

В. Д. Красиков

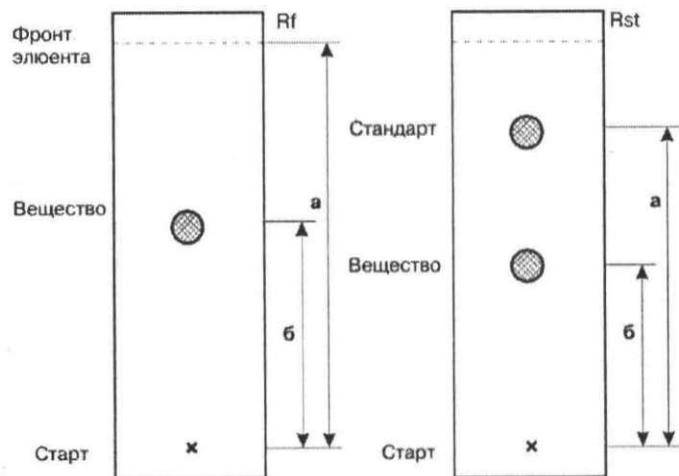
**Основы планарной  
хроматографии**



ХИМИЗДАТ

**Исправления и замечания:**

- 1) стр. 11.: НТД – нормативно-техническая документация.
- 2) Стр14.: Исправлена схема (Rst):



- 3) стр.16. рис.1.3: на оси абсцисс:  $10^{-1} L$ , мм.
- 4) стр.37. табл.1.4: в колонках с 3 по 6 величины в первой строке выражены не в нм, а в ангстремах.

Красиков В. Д.

К 780 Основы планарной хроматографии. – СПб.: ХИМИЗДАТ, 2005. – 232 с. + 8 цв. вкл.: ил.  
ISBN 5–93808–106–8

Представлены методы, используемые в планарной хроматографии (современной тонкослойной хроматографии). Рассмотрены подвижные и неподвижные фазы, методы нанесения растворов аналитов на пластинки и элюирования, стратегия выбора мобильной фазы для разделения сложных смесей с максимальной эффективностью и селективностью, обнаруживающие реагенты и способы нанесения их на хроматограммы.

Большое внимание уделено количественному определению содержания веществ в хроматографических зонах (сканирующие денситометры и видеосистемы) и анализу причин погрешностей, которые могут возникнуть при проведении анализа, а также сведениям о валидации аналитических методов, включая метод планарной хроматографии. Приведены методики разделения и количественного определения большого количества соединений, принадлежащих к различным классам, и метрологические характеристики этих методик. Особую ценность представляют словари терминов, используемых в планарной хроматографии.

Предназначена для широкого круга специалистов, интересующихся применением планарной хроматографии в органической, биологической и медицинской химии, биотехнологии, пищевой, фармацевтической и химической промышленности. Может представить интерес в качестве учебного пособия для аспирантов и студентов старших курсов высших учебных заведений.

К 1707000000–016  
050(01)–2005 Без объявл.

ISBN 5–93808–106–8

© Красиков В. Д., 2005  
© ХИМИЗДАТ, 2005

Ст автора	6
Предисловие	8
Словные обозначения и сокращения	11
<b>Глава 1. ВВЕДЕНИЕ В ТОНКОСЛОЙНУЮ (ПЛАНАРНУЮ) ХРОМАТОГРАФИЮ</b>	<b>13</b>
1.1. Планарная хроматография	13
1.2. Почему выбирают планарную хроматографию?	17
1.3. Факторы, влияющие на качество разделения в планарной хроматографии	20
1.4. Основные механизмы разделения в планарной хроматографии	21
1.5. Методы, используемые при элюировании	22
1.6. Неподвижные фазы	27
1.7. Подвижные фазы	40
1.8. Методы подбора и оптимизации подвижных фаз	45
1.9. Методы нанесения проб	52
1.10. Подготовка хроматографических камер к разделению	56
1.11. Влияние влажности и температуры воздуха на эффективность разделения	60
1.12. Обнаружение соединений на хроматограммах	62
1.12.1. Физические методы	63
1.12.2. Радиоактивные методы	63
1.12.3. Микробиологические и биохимические методы	67
1.12.4. Химические методы	67
<i>Литература</i>	77
<b>Глава 2. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ</b>	<b>85</b>
2.1. Количественное определение с удалением хроматографической зоны с пластинки	85
2.2. Методы определения анализируемых соединений непосредственно на пластинке	89
2.3. Количественный анализ методом денситометрии	92
2.3.1. Основы денситометрии	92
2.3.2. Приборы для сканирующей денситометрии	95
2.3.3. Видеоденситометрия	102

2.3.4. Денситометрия с планшетным сканером	110
2.3.5. Видеоденситометрия с компьютерным “спектральным” анализом	111
2.3.6. Радиоденситометрия	113
2.4. Калибровочные функции, используемые в ПХ для количественной обработки результатов денситометрических измерений	120
2.5. Анализ погрешностей в планарной хроматографии (денситометрия и видеоденситометрия)	123
2.6. GLP и валидация метода инструментальной планарной хроматографии	127
2.6.1. Валидация аналитических (включая хроматографические) методов	127
2.6.2. Предвалидационные тесты	130
2.6.3. GLP в планарной хроматографии	131
<i>Литература</i>	132
<b>Глава 3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ С ПОМОЩЬЮ ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ</b>	138
3.1. Количественное определение антибиотиков	138
3.1.1. Определение моеномицина в культуральной жидкости	138
3.1.2. Определение антибиотика вирджиниамицина	141
3.1.3. Определение тилозина в процессе биосинтеза	144
3.1.4. Разделение и количественное определение тетрациклиновых антибиотиков	147
3.2. Хроматографический анализ синтетических лекарственных средств	149
3.2.1. Определение салициловой кислоты в препаратах, содержащих ацетилсалициловую кислоту	149
3.2.2. Анализ диазепама и нордиазепама	151
3.2.3. Определение тинидазола в комбинированном препарате “Tinigyр”	153
3.2.4. Определение теофиллина в антиастматическом препарате “Solosin”	156
3.2.5. Определение кофеина в комбинированном препарате “Tulemin” с использованием пластинок с ультратонким монокристаллическим слоем силикагеля	158
3.2.6. Определение мужских половых гормонов (андрогенов) и их синтетических аналогов	161
3.2.7. Изучение стабильности налидиксовой кислоты	163
3.2.8. Контроль чистоты L-ДОФА	165
3.3. Количественное определение аминокислот и пептидов	167
3.3.1. Определение L-гомолейцина – аминокислоты небелкового происхождения в культуральной жидкости штамма-продуцента L-лейцина	167
3.3.2. Определение L-серина в культуральных жидкостях	171

3.3.3. Анализ L-триптофана, полученного с помощью микробиологического синтеза	174
3.3.4. Анализ аминокислот в биологических жидкостях	176
3.3.5. Хроматографическое определение инсулинов	178
3.4. Анализ нуклеозидов, нуклеотидов и фрагментов ДНК	180
3.4.1. Определение тимидина в культуральных жидкостях	180
3.4.2. Определение аденозин-5'-трифосфата	182
3.4.3. Количественное определение PCR фрагмента генов 16 S РНК <i>E. Coli K12</i> с молекулярной массой 60 кДа	185
3.5. Количественное определение водо- и жирорастворимых витаминов	188
3.5.1. Определение витаминов группы В	188
3.5.2. Экспресс-метод определения β-каротина и астаксантина в культуральных жидкостях <i>Phaffia Rhodozomyia</i>	190
3.6. Количественное определение карбоновых кислот, их эфиров и углеводов	193
3.6.1. Определение карбоновых кислот	193
3.6.2. Определение консервантов – производных 4-гидроксibenзойной кислоты	195
3.6.3. Определение углеводов	196
3.7. Анализ гербицидов, пестицидов, полициклических ароматических углеводородов и фосфорорганических отравляющих веществ	198
3.7.1. Определение экологически чистого гербицида биалофоса в культуральной жидкости	198
3.7.2. Определение пестицидов в питьевой воде	201
3.7.3. Определение полициклических ароматических углеводородов в питьевой воде (Германия)	203
3.7.4. Анализ фосфорорганических отравляющих веществ	206
3.8. Применение планарной хроматографии в анализе наркотических веществ	209
3.9. Определение примесей полистиролов в препаратах блоксополимеров (полистирол-полиметилметакрилат)	210
3.10. Определение катионов металлов	213
Краткий англо-русский словарь терминов, используемых в планарной хроматографии	215
Краткий словарь терминов, непосредственно связанных с понятием валидации	225
<i>Предметный указатель</i>	228

## ОТ АВТОРА

Развитые в книге представления основаны в значительной степени на результатах исследований, проводимых в течение ряда лет в Научно-техническом центре “Ленхром”, который продолжил работу, начатую в 1980-х годах в Институте высокомолекулярных соединений РАН. Благодаря теоретическим взглядам профессора, д. х. н. Б. Г. Беленького и его работам с кандидатами хим. наук Э. С. Ганкиной, Л. З. Виленчиком, И. И. Малаховой, Л. С. Литвиновой и другими в 90-х годах были заложены основы отечественной школы современной высокоэффективной инструментальной тонкослойной хроматографии (ТСХ), которая послужила фундаментом настоящих воззрений о роли ТСХ в аналитических методах. Большое влияние на становление количественной хроматографии в России оказали работы профессора, д. х. н. В. Г. Березкина.

