, 552, 556  
Стробозид 367  
Стронций 666, 675, 676, 681, 685, 686, 696, 697, 702  
Стропезид 371  
Структура инсулина 465  
Структурная форма сахаров  
  пиранозная 256  
  фуранозная 256  
Сужение диапазона длин волн 162  
Сукцинилдихолин, йодистоводородная соль 386  
N-Сукцинилтриптамин 569  
Сультон 592  
Сульфатуанидин 596, 597  
Сульфадиазин 597  
Сульфадимидин 597  
Сульфамеазин 597  
Сульфаметазин 596, 597  
Сульфаниламид 596, 597, см. также Ди-  
азотированный сульфаниламид  
Сульфанилацетамид 596, 597  
Сульфанилкарбамид 597  
Сульфаниловая кислота диазотированная 302, 303, 317, 417, 449, 460, 540, 572, 576, 578, 587, 729  
Сульфаниридин 597  
Сульфат 667  
Сульфат меди (II) 600, 751  
Сульфат меди (II)—аммонийнортутный роданид 680, 702, 756  
Сульфат меди (II)—пиридин—хинин 746  
Сульфат перия (IV) 169, 449, 452, 541, 542, 554—557, 743, 747  
Сульфат перия—арсенит натрия 449, 743  
Сульфатгазол 596, 597  
Сульфид 708, 709  
Сульфоокислот амиды 595—598  
7-Сульфометилксантоптерин 620  
Сульфониевые соли 600  
Сульфосалициловая кислота 89, 287, 742  
7-Сульфозилксантоптерин 620  
Сульфурейн 332  
Сульфуретин 322  
Сульфурил хлористый 328, 732  
Сумах 326  
Супрастерол II 365  
Сурьма 667, 675, 679, 685, 686, 689, 693, 701, 706, 794  
  определение 706, 794  
  пятихлористая 340

- Сурьма  
   треххлористая 317, 324, 340, 341, 352, 353, 363, 366, 368, 372, 377, 733  
 «Сухая» поверхность бумаги 687  
 Сухое молоко 501, 744  
 Сушильный шкаф 160, 166  
 Сферокарпин 548  
 Сферофолкарбоновая кислота 311  
 Сфингомиелин 239  
 Схионин 325  
 Сциллит 226  
 Сциллоидные гликозиды 368  
 Сцинтилляционные измерительные приборы 199  
 Сцинтилляционные счетчики жидкостные 199  
 Счетчик Гейгера—Мюллера 198, 199, 201, 449  
  
 Табтоксинин 439  
 Тагатоza 257, 272  
 Таксифолин 320—321  
 Таллий 661, 667, 675, 685, 690  
 Танпин китайский 326  
   турецкий 326  
 Таптал 712  
 Таурин 409, 411, 415, 418, 420, 424, 430, 431, 444, 446  
 Тауродезоксихолевая кислота 354  
 Таурохенодесоксихолевая кислота 354  
 Таурохолевая кислота 353—354  
 Тахистерол 365  
 Теанин 418, 420  
 Тебаин 531, 532, 537, 544, 552, 556  
 Теветин 367  
 Теветоза 367  
 Тектохризин 318—319  
 Теллуриг 710  
 Температура, влияние на величину  $R_f$  145  
   — при разделении 122, 214, 687  
 Температура плавления, связь с величиной  $R_f$  85  
 Теобромин рис. 202, 514—515, 522  
 Теория хроматографии 32—90  
   математическое описание 45  
 Теофилин 514—515, 522  
 Теревталевая кислота 398  
 Теревталевый альдегид 742  
 Термохроматография 26  
 Терпены 379  
 Террамицин 645  
 Тестостерон 339, 340, 344, 346, 350, 359  
 17 $\alpha$ -Тестостерон 339, 340, 359  
 Тетраацетат свинца 238, 267, 278, 723, 769  
 Тетрагидроберберин 542  
 Тетрагидрокарболин-3-карбоновая кислота 409—411  
 Тетрагидрокортизин 542  
 Тетрагидрокортизол 345, 361  
 Тетрагидрокортизон 345, 361  
 Тетрагидроптероилглутаминовая кислота 622  
 Тетрагидрострихнин 551  
 Тетрадеканол 223  
 Тетразол, производные 586  
 Тетразолий синий 266, 341, 342, 360, рис. 148, 720  
 Тетралин 376  
 2,3,4,6-Тетраметил-*d*-галактоза 285, 296  
 2,3,4,6-Тетраметилглюкоза 285, 294  
 2,3,5,6-Тетраметилглюкоза 285  
 Тетраметилглюкопираноза 284  
 2,3,4,6-Тетраметилманноза 285, 294  
 1,3,4,6-Тетраметилфруктоза 285  
 Тетраметилфруктопираноза 285  
 Тетраметилфруктофураноза 284  
 3',4',6,7-Тетраметоксинаурон 322  
 3',4,4',6-Тетраметоксibenзалькумаранон 322  
 3,3',5,5'-Тетра-(оксиметил)-4,4'-диоксидифенилметан (ДИМ-3) 306  
 2,4,6,7-Тетраоксиптеридин 621  
 Тетрафенилдиборокись 317, 324  
 Тетрациклин 645, 646  
 Технеций 710  
 Тиамин 169, 170, 606—610, 788  
   дисульфид 609  
   дифосфат 609  
   монофосфат 609  
   перевод в тиохром 751  
   полифосфат 609  
   трифосфат 609  
   фосфаты 606  
 Тиаминкарбоновая кислота 606  
 Тивелоза 272, 283  
 Тимидин 514—517  
   монофосфат 515  
 Тимин 514—517  
 Тимол 598  
 Тимоловый синий 235, 242, 664, 680, 743  
 Тимолфталеин 664  
 Тиоацетамид 679  
 Тиобарбитураты 523  
 Тиобарбитуровая кислота 536  
 Тиогидантоиновый метод 488—490, 783, 784  
 Тиодифенилкарбазон 523  
 Тиоктовая кислота 609—610  
   сульфоксид 609—610  
 Тиомолочная кислота 466  
 ✓Тиомочевина 598—600, 677, 682, 699  
 Тиомочевины N-замещенные 600  
 Тиосульфат 708  
 Тиоурацил 521  
 Тиохром 606, 607, 609, 610  
   дифосфат 609  
 Тирамин 384, 394  
 Тиреоглобулин 451  
 Тирозилгликокол 463  
 Тирозиллейцин 463  
 Тирозин 81, 95, рис. 39а, 134, 263, 466, 516  
 Тирозинол 491  
 Тирозин-3-сульфоная кислота 426  
 Тироксин 409, 448, 451  
   глюкуронид 450  
 Тирон 679  
 Тиронин 450