ТСХ долгое время была полуколичественным методом анализа. За сравнительно короткий промежуток времени в результате активной разработки и использования новых методов нанесения и элюирования тонкослойных пластинок и, самое главное, разработки приборов для количественной ТСХ – денситометров – была создана высокоэффективная тонкослойная (планарная) хроматография. Этот комплекс методов и средств позволяет реализовать в планарной хроматографии высокие разрешение, чувствительность, скорость и воспроизводимость результатов количественного хроматографического анализа.

Несмотря на такое современное инструментальное оформление, планарная хроматография по-прежнему остается наиболее дешевым и простым для экспериментального осуществления методом. В этом отношении планарная хроматография не имеет себе равных среди других разновидностей хроматографии, чем и объясняется ее необычайная популярность у исследователей и аналитиков.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю благодарность руководству Научного совета по адсорбции и хроматографии РАН – проф., д. х. н. О. Г. Ларионову, проф., д. х. н. В. Н. Даванкову, к. х. н. Л. Н. Коломиец за постоянную поддержку метода тонкослойной хроматографии все эти непростые для отечественной науки годы.

Неоценимую помощь в работе над книгой оказал к. х. н. Б. В. Тяглов. Без постоянных и детальных консультаций с ним книга вряд ли была бы написана. С благодарностью и признательностью отмечаю особую роль доктора фармацевтических наук Е. В. Дегтерева и его огромный вклад в редактирование книги.

Автор благодарен всем экспертам, помогавшим в работе над книгой.

*В. Д. Красиков*

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Современное промышленное производство, аналитическая химия, медицина, мониторинг окружающей среды предъявляют очень высокие требования к методам определения состава различных объектов. Методы и принципы GLP (good laboratory practice) широко вошли в повседневную практику аналитических лабораторий. При этом аналитику чаще всего приходится отвечать на два вопроса: какие соединения находятся в исследуемой пробе и в каких количествах данное соединение присутствует в анализируемой смеси. Определить состав многокомпонентной смеси, выявив присутствие микроколичеств примесей, пользуясь каким-либо одним методом, обычно не удается. Как правило, при решении подобных задач приходится использовать группу методов и разумную их комбинацию. Такие комбинированные, или, по образному выражению академика РАН Ю. А. Золотова, гибридные, методы широко используются в аналитической химии (Золотов Ю. А. *Очерки аналитической химии*. М.: Химия, 1977). Современная аналитическая химия – это химия гибридных методов.

В последние десятилетия для изучения органических и неорганических смесей широко используются хроматографические методы. В настоящее время хроматография – основной аналитический гибридный метод. В нем можно выделить два элемента с различными функциями, такими как разделение (хроматографическая колонка, тонкий слой сорбента и т. д.) и количественное определение (детектор, денситометр и т. д.).

Со времени открытия тонкослойной хроматографии Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер прошло более 60 лет. Однако за этот период она заняла особое место среди методов разделения и анализа веществ благодаря простоте исполнения, доступности оборудования, высокой эффективности и гибкости самого метода, что позволяет легко модифицировать его в соответствии с поставленной задачей.

Тонкослойная хроматография представляет собой разновидность жидкостной хроматографии, в которой роль подвижной фазы выполняет элюент, а разделение происходит на слое сорбента, толщина которого во много раз меньше его ширины. В классическом варианте тонкослойной хроматографии слой сорбента открыт, а движение подвижной фазы осуществляется посредством капиллярных сил.

С помощью современной тонкослойной (планарной) хроматографии выполняются анализы продуктов химического и микробиологического синтеза, природных и физиологически активных соединений,

фармацевтических препаратов. Метод применяется для экологического мониторинга (например, контроль содержания пестицидов в почве, воде и в пищевых продуктах, а также вредных органических и неорганических веществ в сточных водах); определения содержания наркотических и одурманивающих веществ в различных объектах (наркологическая служба, криминалистическая и таможенная экспертиза); при диагностике врожденных метаболических заболеваний у детей (различные аминокислотурии), а также при анализе минерального сырья и многих других объектов.

Необходимость написания настоящей книги была обусловлена двумя причинами. Во-первых, книги, посвященные методам количественной тонкослойной хроматографии, выпущенные в СССР, а потом в России, в настоящее время стали библиографической редкостью. Во-вторых, в России 80 % анализов, выполненных методом жидкостной хроматографии, было проведено с помощью планарной хроматографии; этот метод используется более чем в 2000 контрольно-аналитических лабораторий страны, не считая отраслевых институтов, институтов Академии наук и вузов (Беленький Б. Г. *Применение ТСХ в экологии: Материалы Российского Научно-производственного семинара*. Москва, 1995).

Книга охватывает широкий круг вопросов, изложенных в доступной форме и связанных с подвижными и неподвижными фазами, используемыми в планарной хроматографии, оборудованием для нанесения растворов образцов на хроматографическую пластинку, классификацией методов разделения, современной методологией выбора элюента, позволяющего осуществить разделение многокомпонентной смеси с высокой эффективностью и селективностью, а также обнаруживающими реагентами и способами нанесения их на хроматограммы.

Подробно рассмотрены вопросы количественного определения содержания веществ в хроматографических зонах; представлена информация о способах сканирования, описаны модели ряда сканирующих денситометров и видеоденситометров, включая видеосистему “DenScan 04” (НТЦ “Ленхром”, Санкт-Петербург, Россия, 2002 г.). Представлен анализ причин погрешностей, которые могут возникнуть в процессе нанесения растворов проб на пластинки, хроматографического разделения и количественного (денситометрического) определения содержания веществ на хроматограммах; при этом также заслуживают внимания материалы о валидации аналитических методов, включая планарную хроматографию.

Следует отметить практический характер книги, поскольку в ней специально рассмотрен ряд примеров разделения и количественного определения большого числа соединений, принадлежащих к различным классам (антибиотики, аминокислоты, синтетические лекарственные препараты, наркотические вещества и т. д.), и представлены метрологические характеристики этих методик.

Автор надеется, что данная книга станет полезной для хроматографистов, биохимиков, фармацевтов, химиков-органиков, биотехнологов, студентов старших курсов, аспирантов и научных сотрудников, использующих метод планарной хроматографии в своей практической работе.

Автор с благодарностью примет критические замечания и пожелания.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ахрем А. А., Кузнецова Л. И.* Тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1964. 175 с.
2. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Штала. М.: Мир, 1965. 508 с.
3. *Шеллард Э.* Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. М.: Мир, 1971. 192 с.
4. *Кибардин С. А., Макаров К. А.* Тонкослойная хроматография в органической химии. М.: Химия, 1978. 125 с.
5. Высокоэффективная тонкослойная хроматография / Под ред. А. Златкиса и Р. Кайзера. М.: Мир, 1979. 265 с.
6. *Березкин В. Г., Бочков А. С.* Количественная тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1980. 183 с.
7. *Шаршунова М., Шеварц В., Михалец Ч.* Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М.: Мир, 1980. Ч. 1 и 2. 621 с.
8. *Кирхнер Ю.* Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1980. Т. 1. 616 с. Т. 2. 710 с.
9. Препаративная жидкостная хроматография / Под ред. В. Бидлингмейера. М.: Мир, 1990. 358 с.
10. Количественный анализ хроматографическими методами / Под ред. Э. Кэп. М.: Мир, 1990. 319 с.
11. Handbook of Thin-Layer Chromatography / Ed. J. Sherma and B. Fried. N. Y.: Marcel Dekker Inc., 1991. 1047 p.
12. *Вольнец М. П.* Количественная тонкослойная хроматография в неорганическом анализе. М.: Наука, 1993. 225 с.
13. Аналитическая хроматография / Под ред. К. И. Сакодынского. М.: Химия, 1993. 464 с.
14. Руководство по современной тонкослойной хроматографии / Под ред. О. Г. Ларионова. М.: Научный совет по хроматографии РАН, 1994. 311 с.
15. *Гейсс Ф.* Основы тонкослойной хроматографии. М., 1999. Т. I. 405 с. Т. II. 348 с.
16. Planar Chromatography – A Retrospective View for the Third Millenium / Ed. Sz. Nyiredy. Budapest: Springer Scientific Publisher, 2001. 614 p.
17. 100 лет хроматографии / Под ред. Б. А. Руденко. М.: Наука, 2003. 739 с.

### УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

CHIRTLCL	тонкослойная хроматография на энантиомер-селективных фазах
FFPLC	плоскостная жидкостная хроматография при принудительном потоке жидкости
GLP	good laboratory practice
HPPLC (OPLC)	плоскостная жидкостная хроматография под давлением
IEXCHTLC	тонкослойная хроматография на ионообменных фазах
LCS	твердо-жидкостная хроматография
OPTLC	тонкослойная хроматография под давлением
RPLC	плоскостная жидкостная хроматография при вращении пластинки
AMXЭ (AMD)	автоматическое многократное хроматографическое элюирование
BX (PC)	бумажная хроматография
ВЭЖХ (HPLC)	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭТСХ (HP TLC)	высокоэффективная тонкослойная хроматография
ГХ (GC)	газовая хроматография
ЖХ (LC)	жидкостная хроматография (включая колоночную и тонкослойную)
КЖХ (CLC)	колоночная жидкостная хроматография
НТД	нормативно-техническая документация ТСХ-пластинки "Сорбфил"
НФ	нормальная фаза
ОФ (RP)	обращенная фаза
ПТСХ-А-П	ТСХ-пластинки аналитические; подложка – полиэтилентерефталат
ПТСХ-А-АФ	ТСХ-пластинки аналитические; подложка – алюминиевая фольга
ПТСХ-А-АФ-УФ	ТСХ-пластинки аналитические; подложка – алюминиевая фольга; в сорбент введен флуоресцентный индикатор ( $\lambda = 254$ нм)

ПТСХ-А-П-УФ	ТСХ-пластинки аналитические; подложка – полиэтилентерефталат; в сорбент введен флуоресцентный индикатор ( $\lambda = 254$ нм)
ПТСХ-В-АФ	ТСХ-пластинки высокоэффективные; подложка – алюминиевая фольга
ПТСХ-В-АФ-УФ	ТСХ-пластинки высокоэффективные; подложка – алюминиевая фольга; в сорбент введен флуоресцентный индикатор ( $\lambda = 254$ нм)
ПТСХ-В-П	ТСХ-пластинки высокоэффективные; подложка – полиэтилентерефталат
ПТСХ-В-П-УФ	ТСХ-пластинки высокоэффективные; подложка – полиэтилентерефталат; в сорбент введен флуоресцентный индикатор ( $\lambda = 254$ нм)
ПХ (PC)	планарная хроматография
ТСХ (TLC)	тонкослойная хроматография
т. т. (teoretical plate)	теоретическая тарелка
УТСХ (UTLC)	тонкослойная хроматография на сверхтонких монокристаллических слоях силикагеля
$hR_f$	величина $R_f$ , умноженная на 100
$R_f$ (relative to front)	величина, характеризующая положение хроматографической зоны анализируемого вещества относительно фронта элюента после проведения разделения
$R_{r_i}$ (relative to standard)	величина, определяемая как отношение подвижности анализируемого соединения к подвижности вещества, выбранного в качестве стандарта
S/N	соотношение сигнал/шум
$S_i$	величина силы растворителя согласно Л. Снайдеру

# 1 ГЛАВА | ВВЕДЕНИЕ В ТОНКОСЛОЙНУЮ (ПЛАНАРНУЮ) ХРОМАТОГРАФИЮ

Тонкослойная хроматография была открыта в 1938 г. М. С. Шрайбер и Н. А. Измайловым [1]. В 50-х годах благодаря работам Э. Штала этот метод занял одно из ведущих мест в качественном и полуколичественном анализе сложных смесей, таких как природные соединения, фармпрепараты, продукты химического и микробиологического синтеза и многие другие объекты. Однако в начале 70-х годов развитие высокоэффективной жидкостной хроматографии несколько потеснило тонкослойную хроматографию, особенно в области количественного анализа и при разделении многокомпонентных смесей.

Применение силикагелей с диаметром частиц 5–7 мкм, разработка высокоэффективных пластинок, начатые также в 70-х годах, методы многократного элюирования, работы Г. Йорка и Р. Кайзера в области денситометрии сделали классическую тонкослойную хроматографию высокоэффективным количественным методом [2, 3].

## 1.1. ПЛАНАРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Современная планарная хроматография (ПХ) представляет собой метод для разделения, качественного и количественного определения органических и неорганических соединений. ПХ является разновидностью жидкостной колоночной хроматографии, в случае которой разделение веществ происходит на открытом слое сорбента, т. е. как бы на колонке с частично удаленной передней и задней стенкой – “открытой колонке”.

Хроматографический процесс в тонком слое сорбента обеспечивается передвижением подвижной фазы (элюента) посредством капиллярных сил. В результате передвижения элюента и смеси исследуемых веществ происходит разделение анализируемой смеси на компоненты, основанное на различной скорости их перемещения в слое сорбента.

В ПХ важной характеристикой степени разделения исследуемых соединений является величина  $R_f$  (relative to front), которая определяет или характеризует положение хроматографической зоны анализируемого вещества относительно фронта элюента после

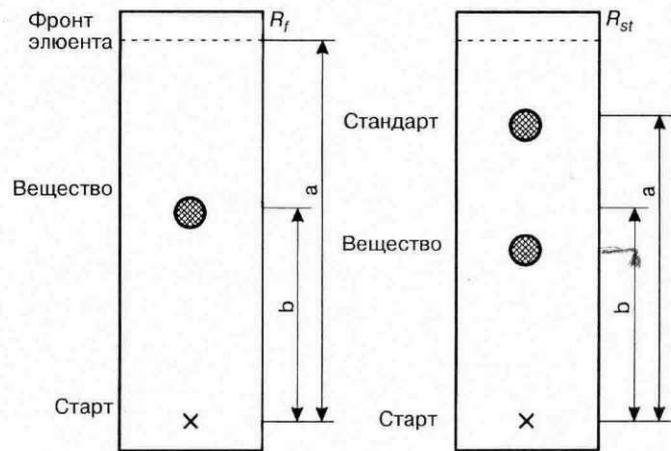


Рис. 1.1. Схема, иллюстрирующая определение величин  $R_f$  и  $R_{st}$

проведения разделения. Величина  $R_f$  определяет подвижность вещества и рассчитывается как отношение расстояния от центра хроматографической зоны исследуемого соединения до линии старта ( $b$ ) к расстоянию ( $a$ ), которое прошел элюент от линии старта до линии фронта (рис. 1.1):

$$R_f = \frac{b}{a} \quad (1)$$

Величина  $R_f$  является характеристикой подвижности данного соединения, хроматографируемого на данном сорбенте, в данном элюенте и в данных конкретных условиях опыта. Величина  $R_f$  может варьировать в пределах от 0 до 1,0. В некоторых работах используется величина  $hR_f$ , которая равна  $R_f$ , умноженной на 100.

В ряде случаев в ПХ подвижность исследуемого соединения характеризуется величиной  $R_{st}$  (relative to standard), которая определяется как отношение подвижности анализируемого соединения ( $b$ ) к подвижности вещества, выбранного в качестве стандарта ( $a$ ), которое элюируется на одной и той же пластинке вместе с исследуемым соединением (рис. 1.1):

$$R_{st} = \frac{b}{a} \quad (2)$$

Величина  $R_{st}$ , как можно видеть из рис. 1.1, может принимать значения как меньше, так и больше единицы.

Метод ПХ, как правило, не уступает другим хроматографическим методам по точности, чувствительности и воспроизводимости [4].

Синонимами термина “планарная хроматография” являются:

- тонкослойная хроматография (ТСХ);
- высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ);
- современная тонкослойная хроматография;
- инструментальная тонкослойная хроматография;
- планарная жидкостная хроматография (ПЖХ); этот термин в литературе используется редко [5].

Необходимо отметить, что методические приемы, используемые в современной ПХ, существенно отличаются от приемов, применявшихся в классической, традиционной тонкослойной хроматографии, поэтому в книге будут использованы термины ПХ или ТСХ/ВЭТСХ.