- Тироцидины 646  
 Титан 671, 673, 676, 680, 693, 694, 704, 705, 792—794  
     определение 792—794  
     хлорид 619, 631, 740  
 Титан треххлористый— $\alpha$ -нафтиламин 752  
 Титанил 667  
 Титрование 181, 188  
 Ткани, нанесение на хроматограмму 100  
 Тобияса кислота 592  
 окси-Тобияса кислота 592  
 Токол 605  
 Токоферол 365, 603—604  
     определение 788  
 Токсиферин 541  
 Токсичность производных паратиона 177  
 Толил-*пери*-кислота 592  
 Толуидин рис. 160  
*o*-Толуидин 269  
 Толуидиновый синий 293, 729  
*п*-Толуиловая кислота 37  
 Толуол 376  
 Толуолсульфокислота 594  
 Торий 676, 682, 699  
 Трегалоза 256  
 Треонилпролин 463  
 Треонилцистеиновая кислота 463  
 Треонин 134, рис. 96, 250, 291, 648  
 Треониол 491  
 $\Delta$ -Треонинфенилтиогидантоин 480  
 Триазины 586  
 3,4,16-Триацетилверацевин 528, 549  
 3,4,16-Триацетилцevin 528  
 3,4,16-Триацетилцevin-*d*-ортоацетат 549  
 2,4,5-Трибромимидазол 577  
 Триглицериды 239  
 Триглицокол 413  
 Тридеканон-2 228  
 3,3',5'-Трийодтиронин 448, 450  
 3,5,3'-Трийодтиронин 448, 450  
 Трийодтиронин, глюкуронид 450  
 Трийодтиронины 449  
 2-Трийодтироуксусная кислота 450  
 Трикарбаллиловая кислота 245  
 Трикарбоновые кислоты 241—247  
 Триялаурин 239  
 Триинолеин 239  
 Трииноленин 239  
 2,3,5-Триметиларабиноза 285  
 2,3,4-Триметилгалактоза 285  
 2,3,6-Триметилгалактоза 285  
 2,4,6-Триметилгалактоза 285  
 Триметиленгликоль 224  
 2,3,4-Триметилглюкоза 285  
 2,3,6-Триметилглюкоза 285, 294, 295  
 2,4,6-Триметилглюкоза 285  
 2,4,5-Триметилимидазол 577  
 $\alpha$ -Триметил- $\beta$ -(индолил-3)-пропиобетанин 568, 569  
 1,3,7-Триметилксантин рис. 202, 514, 522  
 2,3,4-Триметилксилоза 285  
 2,3,6-Триметилманноза 285, 294, 296  
 3,4,6-Триметилманноза 285  
 2,4,6-Триметилолфенол 306  
 2,3,4-Триметилрамноза 285  
 2,3,5-Триметилфенол 307  
 1,3,4-Триметилфруктоза 285  
 3,4,6-Триметилфруктоза 285  
 2,4,6-Триметил-5-этилфенол 307  
 Триметоксибензальдегид 331  
 4,4',6-Триметоксибензалькумаранон 322  
 Тримиристин 239  
 4,4',6-Триоксибензалькумаранон 322  
 2,4,6-Три-(2'-окси-5'-метилбензил)-фенол 306  
 4,6,7-Триоксиптеридин 621  
 2',3,4-Триоксикалкон 320—321  
 Триолеин 239  
 Триолы 225  
 Трипальмитин 239  
 Трипсин 448, рис. 194, 501  
 Триптамин 384, 420, 424, 568, 569  
 Триптофан 71, 169, 466, 568, 569, 571  
 Триптофана разложение 464  
 Триптофанилтриптофан 71  
 Триптофанол 568, 569  
 Тристеарин 239  
 Трифенилметановые красители 663  
 Трифенилтетразолий хлористый 168, 265, 266, 277, 281, 292, 361, 415, 549, 657, 720, 766  
 Трифосфоциридиннуклеотид 521  
 Трихлоруксусная кислота 368, 372, 736  
 Трицин 318—319  
 Триэтаноламин 385  
 Триэтиленгликоль 223  
 Тромбоцит 505  
 Тромексан 327  
 Тропакокаин 393, 537, 539  
 Тропеолин ОО 414, 742  
 Тропин 529, рис. 211, 537—539  
 Тубокурарин 552, 554  
 Тутокаин 393  
 Тяжелые металлы, каталитическое действие 136—137, 677  
 Углеводороды 376, 736  
 Углеводы 254—297  
 Углерод  $C^{14}$  197—199, 201, 203  
 Удаление  
     белков 92, 93, 403, 763, 764, 773  
     жиров 93, 404  
     мочевины 93, 405  
     неорганических солей 93, 404—406, 575, 618, 764, 773  
     сахаров 93  
 Уксусная кислота 232—235  
 Уксусный ангидрид — серная кислота 342, 353  
 Улигинозин 325  
 Ультрафиолетовое излучение 181  
     поглощение 161  
     спектрография 554—557  
     сужение диапазона длин волн 162  
 Ультрамикроскоп 162  
 Умбеллиферон 222, 242, 303, 307, 329  
 Ундекановая кислота 234  
 Ундеканон-2 228  
 Уран 675, 676, 682, 693, 694, 696, 699, 704, 705, 794  
     определение 791, 793