В настоящее время начал развиваться еще один вид планарной хроматографии – ультратонкослойная хроматография (УТСХ) [5]. Основное отличие пластинок для УТСХ от классических стандартных силикагелевых пластинок заключается в том, что вместо мелкодисперсных частиц силикагеля, которые фиксируются на подложке с помощью связующих материалов, таких как силикагель, крахмал, гипс и др., используется сверхтонкий монолитный слой силикагеля, непосредственно синтезированный на поверхности. Электронно-микроскопическая фотография монолитного силикатного слоя пластинки для УТСХ приведена на рис. 1.2.

Ультратонкослойная хроматография позволяет проводить экспресс-анализы с минимальными расходами элюента и анализируемых веществ, благодаря уникальной структуре пор и чувствительности (табл. 1.1, рис. 1.3).

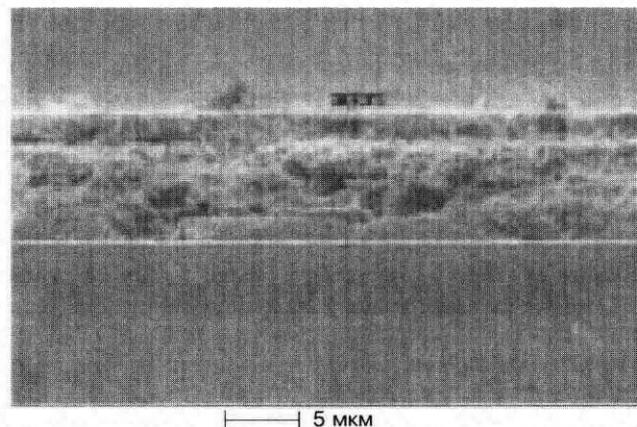


Рис. 1.2. Электронно-микроскопическая фотография (поперечное сечение) монолитного слоя силикагеля пластинки УТСХ [5]

ТАБЛИЦА 1.1

Сравнение различных типов пластинок для планарной хроматографии [5]

	УТСХ- пластинки	ВЭТСХ- пластинки	ТСХ- пластинки
Силикагель	С монолитной структурой	Частицы	Частицы
Связующее	Отсутствует	Органическое полимерное	Органическое полимерное
Толщина слоя, мкм	10	100–250	100–250
Длина пробега фронта элюента, см	1–3	3–7	10–15
Время разделения, мин	1–6	5–30	15–200
Количество подвижной фазы, мл	1–4	20	100
Предел детектирования, пг	10	100	1000

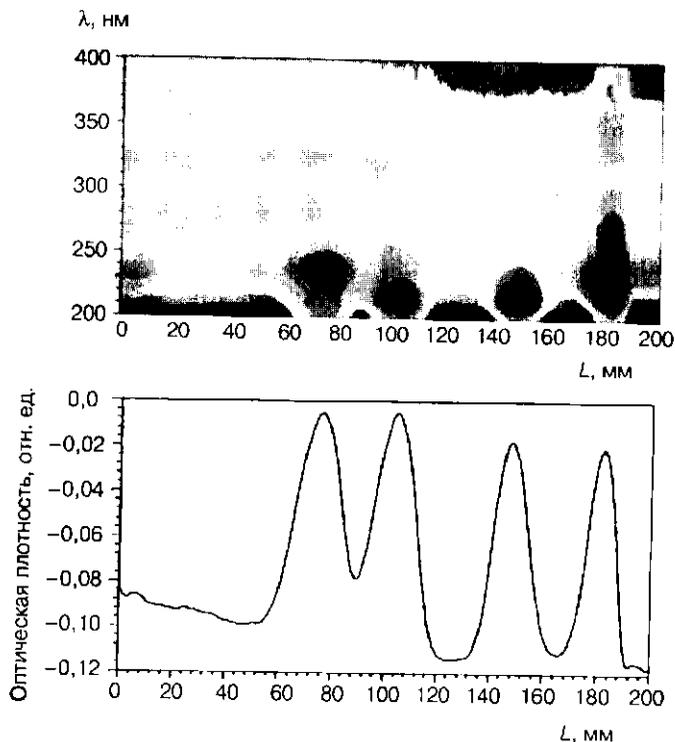


Рис. 1.3. Разделение смеси пестицидов (денситограмма), время анализа менее 5 мин [5]



Рис. 1.4. Области применения планарной хроматографии

ПХ широко используется во многих областях науки и техники. На рис. 1.4 представлена диаграмма, из которой видно, что метод нашел наибольшее применение в фармацевтической промышленности [6].

Начало XXI века было ознаменовано появлением большого количества работ по использованию ПХ в биохимии, клинической химии, фармацевтической, пищевой промышленности и косметологии [7].

## 1.2. ПОЧЕМУ ВЫБИРАЮТ ПЛАНАРНУЮ ХРОМАТОГРАФИЮ?

Как уже было отмечено выше, ПХ является разновидностью жидкостной хроматографии, реализуемой на плоскости, иначе говоря, пластинка представляет собой открытую колонку, хотя термин “жидкостная хроматография” в повседневной жизни обычно ассоциируется с колоночной жидкостной хроматографией (КЖХ) или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Какому методу – ПХ или ВЭЖХ – следует отдавать предпочтение?

Следует знать, что выбор того или иного хроматографического метода зависит от конкретно поставленной задачи. В настоящее время ни один из хроматографических методов не может быть полностью заменен любым другим. Если в поставленной задаче изучаемый образец состоит из многих компонентов (включая “тяжелый матрикс”, т. е. неидентифицированные примеси, содержащиеся в большом количестве), то, как правило, хромато-

графические методы дополняют друг друга. Так, в ряде случаев использование ТСХ/ВЭТСХ является более предпочтительным, чем разделение на колонках, а в других случаях очевидно преимущество ВЭЖХ.

Необходимо отметить, что ПХ и ВЭЖХ имеют существенные различия:

- С помощью метода ПХ одновременно можно анализировать несколько образцов (72 образца на одной хроматограмме: горизонтальная камера фирмы “Camag” (Швейцария)) [5]. В случае ВЭЖХ – только одну пробу.
- Система разделения в ПХ – открытая, в случае ВЭЖХ – закрытая.
- В случае ПХ используется “статическое” обнаружение компонентов разделяемой смеси, имеющее более широкие возможности, чем в случае ВЭЖХ, где применяется “динамическое” детектирование, ограниченное выбором детекторов. ВЭЖХ также требует использования растворителей высшей степени очистки.

К достоинствам ПХ можно отнести следующие:

- Стоимость оборудования для ВЭЖХ (прецизионные плунжерные насосы, детекторы, колонки, заполненные разнообразными дорогостоящими сорбентами) намного превосходит стоимость оборудования, которое требуется для выполнения анализов методом ПХ.
- Возможность одновременного разделения нескольких образцов в условиях однократного или многократного элюирования (при различных условиях).
- Возможность одновременного разделения одного и того же образца с помощью различных элюентов (6 элюентов: ВЭТСХ – вариокамера фирмы “Camag”) (см. рис. 1.27) [5].
- Универсальность хроматографического разделения:
  - легкая и быстрая смена элюента, что необходимо для оптимизации селективности;
  - широкий выбор растворителей;
  - отсутствие проблем с необратимо адсорбированными веществами, поскольку все компоненты разделяемой пробы остаются на слое сорбента и полученные результаты разделения легко оценить визуально.
- Возможность оптимизации разрешающей способности хроматографической системы при разделении сложной смеси по одним лишь интересующим нас компонентам за счет подбора условий элюирования, благодаря чему существенно экономится время.

- Возможность сохранения хроматограммы с разделенными образцами с последующим их детектированием (независимо от места и времени процедуры разделения) [8].
- Возможность количественной обработки хроматограмм, полученных в различных лабораториях на одном и том же денситометре.
- Возможность осуществлять спектральную идентификацию хроматографических зон после разделения в любом диапазоне длин волн, включая ИК [5].
- Возможность планирования сроков выполнения отдельных операций (нанесение пробы, элюирование, обнаружение и количественная обработка), поскольку они могут быть выполнены вне зависимости от продолжительности перерывов между ними.
- Стоимость количественного анализа составляет лишь 35 % от затрат, требуемых на проведение анализа методом ВЭЖХ [9, 10].
- Невысокая стоимость единичного рутинного анализа также обусловлена и тем, что имеется возможность разделения большого количества образцов на одной хроматограмме за сравнительно короткое время. Так, в некоторых случаях продолжительность разделения составляет 30 с [11].
- В отличие от ВЭЖХ в ПХ можно использовать в качестве сорбентов оксид алюминия, целлюлозу, полиамид и другие сорбенты.

К недостаткам метода ПХ можно отнести следующее:

- ограниченная разрешающая способность из-за сравнительно небольшой длины разделяющей зоны – 3–10 см (исключением является разделение в системе “Хромпресс” [12], а также “непрерывное и проточное элюирование”);
- в ряде случаев чувствительность ниже, чем в случае ВЭЖХ [3];
- зависимость от окружающей среды: относительная влажность, температура, а также наличие загрязняющих веществ в воздухе;
- трудности в работе с образцами, имеющими высокую летучесть, а также с веществами, чувствительными к кислороду воздуха или свету.

Если приходится сталкиваться с неудовлетворительной разрешающей способностью и(или) низкой чувствительностью, что зачастую характерно для ПХ, то используют метод ВЭЖХ. Преимущества ВЭЖХ давно известны (о чем свидетельствует большая популярность этого метода), а о ее недостатках обычно забывают, полагая, что не существует других подходов для решения

ТАБЛИЦА 1.2

Выборка статистических данных по использованию хроматографических методов в аналитической лаборатории одной из европейских химических компаний [13]

Метод	Хроматограммы, количество	Приборы, количество	Число сотрудников	Число хроматограмм на 1 сотрудника	Суммарное капиталовложение, млн. нем. марок
ГХ	160 000	70	25	6400	3,5
ЖХ*	130 000	28	18	7200	1,5
ТСХ	35 000	4 рабочих места**	5	7000	0,15

\* Включая приборы, обеспечивающие разделение под низким давлением.  
\*\* Включая два сканирующих денситометра.

поставленной задачи. Именно в этом случае таким иным подходом может оказаться ПХ; и если следовать ему, можно устранить многие затруднения, характерные для ВЭЖХ, особенно при решении поисковых задач. В табл. 1.2 представлена выборка статистических данных, с помощью которых можно проиллюстрировать ситуацию, отмеченную в конце XX века в аналитической лаборатории одной из крупных европейских химических компаний.

### 1.3. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КАЧЕСТВО РАЗДЕЛЕНИЯ В ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

На качество разделения в ПХ влияют факторы, которые можно расположить в ряд по степени их значимости [14]:

- сорбент;
- элюент;
- тип разделительной камеры;
- предварительное насыщение камеры;
- предварительное насыщение камеры и слоя;
- средний диаметр частиц сорбента и их форма;
- стартовый размер (диаметр) пятна;
- расстояние от старта до нижнего края пластинки;
- активный слой;
- относительная влажность воздуха лабораторного помещения;
- равномерность нанесения слоя;
- скорость элюирования;
- интервал величин  $R_f$ ;

- температура в камере;
- объем растворителя в камере;
- тип вещества, связывающего сорбент;
- микроповреждения слоя;
- толщина слоя;
- направление элюирования (восходящее элюирование или элюирование в горизонтальной камере);
- длина пути разделения;
- величина pH элюента;
- величина pH слоя;
- наличие примесей в элюенте;
- конвекция в газовой фазе внутри камеры.

Вопросы, связанные с подвижными и неподвижными фазами, типами камер и их насыщением, более подробно будут рассмотрены в следующих главах.

### 1.4. ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗДЕЛЕНИЯ В ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Как было отмечено, в ПХ движение элюента в пористом слое сорбента, находящегося на поверхности пластинки, вызвано действием капиллярных сил. Так, проникая в капиллярные полости слоя, элюент стремится уменьшить площадь своей поверхности, что сопровождается снижением его свободной энергии поверхности ( $E_m$ ). Изменение энергии  $\Delta E_m$  прямо пропорционально поверхностному натяжению  $\sigma$ , а также молярному объему элюента и обратно пропорционально радиусу капилляра  $r$ . При этом поступающий элюент сначала заполняет более узкие поры, а более крупные поры, находящиеся на пути его движения, остаются на какое-то время пустыми, однако и они также заполняются элюентом, выходящим (вытекающим) из более мелких пор [15]. Скорость движения компонентов разделяемой смеси определяется соотношением времен движения (в токе элюента) и удерживания поверхностью за счет сорбции. При этом молекулы каждого из компонентов участвуют в многочисленных актах сорбции и десорбции. В конце процесса элюирования каждый из разделяемых компонентов смеси проходит соответствующее расстояние, определяемое положением центра хроматографической зоны, которая, надо отметить, размывается (как по  $X$ , так по  $Y$  координате) за счет флуктуаций средней скорости индивидуальных молекул в процессе движения по слою. Б. Г. Беленьким с сотрудниками было установлено, что ПХ является двумерным, “неидеальным” и неравновесным хроматографическим процессом [16].

Как было указано выше, ПХ является разновидностью ЖХ, поэтому и основные механизмы разделения, присущие ЖХ, также реализуются в случае ПХ [17]:

- адсорбционный,
- распределительный,
- ион-парный,
- ионообменный,
- эксклюзионный (гель-проникающий),
- энантиомер-селективный (хиральный).

Приведенная классификация основана на различии в природе сил, действующих между разделяемыми веществами, неподвижной и подвижной фазами, с которыми разделяемые вещества вступают во взаимодействия при проведении хроматографического процесса. В реальном эксперименте разделение осуществляется одновременно за счет двух или нескольких механизмов. Так, адсорбционная хроматография сопровождается распределительной при разделении на слабоактивных сорбентах или при наличии воды в составе элюента. Распределительная и ионообменная хроматография, как правило, сопровождается адсорбционными процессами [18].

### 1.5. МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ЭЛЮИРОВАНИИ

В настоящее время в ПХ, как и в классической ТСХ, в большинстве случаев элюирование хроматограмм осуществляется в одномерном вертикальном или горизонтальном вариантах. На рис. 1.5 показаны различные способы одномерного варианта разделения, которые также можно разделить на одно- и многоступенчатые. В случае бинарного элюирования (без изменения состава элюента) фронт элюента многократно пересекает хроматографическую зону и с каждым разом все больше и больше сжимает ее в направлении движения растворителя. Это происходит вследствие того, что подвижная фаза сначала соприкасается с нижним краем пятна, и молекулы пробы, содержащиеся в этой части пятна, начинают двигаться вперед раньше тех молекул, которые все еще находятся впереди фронта растворителя. При этом хроматографическая зона фокусируется. Однако, как только эта зона останется за фронтом растворителя, она начинает двигаться вперед и уширяться за счет диффузии (рис. 1.6).

Для реализации разделения методом многоступенчатого элюирования фирмой “Самат” (Швейцария) был сконструирован прибор, управляемый компьютером, АМД [автоматическое многократное хроматографическое элюирование (АМХЭ)]. Вторая (последняя)



Рис. 1.5. Методы элюирования в планарной хроматографии

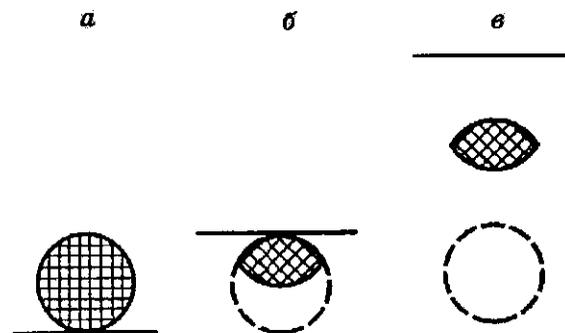


Рис. 1.6. Механизм сжатия зоны при бинарном элюировании: а – фронт элюента (обозначен черной линией) касается нижней границы зоны; б – фронт элюента проходит через зону, сжимая ее в направлении своего движения; в – зона движется далее, уширяясь за счет диффузии

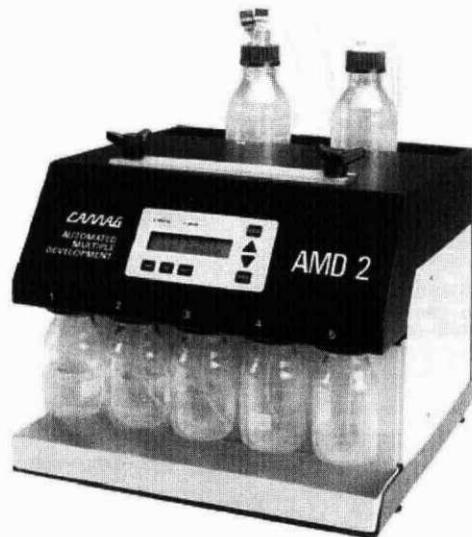


Рис. 1.7. Внешний вид установки AMD-2

модель этого прибора показана на рис. 1.7 [5]. Данный прибор позволяет осуществлять как ступенчатое изократическое, так и ступенчатое градиентное элюирование, что дает возможность существенно увеличить разрешение при хроматографическом разделении. Так, при проведении 68 циклов за 72 ч была реализована эффективность, эквивалентная 100 000 т. т. [16]. На рис. 1.8 и 1.9 представлены схемы многоступенчатого разделения с помощью АМХЭ и эффекта фокусирования.