- Урацил 514—517  
 Урацилдезоксирибозид 514—515  
 Уреаза 501  
 Уридиловая кислота 508, 512—517  
 Уридин 145, 508, 514—517, 520  
 Уридиндифосфат 145, 520  
 Уридиндифосфоглюкоза рис. 105<sup>\*</sup>  
 Уридинмонофосфат 145, 514—516, 519  
 Уридинтрифосфат 519  
 Уробилин 581, 582  
 Уробилиноген 582  
 Урокановая кислота 95, 575, 577, 578  
 Уронид 281  
 Уроновые кислоты 257, 265, 276, 280—282, 291, 293  
 Уропорфирин I 577, 579, 580  
 метиловый эфир 577  
 Уропорфирин III 577, 580  
 метиловый эфир 577  
 Уротин 619  
 продукт окисления 619  
 Уротропин 677  
 Установление равновесия 33, 44, 55, 58, 118  
 Устройство для автоматического пуска хроматографирующего прибора 140  
 «Усы» 150, 151
- Фактор** Asp. nieger 615  
 группы 79  
 положения 79, 527, 528  
**Факторы**, влияющие на величину  $R_f$  143—145  
**Фаликаин** 393  
**Фанодорм** 523, 524  
**Феантин** 543  
**Фенилаланиларгинин** 463  
**Фенилаланилцистеиновая кислота** 463  
**Фенилаланин** рис. 39, 134, 145, 263, 459, 466  
**Фенилаланинол** 491  
**Фенилацетилглютамин** 444, рис. 184  
**Фенилгидразин** 386, 631, 752  
**Фенилгидроксиламин** 386  
**Фенилгликокол** 409, рис. 170  
**1-Фенил-2,3-диметил-4-аминопипразолон-5** 586  
**1-Фенил-2,3-диметил-4-ацетоксиацетил-аминопипразолон-5** 586  
**1-Фенил-2,3-диметил-4-диметиламинопипразолон-5** 586  
**1-Фенил-2,3-диметил-(диэтиламиноацетил-амино)-4-пипразолон-5** 586  
**1-Фенил-2,3-диметилпипразолон-5** 586  
*m*-Фенилендиамин 268, 280, 726  
*n*-Фенилендиамин—фталева кислота 341, 358, рис. 147, 734  
*o*-Фенилендиамин 171, 248, 280, 303, 631, 724, 753  
**Фенилендиамины** 390  
**Фенилизотиоцианатный метод** 479, 781  
**2-Фенилиндол** 561  
**Фенил-γ-кислота** 592  
**5-Фенилкумарин** 329  
**Фенил-Лаурента кислота** 592  
**1-Фенилметилпипразолон** 536  
**Фенилмочевина** 387  
**2-Фенилнафтол-1** 306  
**β-Фенил-β-оксиэтиламин** 384  
**Фенил-перу-кислота** 592  
**Фенилпировиноградная кислота** 245  
**Фенилпропионовая кислота** 305  
**Фенилсерин** 401, 430  
**Фенилтиогидантоиновый метод** 469, 479—484  
**Фенилтиокарбамилпроизводные (ФТК)** 480  
**Фенилуксусная кислота** 305  
**Фенилфенол** 86, 306  
**β-Фенилэтиламин** 384, 428  
**5-Фенил-5'-этилгидантоин** 585  
**Фенобарбитал** 524  
**Фенол** 306, 307, 380, 387  
 очистка 419, 774  
**Фенолальдегиды** 330—332  
**Фенол** — гипохлорит натрия 738  
**Феноловый красный** 267  
**Фенолокетоны** 330—332  
**Фенолфталеин** 242, 267, 664  
**Фенольные стероиды** 356—358  
**Фенолы** 301—332, 729—733  
 одноатомные 306  
 превращение в арилоксиуксусные кислоты 767  
**Феофитин**  
*a* 584  
*b* 584  
**Ферментативное разделение оптических антиподов** 416  
**Ферментативные методы проявления** 173—176, 181  
**Ферментативный гидролиз сахаров** 261, 764  
**Ферменты** 499 — 503  
 Инкубация 501  
 инаktivирование 502  
**Феррицианид** 708, 709  
**Феррицианид** — нитропруссид 303, 415, 417  
**Феррицианид** — соль железа(III) 169  
**Ферроцианид** 667, 709  
**Ферроцианид калия** — хлористый кобальт 385, 737  
**Ферулоилглицин** 309  
**Фиброин** 485  
**Физические способы обнаружения** 161—164  
**Филлоэритрин** 579  
**Филора HPW** 162, 163, рис. 86  
**Фильтр из стекла Вуда** 162, 163  
**Фитин** 225  
**Флавеолин** 650  
**Флавинадениндинуклеотид** 612  
**Флавоноиды** 310—326  
**Флавонол** 318, 320  
 агликон 318  
 гликозид 318  
**Флавононол** 320  
**Флавононы** 312, 313  
 агликоны 320  
 гликозиды 320