Помимо одномерного варианта разделения используется еще и двумерный. При его реализации возможен поворот на  $90^\circ$  или  $180^\circ$  для проведения повторного элюирования (рис. 1.10, 1.11).

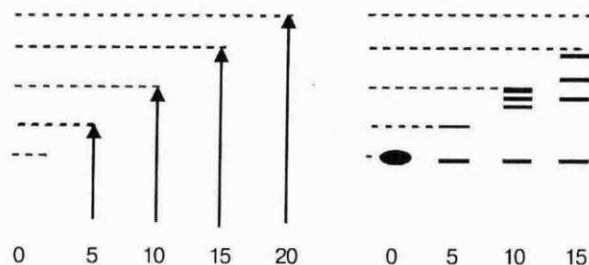
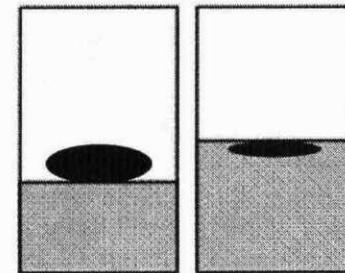


Рис. 1.8. Принцип работы установки автоматического многократного хроматографического элюирования

Рис. 1.9. Эффект фокусирования



Двумерная ПХ поворотом пластинки на  $90^\circ$  используется, как правило, для того чтобы отличить истинное содержание компонентов в смеси от хроматографических артефактов (например, появление дополнительных зон на хроматограмме за счет деструкции разделяемых веществ в процессе хроматографии). При этом элюирование проводят в одной и той же подвижной фазе на одно и то же расстояние. Если исходная проба содержит несколько соединений, то после элюирования во втором направлении они должны располагаться по диагонали хроматограммы (рис. 1.10). Если происходит деструкция одного или нескольких компонентов смеси непосредственно на пластинке, то пятна, соответствующие этим соединениям, будут находиться вне диагонали хроматограммы (рис. 1.10). Недостаток этого варианта в том, что возможно разделение только одной пробы на пластинке. Однако на высокоэффективных пластинках можно получить четыре двумерные хроматограммы; при этом нанесение пробы проводится в четырех углах пластинки.

Вариант “двумерного” элюирования с поворотом пластинки на  $180^\circ$  при повторном элюировании (рис. 1.11) широко используется при разделении смесей, которые исходно сильно загрязнены и содержание “тяжелого матрикса” (примесей) существенно выше, чем концентрация компонентов разделяемой смеси [19]. Следует отметить, что во всех указанных выше способах элюирования (кроме АМХЭ) невозможно реализовать высокую эффективность

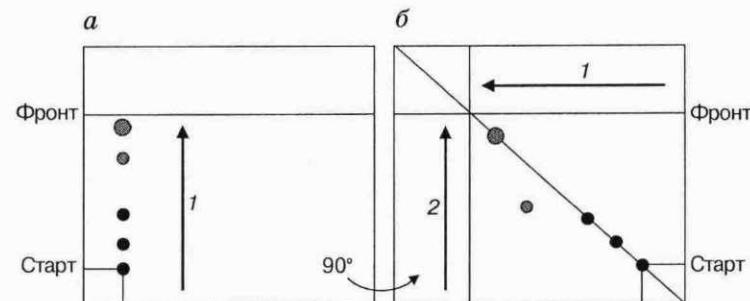


Рис. 1.10. Двумерное разделение (1, 2 – направления элюирования)

Поворот хроматограммы на  $90^\circ$  и разделение в том же самом растворителе (длина пробега фронта растворителя в первом и втором направлениях одинакова)

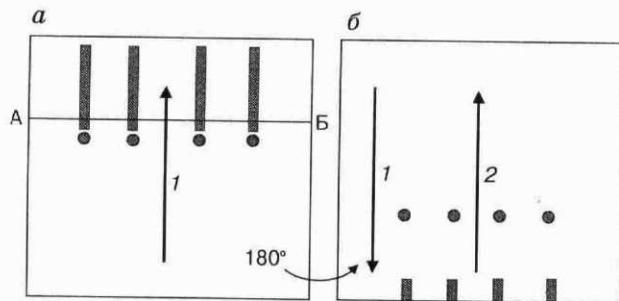


Рис. 1.11. “Двумерное” разделение (а – отделение “тяжелого матрикса”; б – разделение пробы)

Поворот хроматограммы на  $180^\circ$  и разделение пробы в другом растворителе после обрезания пластинки по линии А–В для удаления части хроматограммы с “тяжелым матриксом”

( $N > 10\,000$  т. т. [17]), поскольку движение элюента осуществляется за счет капиллярных сил.

Вариант ПХ с принудительным движением элюента позволяет снять эти ограничения. Метод планарной хроматографии под давлением был разработан Е. Тихаком [12], были сконструированы приборы “Хромпресс 10” и “Хромпресс 25”; фирма “Labor” (Венгрия). В настоящее время применяется также аналогичная установка фирмы “Camag”, Швейцария (рис. 1.12). Используя эти приборы, можно осуществлять разнообразные варианты элюирования:

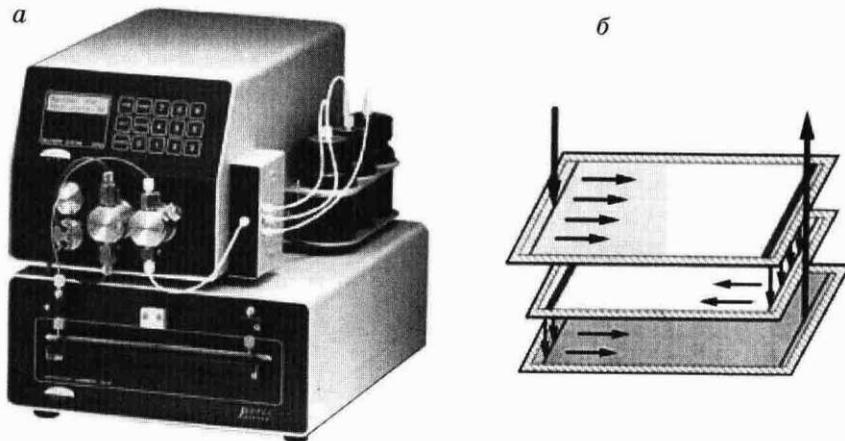


Рис. 1.12. Внешний вид установки с принудительным движением элюента фирмы “Camag”, Швейцария (а) и блок хроматографических кассет для этой установки (б)

- одномерное линейное,
- одномерное круговое,
- одномерное антикруговое,
- препаративное одномерное линейное,
- двумерное линейное.

Элюирование может быть проведено как при низком, так и при высоком давлении на пластинках разного размера, имеющих разные подложки. Возможно использование пластинок, покрытых сорбентом с диаметром частиц менее 5 мкм, и элюентов с высокой вязкостью. На рис. 1.12 показаны установка с принудительным движением элюента, выпускаемая фирмой “Camag”, и блок хроматографических кассет.

### 1.6. НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ

В настоящее время согласно данным Camag Bibliography Service [20] за 1982–2000 гг. в ПХ использовались 34 стационарные фазы, причем 92,4 % работ выполнено на силикагеле. Ко всем сорбентам предъявляются следующие требования [21]:

- должны образовывать химически и физически стабильные слои;
- не должны образовывать ковалентные связи с разделяемыми веществами;
- не должны растворяться в подвижной фазе или перемещаться вместе с ней по пластинке;
- не должны содержать компонентов, мешающих разделению или детектированию;
- не должны иметь собственной окраски;
- не должны набухать или сжиматься под действием подвижной фазы.

В качестве подложки для сорбента используются стекло, алюминиевая фольга, полимерные пленки (главным образом, полиэтилентерефталат).

Для придания стабильности слоя сорбента на подложке используются различные связующие вещества: гипс (5–10 %), силиказоль, силикаты щелочных металлов, полиакриламид, полиакриловый эфир, крахмал.

К адсорбенту часто добавляют флуоресцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в УФ-области спектра. Наиболее часто используют смесь силикатов Zn и Mg и смесь сульфидов Zn и Cd.