- Флавоны 312, 318, 322, 323  
     агликоны 318  
     гликозиды 312, 318  
 Флоретин 322  
 Флуоресценс 303, 377, 380, 398, 562, 708, 748  
 Флуоресценциновые красители 663  
 Флуоресценция 162—164, 186  
 Флуоресцирующие индикаторы 167, 242  
 Флуоресцирующий экран 523  
 Флюорокурарин С 541  
 Флюорокурин С 541  
 Флюорокуринин С 541  
 Фолиевая кислота 617—623  
 Формальдегид 228, рис. 239  
 Формальдегидные реактивы 573, 631, 749, 750  
 α-Формадиноглутаровая кислота 415  
 α-Формамидофенол 393  
 Формиат 708  
 5-Формилванилиновая кислота 331  
 N<sup>10</sup>-Формилптероилглутаминовая кислота 622  
 N<sup>6</sup>-Формилтетрагидроптероилдиглутаминовая кислота 622  
 N<sup>6</sup>-Формилтетрагидроптероилтриглутаминовая кислота 622  
 N<sup>10</sup>-Формилтетрагидроптероилглутаминовая кислота 622  
 N<sub>(10)</sub>-Формилфолиевая кислота 619  
 Формацидины 650  
 Фосфат фенолфалеина, натриевая соль 501, 744  
 Фосфатазы 287, 501, 502  
 Фосфатидилэтаноламин 239  
 Фосфаты неорганические 513, 518 520, 614, 667, 708, 710—712  
 Фосфиты 711  
 Фосфогликолевая кислота рис. 105  
 Фосфоглицериновая кислота (ФГК) 263, 287—289  
 6-Фосфоглюконовая кислота 289  
 Фосфеонопиравиноградная кислота рис. 105, 263, 289, 520  
 Фосфолипиды 239—241  
 2'-Фосфопантотеновая кислота 617  
 4'-Фосфопантотеновая кислота 616, 617  
 2',4'-Фосфопантотеновая кислота (цикл.) 617  
 Фосфор Р<sup>31</sup> 205  
     Р<sup>32</sup> 198, рис. 108, 201, 205  
 Фосфорилаза 501  
 Фосфорилхолин 239, 386  
 Фосфорная кислота рис. 108, 245, 246, 288, 289  
     см. также Фосфаты 339, 368, 389, 650, 733  
     эфиры 281, 286—290, 518—521  
     определение 766  
 Фосфорновольфрамовая кислота 303, 363, 535  
 Фосфорномолибденовая кислота 168, 240, 341, 354, 362, 372, 384, 385, 551, 614, 701, 723  
 Фотографирование хроматограммы 164, 173, 176  
 Фотокопии в ультрафиолетовом свете рис. 202  
 Фотометрия пятен 183—186  
 Фрамицетин 650  
 Фронт растворителя второй 42, 151, 531, 685, 687  
 Фронтальный анализ 22, 26, 42, 43, 48, 57, 154, 498  
 Фруктоза 254—277, 283, 430  
 Фруктоза — соляная кислота 303  
 Фруктозодифосфат 287—289, 518, 520  
 Фруктозо-6-фосфат 288, 289  
 d-Фруктопиранозо-d-фруктофураноза-1,2' : 2,1'-диангидрид 283  
 o-Фталевый альдегид 414, 742  
 Фталилгистидин 577  
     метиловый эфир 577  
 7-(γ-Фталимидо)-ацетонилксантоптерин 620  
 Фтиокол 605  
 Фториды 667, 708, 709  
 9α-Фтор-Δ<sup>4</sup>-11β,17α,21-триол-3,20-дион-21-ацетат 348  
 Фукоза 272  
 Фумаровая кислота 84, рис. 130, 245, 246, 263  
 Фурфурол рис. 125, 330, 368, 389, 736  
 Халконы 310, 320, 323  
 Хамазулен 377, 378  
 Хебулаговая кислота 326  
 Хебулиновая кислота 326  
 Хелеритрин 543  
 Хелилутин 543  
 Хелирубин 543  
 Хенодезоксиколовая кислота 353, 354  
 Химотрипсин 468  
 Хинализарин 669, 681, 682, 702  
 Хинидин 537, 539  
 Хинизарин 664  
 Хинин 537, 539, 552, 556  
 Хиноксалиновые производные 251, 280  
 Хинолины 560  
     производные 587  
 Хинолин-2,3-дикарбоновая кислота 565  
 Хинолин-3-карбоновая кислота 565  
 Хинотоксин 539  
 Хиодезоксиколовая кислота 354  
 Хлор Cl<sup>35</sup> 205  
 Хлор — йодистый калий 413  
 Хлорамин 368  
 Хлорамин — трихлоруксусная кислота 736  
 Хлорамфеникол 399, 638  
     глюкуронид 399  
 n-Хлоранилин 576  
 Хлорат 708, 709  
 Хлорбензол 376  
 Хлор-2,4-диоксibenзамид 393  
 α'-Хлор-δ-2,4-ДНФ-аминовалериановая кислота 474  
 Хлорид 667, 708, 709  
 Хлорид олова — йодид калия 677, 699, 755  
 Хлорирование 460, 503, 519, 522, 585, 721, 746

- Хлорное железо — красная кровяная соль 731  
 Хлорное железо — сульфосалициловая кислота 728  
 Хлорный фильтр 523  
 Хлорогенин 372  
 Хлорогеновая кислота 763  
 Хлорофилл *a* 584, 585  
 Хлорофилл *b* 584, 585  
 Хлорофиллин *a* 584  
 Хлорофиллин *b* 584  
 Хлортетрациклин 645, 646  
 Хлортиохром 606, 609  
 Хлортиамин 606, 609  
 Хлорфеноловый красный 664  
 Холевая кислота 342, 353—355  
 Холекальциферол 365  
 Холестан 364  
 5- $\beta$ -Холестан 351  
 Холестанол 365  
 Холестан-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триол 365  
 Холест-5-ен 365  
 $\Delta^4$ -Холестен 351  
 Холест-4-ен-3 $\beta$ ,6-диол 365  
 Холест-5-ен-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -диол 365  
 Холест-5-ен-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -диол 365  
 Холест-5-ен-3 $\beta$ ,24-диол 365  
 Холест-5-ен-3 $\beta$ ,25-диол 365  
 Холест-4-ен-3-он 350  
 Холестерин 340, 342, 350, 364, 365, рис. 149  
     ацетат 350, 364, 365, рис. 149  
     дибромид 365  
     капронат 364, 365, рис. 149  
     олеат 365  
     пальмитат 365, рис. 149  
     стеарат 365, рис. 149  
     формиат 365, рис. 149  
 Холин 170, 386, 606  
 Хонгелин 367  
 Хондрозамин 272, 291  
 Хондротинсульфат 293  
 Хризантемин 325  
 Хризантемовые кислоты 84, 653  
 Хризин 318—319  
 Хризофанол 664  
 Хром 667, 675, 676, 679, 685, 686, 693—695, 701, 704  
 Хромат 667, 708, 709  
 Хроматограммы  
     нанесение тканей 100  
     смешанные 147, 149  
     сушка 160  
     хранение 172, 173  
 Хроматографирование бактерий 505  
 Хроматография  
     автоматическая 138, 139  
     адсорбционная 24—26, 38, 43, 69, 71, 76, 151, 153  
     восходящая 126, 127, 141  
     высаливающая 40, 425, 497  
     горизонтальная 128, 138  
     двумерная 134—136, 141, 246, 429, 430  
     круговая модификация 141  
     диагональная рис. 62, 432  
     ионообменная 24, 26, 40, 43, 88—90, 425  
     классификация 37  
     круговая 129—131, рис. 58, 138, 141  
     «мультипликативная» 208, 210, 216  
     на бумаге, определение 21  
     непрерывная 215—216  
     нисходящая 123, 141  
     определение 32  
     «поверхностная» 110  
     препаративная 207—217  
     принципы 37  
     распределительная 26, 27, 38—43, 72—89  
     секторная 131  
     спиральная 129  
     фракционированная 133  
     химическая 39  
     электронообменная 39  
 Хроматопайл 209, 503  
 Хроматопах 210, 650  
 «Хроматостриш» 110  
 «Хроматотропные» соли 627  
 Хроматроповая кислота 677, 679, 680  
 Хромовая кислота, ангидрид 769  
  