Эти индикаторы, возбуждаясь УФ-светом ( $\lambda = 254$  или  $366$  нм), вызывают свечение пластинки желто-зеленым светом ( $F_{254}$  или

UV<sub>254</sub>, а также F<sub>366</sub> или UV<sub>366</sub>). Если необходимы кислотоустойчивые флуоресцентные индикаторы, то для этой цели используют вольфраматы щелочноземельных металлов, которые вызывают свечение пластинок при облучении УФ-светом с  $\lambda = 254$  нм в голубой области (F<sub>254S</sub>). Выпускаются также пластинки, в слой которых введены два индикатора, вызывающих свечение пластинок при облучении УФ-светом ( $\lambda = 254$  и 365 нм), (F<sub>254/365</sub> или UV<sub>254/365</sub>).

Как уже было отмечено выше, такие характеристики сорбентов, как диаметр частиц, среднее распределение частиц по размерам и размер пор, имеют важное значение во всех видах жидкостной хроматографии; ПХ при этом не является исключением. Так, частицы с размером 5–20 мкм используются для производства пластинок в классической ТСХ, в то время как для ВЭТСХ необходим сорбент, диаметр частиц которого составляет 5–7 мкм (рис. 1.13, табл. 1.3). В последнее время имеются коммерчески доступные пластинки, покрытые сферическим силикагелем с диаметром частиц 3 мкм [22]. Однако они еще не получили широкого распространения [20].

На рис. 1.14 представлено разделение модельной смеси *L*-аминокислот, выполненное на высокоэффективных (*a*) и аналитических (*б*) пластинках. Из рисунка видно, что в случае использования ВЭТСХ-пластинок разделение смеси выполнено с более высоким разрешением [22].

Диаметр пор у сорбентов, используемых в ПХ, варьирует в интервале от 4 до 15 нм. Наиболее широкое распространение получили силикагели с диаметром пор 6 нм (60 Å), например "Silica gel 60", хотя имеются коммерчески доступные пластинки, на поверхность которых нанесен силикагель с диаметром пор 4 и 10 нм [5].

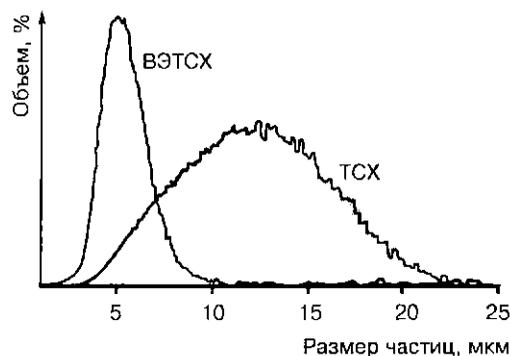


Рис. 1.13. Типичное распределение частиц по размерам сорбента "Силикагель 60" для ТСХ и ВЭТСХ

ТАБЛИЦА 1.3

Некоторые характеристики ТСХ- и ВЭТСХ-пластинок [18]

Характеристики	ТСХ	ВЭТСХ
Средний размер частиц, мкм	5–20	5–7
Толщина слоя, мкм	250	100, 200
Количество проб	Макс. 12	36–72
Длина пробега фронта растворителя, мм	100–150	30–50
Время, требуемое для разделения, мин	30–200	3–20
Количество растворителя, мл	50	5–10
Предел детектирования, нг:		
поглощение	100–1000	10–100
флуоресценция	1–100	0,1–10

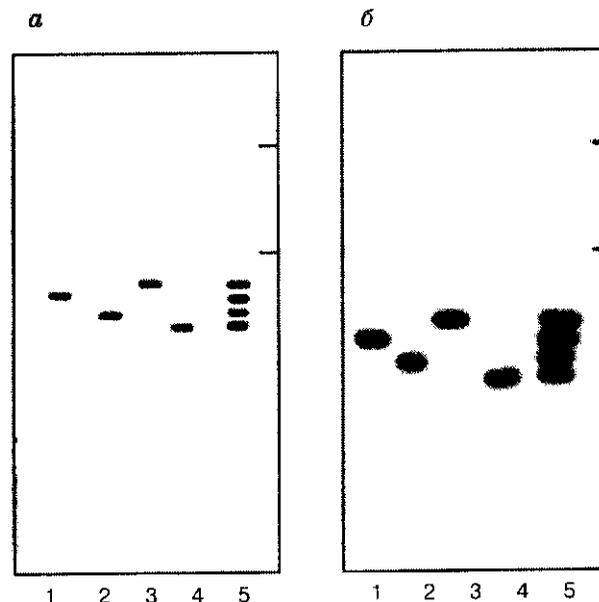


Рис. 1.14. Хроматограмма разделения *L*-аминокислот [22]:

1 – лейцин; 2 – метионин; 3 – фенилаланин; 4 – валин; 5 – смесь аминокислот 1–4. Нанесение: аппликатор "Linomat V" фирмы "Camag" (Швейцария); скорость нанесения 0,009 мкл/с; содержание аминокислот – 0,05 мкг. Элюент: хлороформ – 96 %-й этанол – лед, уксусная кислота – вода, бинарное элюирование:  $l_1 = 55$  мм,  $l_2 = 75$  мм. Детектирование: нингидриновый реактив. *a* – пластинки "Сорбфил", высокоэффективный вариант; *б* – пластинки "Сорбфил", аналитический вариант

Необходимо отметить, что частицы, диаметр пор которых менее 1 нм, не используются в ПХ, поскольку молекулы ряда соединений (например, толуола или четыреххлористого углерода) не могут проникнуть в них [8].

Распределение частиц по размерам (гомогенность) также является существенным фактором, влияющим на эффективность разделения; при денситометрическом анализе в случае более узкого распределения уменьшается соотношение S/N (сигнал/шум), при этом снижается также предел детектирования, что приводит к увеличению чувствительности при измерении [8].

Толщина слоя сорбента на пластинке также влияет на эффективность разделения и предел детектирования. В настоящее время у пластинок в классической ТСХ толщина слоя составляет 200 или 250 мкм; ВЭТСХ-пластинки имеют толщину слоя 200, 100 и 50 мкм. На пластинках для препаративного разделения с закрепленным слоем толщина слоя может достигать 2,0 мм [14]. Для коммерчески доступных пластинок вариация толщины слоя в пределах 10 % считается приемлемой [14].

Сорбенты, используемые в ПХ, можно разделить на три группы по степени полярности: полярные, среднеполярные, неполярные.

Рассмотрим некоторые из них в последовательности, которая соответствует степени их практического использования.

**1. Силикагель.** Поверхность силикагеля содержит активные геминальные и вицинальные силанольные группы, являющиеся донорами протонов. Кроме силанольных групп на поверхности силикагеля имеются силоксановые группы, обладающие протон-акцепторными свойствами (рис. 1.15) [18]. Силикагель является полярным сорбентом с гидрофильными свойствами. Следует акцентировать внимание на том, что молекулы воды из воздуха легко захватываются силикагелем, образуя многослойную оболочку. Удаление последней (до нижнего адсорбционного слоя) осуществляется активированием: нагревание пластинки при 120 °С в течение

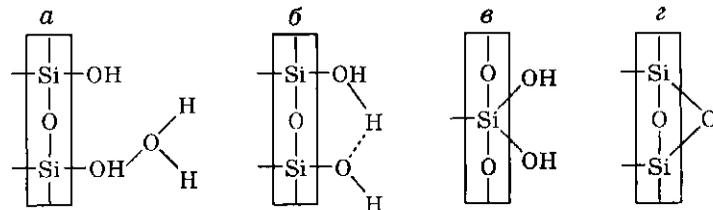


Рис. 1.15. Типы силанольных групп:

*a* – свободные силанольные группы; *б* – геминальные (парные) силанольные группы; *в* – вицинальные (соседние) силанольные группы; *г* – силоксановые группы

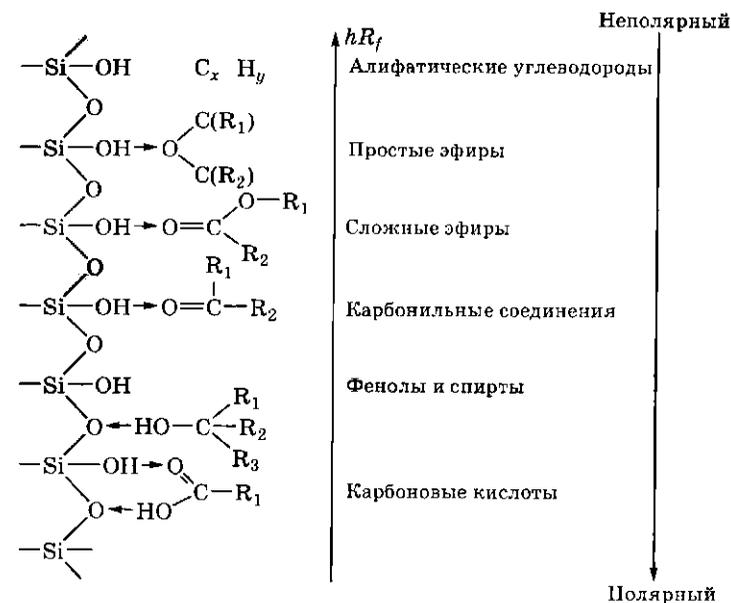


Рис. 1.16. Разделение органических соединений с различными функциональными группами на слоях силикагеля

30 мин [23]. После активирования пластинки следует хранить в эксикаторе. На рис. 1.16 представлено применение силикагеля для разделения органических соединений различных классов.