 Цевагенин 548, 550  
 Цевадин 548, 552, 555  
 Цевацин 548, 552, 555  
 Цевин 528, 548, 549, 552, 554  
 Цезий 681, 697  
 Целлюлозные красители 663  
 Целлюлоновый светостойкий желтый Г 664  
 Целлюлоновый светостойкий красно-фиолетовый РН 664  
 Целлюлоновый светостойкий красный ГГ 664  
 Целлюлоновый светостойкий оранжевый ГР 664  
 Целлюлоновый светостойкий сине-зеленый 664  
 Целлобиоза 272  
 Целлюлоза  
     масляный эфир 758  
     структура 100  
     типа ЕСТЕОЛА 497  
     фосфорилированная 213  
 $\alpha$ -Целлюлоза 103  
 Целлюлозные колонки 207—217  
 Церейн 646  
 Церий 676, 682  
 Церийаммонийнитрат 243  
 Цернуозид 322  
 Цетиловый спирт 223  
 Цефалоспорин С 640, 642  
 Цефалоспорин N 640, 642  
 Цианидин 325  
     арабиноглюкозид 177  
     3-галактозид 325  
     3-гентиобиозид 325  
     3-глюкозид 325  
     3,5-диглюкозид 325  
     3-ксилоглюкозид 325  
     3-рамноглюкозид 325

- Цианин 325  
Циклогексанон 228, рис. 125  
Циклогексантетролы 226  
Циклогексантириолы 226  
Циклогексилфенолы 86  
Циклопентанон рис. 125  
Циклосерин 649  
Цимарин 367  
Цимароза 367  
Цимарол 367  
Цинк 191, 667, 674—676, 680, 685, 686, 688, 690, 695, 696, 700, 702  
    Zn<sup>69</sup> 202  
    хлористый 340, 733  
Цинкуранилацетат 681, 702  
Цинхонидин 537, 539  
Цинхонин 537, 539  
Цирконий 676, 682, 699  
Цирконилхлорид 317, 323, 732  
Цирконилхлорид — лимонная кислота 317  
Циркулин 646  
Цистамин 428  
Цистатионин 409, 415, 418, 428, 432  
Цистеамин 617  
Цистеилаланин 462  
Цистеилвалин 462  
Цистеилгликокол 462  
Цистеилглутаминовая кислота 462  
Цистеилфенилаланин 462  
Цистеин 134, 204, 464, 466, 467  
Цистеиновая кислота 409, 410, 415, 418, 420, 424, 427, 428, 459, 464  
«Цистеинсульфовая» кислота 415, 418, 428  
Цистин 81, 204, 464, 465, 466  
Цитидиловая кислота рис. 108, 508, 513—516, 520  
Цитидин 508, рис. 202, 514—517  
Цитидинмонофосфат 513—516, 520, 521  
Цитизин 548, 550  
Цитозин рис. 202, 514—517  
Цитовиндезоксирибозид 514—516  
Цитохром 492  
Цитраконовая кислота 84, 245  
Цитраль 379  
Цитронелаль 379  
Цитрулин 409, 410, 415, 418, 420—421, 424, 428, 430, 441, 447, 466  
  
Чернила 661, 662  
  
Шиффовы основания 414  
Шприц медицинский 98  
Штемпельные краски 661  
  
Щавелевая кислота 244, рис. 130, 246  
Щавелевоуксусная кислота 245, 249, 251  
Щавелевоянтарная кислота 253  
Щелочноземельные металлы 676, 682, 685, 686  
Щелочные металлы 676, 682, 684—686  
  
Эвгенол 330  
Эверниновая кислота 311  
Эвипал 524  
Эйкодал 534  
Эквиленин 340, 341, 357  
Эквилининацетат 342  
Эквилин 340, 341, 357  
Экгонин 529, 537, 539, 552, 554  
Экспозиция время 197  
Элаидиновая кислота 234  
Электродиализатор 93—95  
Электрокинетический ультрафильтрационный анализ 40  
Электролиз 682, 683  
Электрофорез на бумаге 40, 168  
Электрохроматография 40  
Элимоклавин 544, 545, 552  
Эльдорал 524  
Элюентное проявление 27, 42, 43, 57, 58  
Элюотропный ряд растворителей 71, 112, 113, 114  
Элюционная способность растворителей 69  
Элюция, см. Вымывание  
Элюция с бумаги 177—179  
Эметин 552, 556  
Эмодин 664  
Эмпетрин 325  
Эндрин 655  
Энеапептид 492—494  
Энин 325  
Энниатины 646  
Энсатин 325  
Эография 26  
Эозин 503, 509  
    — метилоранж 745  
    — двухлористая ртуть 509, 745  
Эпанорин 316  
Эпикатехин 177, 326  
Эпикатехингаллат 326  
Эпоксиды, получение 771  
Эрбий 699  
Эргобазин 544, рис. 215, 546, 552  
Эргобазинин 546, 552  
Эргогексин 547  
Эргогептин 547  
Эргозин 544, 546, рис. 215, 552  
Эргокальциферол 365  
Эргокорнин 544, рис. 215, 546, 552  
Эргокорнинин 544, 552  
Эргокриптин 533, 544, рис. 215, 552  
Эргокриптинин 544, 552  
Эргокристин 544, рис. 215, 546, 552  
Эргокристинин 544, 552  
Эргостерол 340, 365  
Эрготамин 533, 544, рис. 215  
Эрготаминин 533, 544, рис. 215  
Эриодиктиол 320  
Эриохромцианин 236, 364, 735  
Эритрит 279  
Эритромицин 649  
Эритроптерин 620  
Эритроциты 505  
Эруковая кислота 234  
Эскулетин 329  
Эскулин 329  
Эстрадиол 339, 357

- 17 $\beta$ -Эстрадиол 339, 342, 356, рис. 144  
 Эстриол 339, 340, 356, 357  
 Эстрогены 343  
 Эстрон 339, 340, 356, 357  
 Этаноламин 384, 408, 443, 446  
 Этаноламинофосфорная кислота 408, 444  
 Этерификация растворителей 121, 148, 244  
 Этиламин 383, 384  
 Этилванилин 331  
 1-Этилгликоциамидия 388  
 Этиленгликоль 223, 224  
 Этилендиамин 384  
 1-Этилиден-2-метил-7-метокси-1,2,3,4-тетрагидрофенантрен-2-карбоновая кислота 355  
 5-Этил-5'-изоамилбарбитуровая кислота 524  
 Этилизотиурониййодид 599  
 7-Этилксантонтерин 620  
 5-Этил-5'-(1-метилбутил)-барбитуровая кислота 524  
 Этилметилбутилтиобарбитуровая кислота 524  
 Этилморфин 537, 552, 556  
 О-Этил-О,О-бис-(*n*-нитрофенил)-тиофосфат рис. 235  
 S-Этил-О,О-бис-(*n*-нитрофенил)-тиофосфат рис. 235  
 О-Этил-О,О-бис-(*n*-нитрофенил)-фосфат рис. 235  
 Этиловый спирт 222, 223  
 Этиловый эфир бис-(3-хлор-2,4-дикетохроманил-3)-уксусной кислоты 536  
 S-Этилпаратрион 658  
 5-Этил-5'-пиридинилбарбитуровая кислота 524  
 3-Этилпирокатехин 306  
 4-Этилпирокатехин 306  
 Этилтиурониййодид 599  
 N-Этилтриптамин 569  
 5-Этил-5'-фенилбарбитуровая кислота 524  
 Этилфенолы 86, 307  
 Этилфруктозиды 257, 260  
 $\beta$ -Этилфруктофуранозид 261  
 5-Этил-5'-циклогексенилбарбитуровая кислота 524  
 5-Этил-5'-циклогептилбарбитуровая кислота 524  
 $\Delta^4$ -17 $\alpha$ -Этинил-17 $\beta$ -оксандростен-3-он 350  
 17-Этинилэстрадиол 358  
 Этионин 428, 430  
 1-Этокс-1(4-окси-3,5-диметоксифенил)-пропанон-2 331  
 1-Этокс-1(4-оксифенил)-пропанон-2 331  
 $\alpha$ -Этоксипропиосирингон 331  
 Эукаин 393  
 Эуваркон 524  
 Эфедрин 384, 530, 534, 552, 554  
 орто-Эффект 81, 84, 301, 311  
 Эхубозид 367  
 Яблочная кислота 81, рис. 105, рис. 130, 245, 246, 263  
 Янтарная кислота 81, рис. 130, 246, 263  
 семнальдегид 245, 250

## Содержание

Предисловие . . . . .	5
Предисловие ко второму чешскому изданию . . . . .	7
Перечень сокращений и символов . . . . .	9

### Общая часть

Некоторые сведения из истории хроматографии на бумаге ( <i>И. М. Хайс</i> ) . . .	21
Капиллярный анализ — предвестник хроматографии на бумаге . . . .	21
Колоночный хроматографический адсорбционный метод <i>М. С. Цвета</i> . . .	24
Распределительная хроматография . . . . .	26
Дальнейшее развитие хроматографии на бумаге . . . . .	28
Литература . . . . .	29
Принципы и теория хроматографии на бумаге ( <i>А. Токиштейн, И. Деоржан, И. М. Хайс</i> ) . . . . .	32
Введение . . . . .	32
Сущность хроматографии на бумаге и ее модель . . . . .	32
Классификация и принципы хроматографических методов . . . . .	37
Проблемы теории хроматографии . . . . .	44
Математическое описание хроматографического процесса . . . . .	45
Решение основного уравнения для системы, содержащей один компонент	45
Способ получения хроматограмм для систем, состоящих из нескольких	
разделяемых компонентов . . . . .	56
Протекание жидкости через бумагу . . . . .	62
Связь между строением и хроматографическим поведением веществ. Типы	
хроматографии . . . . .	64
Силы взаимодействия между атомами и молекулами . . . . .	64
Адсорбционная хроматография . . . . .	69
Распределительная хроматография . . . . .	72
Ионообменная хроматография . . . . .	88
Литература . . . . .	90
Подготовка и нанесение проб. Бумага . . . . .	92
Подготовка проб ( <i>И. М. Хайс</i> ) . . . . .	92
Нанесение проб ( <i>И. М. Хайс</i> ) . . . . .	96
Бумага ( <i>Р. Коноп, К. Мацек, И. М. Хайс</i> ) . . . . .	100
Свойства хроматографической бумаги . . . . .	102
Сравнение сортов хроматографических бумаг . . . . .	105
Модифицированная бумага . . . . .	107
Прочие листовые материалы . . . . .	110
Литература . . . . .	110
Разделение . . . . .	112
Выбор системы растворителей ( <i>К. Мацек, Ж. Прохазка</i> ) . . . . .	112
Системы растворителей и их свойства . . . . .	112
Техника разделения ( <i>К. Мацек, И. М. Хайс</i> ) . . . . .	122

Методы с различным направлением движения . . . . .	123
Различные специальные способы . . . . .	136
Сравнение отдельных способов . . . . .	140
Положение и форма пятен (И. М. Хайс) . . . . .	142
Определение и измерение $R_f$ . . . . .	142
Влияние различных факторов на величину $R_f$ . . . . .	143
Значение $R_f$ . . . . .	149
Нарушения и погрешности при хроматографии . . . . .	150
Лаборатории для хроматографирования на бумаге и их оборудование (И. М. Хайс) . . . . .	155
Литература . . . . .	157
Обнаружение (проявление) и определение разделенных веществ (И. М. Хайс) . . . . .	160
Методы обнаружения . . . . .	161
Физические способы обнаружения . . . . .	161
Обнаружение с помощью химических реакций . . . . .	164
Ферментативные и биологические способы проявления . . . . .	173
Элюция с бумаги (И. М. Хайс) . . . . .	177
Количественное определение (И. М. Хайс, П. Зуман) . . . . .	180
Методы количественного определения in situ (непосредственно на хроматограмме) . . . . .	182
Методы с применением элюирования . . . . .	189
Литература . . . . .	192
Хроматография радиоактивных веществ на бумаге (И. М. Хайс) . . . . .	195
Нанесение . . . . .	196
Авторадиография . . . . .	197
Радиометрические методы . . . . .	198
Применение фильтров и характеристик распада для идентификации веществ . . . . .	201
Применение в аналитической химии . . . . .	202
Литература . . . . .	205
Препаративная хроматография на бумаге и на целлюлозных колонках (Ж. Прохазка, М. Кутачек) . . . . .	207
Препаративное разделение на листах бумаги . . . . .	207
Столбики, пачки и рулоны фильтровальной бумаги . . . . .	209
Колонки из порошкообразных материалов . . . . .	212
Непрерывная хроматография . . . . .	215
Вспомогательные приспособления для нанесения . . . . .	216
Литература . . . . .	217

### Специальная часть

Спирты (К. Мацек) . . . . .	221
Алифатические спирты . . . . .	221
Алициклические многоатомные спирты . . . . .	225
Литература . . . . .	226
Альдегиды и кетоны (К. Мацек) . . . . .	227
2,4-Динитрофенилгидразоны . . . . .	227
Другие производные . . . . .	229
Литература . . . . .	229
Алифатические кислоты (К. Мацек, Ч. Михалец) . . . . .	230
Низшие жирные кислоты . . . . .	232
Высшие жирные кислоты . . . . .	235

Глицериды . . . . .	238
Фосфолипиды . . . . .	240
Оксикислоты, дикарбоновые и трикарбоновые кислоты . . . . .	241
Кетокислоты . . . . .	247
Литература . . . . .	251
Углеводы ( <i>К. Мацек</i> ) . . . . .	254
Связь между структурой (строением) сахаров и величиной $R_f$ . . . . .	254
Методика определения . . . . .	258
Простые сахара . . . . .	264
Проявление . . . . .	264
Системы растворителей . . . . .	270
Количественный анализ . . . . .	274
Производные сахаров и замещенные сахара . . . . .	278
Сахароспирты . . . . .	278
Сахарные кислоты и лактоны . . . . .	278
Ангидриды сахаров, дезоксисахара и гликали . . . . .	282
Метилированные сахара и метилгликозиды . . . . .	283
Фосфорные эфиры . . . . .	286
Аминосахара . . . . .	290
Другие производные сахаров . . . . .	292
Полисахариды . . . . .	292
Хроматография на бумаге полисахаридов . . . . .	292
Определение строения полисахаридов . . . . .	293
Заключение . . . . .	296
Литература . . . . .	297
Фенолы и ароматические кислоты ( <i>Ж. Прохазка</i> ) . . . . .	301
Вещества фенольного характера (за исключением флавоноидов) и ароматические кислоты . . . . .	301
Флавоноиды . . . . .	310
Кумарины . . . . .	326
Феюлальдегиды и фенолокетоны. Лигнины . . . . .	330
Литература . . . . .	332
Стероиды ( <i>О. Сибликова</i> ) . . . . .	334
Связь между строением стероидов и значением $R_f$ . . . . .	334
Методика . . . . .	338
Обнаружение . . . . .	338
Системы растворителей . . . . .	343
Количественный анализ . . . . .	352
Отдельные группы стероидов . . . . .	352
Стероидные амины . . . . .	352
Желчные и другие стероидные кислоты ( <i>Ч. Михалец</i> ) . . . . .	352
Фенольные стероиды . . . . .	356
Производные андростана . . . . .	358
Производные прегнана . . . . .	360
Стероиды и калциферолы ( <i>Ч. Михалец</i> ) . . . . .	363
Стероидные гликозиды и их генины ( <i>Э. Юнг</i> ) . . . . .	366
Литература . . . . .	373
Углеводороды и некоторые другие липофильные вещества ( <i>О. Сибликова</i> ) . . . . .	376
Ароматические углеводороды . . . . .	376
Азулены и проазулены . . . . .	377
Терпены . . . . .	379
Смолы . . . . .	379
Полиоксиэтилен . . . . .	380

Литература . . . . .	381
Алифатические и ароматические амины ( <i>И. Гаспарич</i> ) . . . . .	382
Алифатические аминосоединения . . . . .	383
Алкиламины . . . . .	383
Диамины . . . . .	385
Аминоспирты, их сложные эфиры и четвертичные аммониевые соли . . . . .	385
Гидроксиламин и гидразин . . . . .	386
Мочевина и ее производные . . . . .	386
Гуанидиновые производные . . . . .	387
Ароматические амины . . . . .	389
Аралкиламины . . . . .	394
Полиамиды и их компоненты ( <i>К. Мацек</i> ) . . . . .	394
Литература . . . . .	395
Нитросоединения ( <i>Я. Франц</i> ) . . . . .	397
Связь между структурой и хроматографическим поведением . . . . .	397
Литература . . . . .	399
Аминокислоты ( <i>И. М. Хайс</i> ) . . . . .	400
Связь между структурой и хроматографическим поведением аминокислот . . . . .	400
Методика . . . . .	403
Приготовление образцов . . . . .	403
Нанесение образцов. Бумага . . . . .	406
Обнаружение . . . . .	407
Системы растворителей . . . . .	417
Определение некоторых аминокислот по реакциям, проведенным перед хроматографированием . . . . .	431
Количественный анализ . . . . .	433
Непосредственное определение аминокислот на бумаге . . . . .	434
Определение после разделения на бумаге и элюирования . . . . .	436
Перевод аминокислот в производные перед хроматографированием . . . . .	438
Применение на практике . . . . .	438
Аминокислоты микроорганизмов . . . . .	439
Аминокислоты в растительном материале . . . . .	439
Свободные аминокислоты, содержащиеся в животном организме . . . . .	441
Галогенированные аминокислоты . . . . .	447
Литература . . . . .	452
Пептиды и изучение строения белков ( <i>Б. Мелонн</i> ) . . . . .	458
Пептиды . . . . .	458
Химическое исследование строения белков и пептидов . . . . .	465
Гидролиз . . . . .	466
Метод фракционирования . . . . .	468
Определение концевых групп в белках и пептидах . . . . .	469
Определение N-концевых аминокислот . . . . .	469
Определение C-концевых аминокислот . . . . .	485
Пример определения последовательности аминокислот в пептидах . . . . .	492
Литература . . . . .	494
Белки ( <i>К. Мацек</i> ) . . . . .	497
Ферменты . . . . .	499
Другие белки . . . . .	503
Литература . . . . .	506
Пурины, пиримидины, азотсодержащие компоненты нуклеиновых кислот ( <i>З. Падр</i> ) . . . . .	507
Приготовление образцов . . . . .	507
Обнаружение . . . . .	509

Системы растворителей . . . . .	511
Количественный анализ . . . . .	517
Закключение . . . . .	517
Аденозинполифосфорные кислоты . . . . .	518
Серусодержащие производные пуринов и пиримидинов . . . . .	521
Производные ксантина . . . . .	521
Барбитураты . . . . .	522
Мочевая кислота . . . . .	525
Литература . . . . .	525
Алкалоиды (К. Мацек) . . . . .	527
Алкалоиды, не содержащие гетероциклического азота . . . . .	534
Производные пиррола . . . . .	535
Производные пиридина . . . . .	536
Алкалоиды с конденсированными пирролидиновыми и пиперидиновыми циклами . . . . .	538
Алкалоиды, содержащие хинолиновый цикл . . . . .	539
Алкалоиды, содержащие изохинолиновый цикл . . . . .	540
Производные индола . . . . .	543
Прочие группы алкалоидов . . . . .	547
Систематический анализ . . . . .	552
Литература . . . . .	557
Другие гетероциклические соединения, содержащие азот . . . . .	560
Производные пиридина (К. Мацек) . . . . .	560
Алкилпиридины . . . . .	560
Альдегиды и кетоны пиридиновых оснований . . . . .	561
Пиридинкарбоновые кислоты . . . . .	561
Производные пиридинкарбоновых кислот . . . . .	563
Производные индола (Ж. Прогазка) . . . . .	566
Имидазолы (А. Женишек) . . . . .	575
Производные пиррола (А. Комаркова) . . . . .	578
Порфирины . . . . .	578
Порфобилиноген . . . . .	581
Красители, содержащиеся в желчи . . . . .	581
Красящие вещества, содержащиеся в листьях растений (Ч. Михалец) . . . . .	583
Другие группы веществ (К. Мацек) . . . . .	585
Литература . . . . .	587
Органические соединения, содержащие серу (И. Гаспарич) . . . . .	590
Алкилсульфаты . . . . .	590
Сульфокислоты . . . . .	590
Амиды сульфокислот . . . . .	595
Тиомочевина и ее производные . . . . .	598
Сульфониевые соли . . . . .	600
Литература . . . . .	600
Витамины (И. М. Хайс) . . . . .	602
Жирорастворимые витамины . . . . .	602
Каротиноиды и витамины группы А . . . . .	603
Витамины группы Е . . . . .	603
Витамины группы К . . . . .	605
Витамины группы В . . . . .	606
Тиамин . . . . .	606
Тиоктовая кислота . . . . .	610
Рибофлавин . . . . .	610
Пиридоксин . . . . .	614

Биотин . . . . .	615
Пантотеновая кислота и кофермент А . . . . .	615
Фолиевая кислота и птеридиновые производные ( <i>К. Славик</i> ) . . . . .	617
Группа витамина В <sub>12</sub> ( <i>В. Рабек</i> ) . . . . .	623
Аскорбиновая кислота и родственные ей соединения ( <i>Ж. Прохазка</i> ) . . . . .	629
Литература . . . . .	634
Антибиотики ( <i>М. Догнал, И. М. Хайс</i> ) . . . . .	637
Пенициллины . . . . .	639
Группа стрептомицина . . . . .	643
Антибиотики группы тетрациклина . . . . .	645
Пептидные антибиотики . . . . .	646
Прочие антибиотики . . . . .	649
Литература . . . . .	651
Инсектициды ( <i>В. Батора</i> ) . . . . .	653
Пиретрины . . . . .	653
Хлорированные углеводороды . . . . .	654
Органические соединения фосфора . . . . .	656
Литература . . . . .	659
Синтетические красители ( <i>Я. Франц</i> ) . . . . .	660
Литература . . . . .	665
Неорганические вещества ( <i>Б. Качач</i> ) . . . . .	666
Катионы . . . . .	672
Приготовление образцов . . . . .	672
Техника хроматографического разделения . . . . .	673
Качественный анализ . . . . .	690
Количественный анализ . . . . .	703
Анионы . . . . .	706
Заключение . . . . .	712
Литература . . . . .	713

### Методики

Проявляющие реактивы ( <i>Д</i> ) ( <i>Составил К. Мацек</i> ) . . . . .	719
Реактивы общего значения . . . . .	719
Спирты . . . . .	721
Альдегиды и кетоны . . . . .	722
Алифатические кислоты . . . . .	722
Углеводы . . . . .	725
Фенолы и ароматические кислоты . . . . .	729
Стероиды . . . . .	733
Углеводороды и другие липофильные соединения . . . . .	736
Алифатические и ароматические амины . . . . .	737
Нитросоединения . . . . .	740
Аминокислоты . . . . .	740
Белки и ферменты . . . . .	743
Пурины, пиримидины, азотсодержащие компоненты нуклеиновых кислот . . . . .	745
Алкалоиды . . . . .	747
Другие гетероциклические соединения, содержащие азот . . . . .	748
Органические соединения, содержащие серу . . . . .	750
Витамины . . . . .	751
Антибиотики . . . . .	753
Инсектициды . . . . .	753

---

Неорганические вещества . . . . .	755
Подготовка проб, пропитка бумаги, системы растворителей и количественное определение (II) . . . . .	757
Бумага . . . . .	757
Выбор системы растворителей . . . . .	758
Хроматография на колонке . . . . .	760
Спирты . . . . .	761
Алифатические органические кислоты . . . . .	762
Углеводы . . . . .	764
Фенолы и ароматические кислоты . . . . .	767
Стероиды . . . . .	768
Амины . . . . .	772
Аминокислоты . . . . .	773
Пептиды и изучение строения белков . . . . .	778
Пурины, пиримидины, азотсодержащие компоненты нуклеиновых кислот	784
Алкалоиды . . . . .	785
Другие гетероциклические соединения, содержащие азот . . . . .	787
Органические соединения, содержащие серу . . . . .	787
Витамины . . . . .	788
Антибиотики . . . . .	790
Неорганические вещества . . . . .	791
Авторский указатель . . . . .	795
Предметный указатель . . . . .	812

## **ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ**

Редактор **И. В. Алексеева**  
Художник  
**М. В. Борисова-Мусатова**  
Художественный редактор  
**Е. И. Подмарькова**  
Технический редактор **М. А. Белева**  
Корректоры **Е. В. Кочегорова**  
и **Е. Г. Литвак**

Сдано в производство 26/IV 1962 г.  
Подписано к печати 25/IX 1962 г.  
Бумага 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>==28 бум. л.  
76,7 печ. л., в т/ч. 22. вкл.  
Уч. изд. л. 70,3. Изд. № 3/0301  
Цена 5 р. 24 к. Зак. 252

---

ИЗДАТЕЛЬСТВО  
ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ  
Москва, 1-й Рижский пер., 2

---

Московская типография № 5  
Мосгорсовнархоза  
Москва, Трехпрудный пер., 9

52.24x.