**2. Оксид алюминия** – второй по степени использования в ПХ полярный сорбент. Он, как и силикагель, способен образовывать водородные связи; однако, в отличие от силикагеля, протон-акцепторные свойства у него выражены сильнее [24].

Оксид алюминия в зависимости от способа приготовления может обладать нейтральными, кислотными и основными свойствами. Выпускаются два типа оксида алюминия, различающиеся по размеру пор частиц. Так, частицы оксида алюминия марки Е имеют размер пор 6 нм, а оксида алюминия марки Г – 15 нм. Область применения – разделение ароматических углеводородов, алкалоидов, хлоруглеводородов, стероидов [24].

**3. Флорисил** – основной силикат магния – по полярности занимает промежуточное положение между оксидом алюминия и силикагелем [14]. Область применения – разделение флавоноидов, стероидов и ацетилированных углеводов.

**4. Полиамиды** – группа полярных сорбентов, разделение веществ на которых осуществляется как по адсорбционному, так

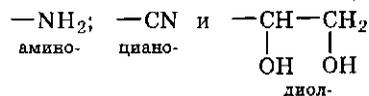
и по распределительному механизму [25, 26]. Карбоксамидная группа ответственна за адсорбционный механизм разделения на этих сорбентах, что позволяет использовать их для разделения пищевых красителей, флавоноидов, танинов, нитрофенолов, спиртов, кислот. Амидные группы в молекулах этих сорбентов разделены "линкером", состоящим из шести метиленовых звеньев, благодаря которым реализуется распределительный механизм хроматографического разделения [14].

**5. Кизельгур**, или диатомитовая земля, применяется главным образом для разделения сильно полярных соединений по адсорбционному механизму. Этот же сорбент может проявлять и распределительные свойства, если его поверхность импрегнировать парафином [14].

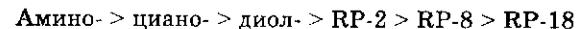
**6. Импрегнированные слои силикагеля.** Импрегнирование слоев силикагеля обычно проводят путем опрыскивания или погружения пластинок в раствор выбранного реагента. В качестве импрегнирующих реагентов в ПХ широко используются катионы различных металлов, борная кислота, кофеин и др. [14]. В процессе хроматографического разделения эти соединения образуют комплексы, имеющие различные константы нестойкости, с компонентами разделяемой смеси, что и приводит к увеличению эффективности разделения [27]. Так, Бхушаном [28] выполнено большое количество работ по разделению незамещенных аминокислот, а также их производных на силикагелях, содержащих катионы и анионы различных металлов; при этом получено высокое качество разделения.

**7. Ионнообменные слои.** Выпускаются пластинки на полимерной подложке, которая покрыта катионо- или анионообменными смолами (например, фирмы "Chromatronix, Fixion", Венгрия). Эти пластинки применяют для разделения аминокислот, нуклеотидов, пептидов и других соединений, образующих в растворах ионные формы. Однако в последние годы использование этих пластинок для практической работы существенно сократилось [20].

**8. Модифицированные силикагели.** В ПХ помимо полярных используются неполярные неподвижные фазы, а также фазы средней полярности, которые получают химической модификацией силикагеля как *n*-алкильными радикалами различной длины (*n* = 2, 8 и 18), так и алкильными радикалами, имеющими в конце метиленовой цепи функциональные группы, такие как [29, 30]:



Используемые модифицированные фазы можно разместить в ряд по уменьшению полярности радикала:



Эти фазы (см. рис. 1.17) позволяют также осуществлять:

- ионный обмен на —NH<sub>2</sub>-фазах;
- ион-парную хроматографию на —CN- и RP-слоях;
- распределительную хроматографию на RP-фазах;
- разделение оптических изомеров на энантиомер-селективных слоях.

Модифицированные фазы по полярности занимают промежуточное положение между немодифицированным силикагелем и RP-слоями. Функциональные группы в таких сорбентах отделены от матрицы линкером, состоящим из нескольких метиленовых групп, благодаря чему эти сорбенты можно использовать как в прямофазовой, так и обращеннофазовой ПХ (рис. 1.17).

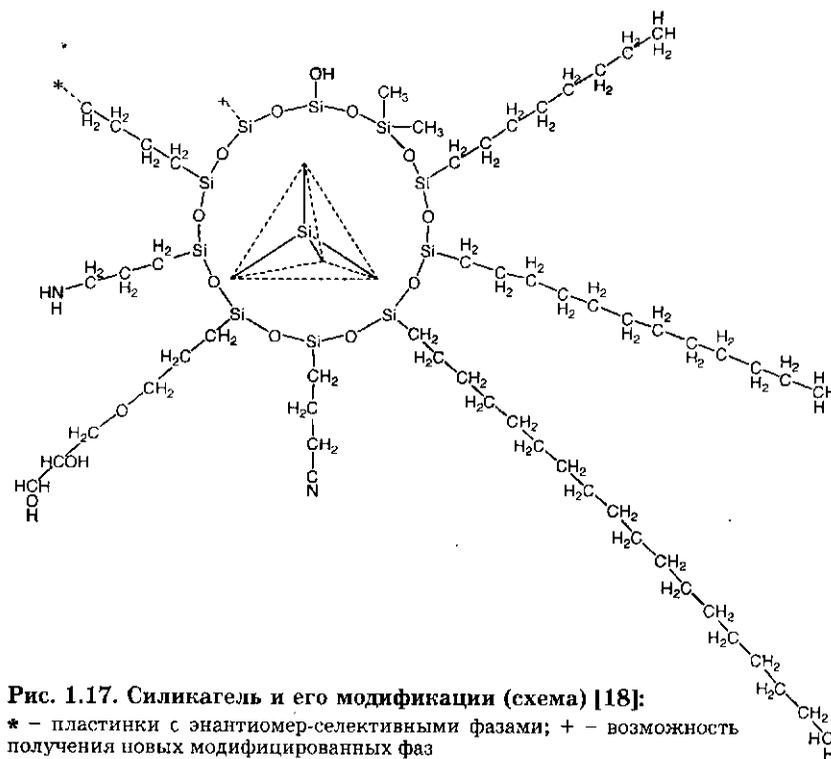


Рис. 1.17. Силикагель и его модификации (схема) [18]:

\* — пластинки с энантиомер-селективными фазами; + — возможность получения новых модифицированных фаз

**Аминофазы.** *n*-Пропиламино-фазы ( $-\text{NH}_2$ ) обладают основными свойствами и используются для разделения аминов, амидов, алкалоидов, бенздиазепинов. Эти сорбенты в протонированной форме ( $-\text{NH}_3^+$ ) работают как слабые анионообменники [14] и используются при разделении нуклеотидов, карбоновых кислот, некоторых витаминов и сахаров [14]. Применяя  $\text{R}-\text{NH}_2$ -фазы, можно осуществить разделение незаряженных молекул по адсорбционному механизму, используя подвижные фазы, не содержащие воды.

**Цианопропильные фазы.** Цианопропильные слои, являясь нейтральными, могут быть использованы для проведения хроматографических разделений как в прямофазовом, так и в обращеннофазовом вариантах. Метиленовые линкеры дают возможность проведения хроматографического разделения по распределительному механизму [29]. Область применения этих фаз – разделение фенолов, некоторых гормонов, консервантов и ряда препаратов, выпускаемых фармацевтической промышленностью [14].

**Диольные фазы.** Хроматографические свойства этих слоев определяются неполярными алкильными “линкерами” и гидроксильными группами, которые по своей природе сходны с вицинальными силанольными группами силикагеля, но имеют меньшую полярность. Диольные фазы используются для разделения смесей как в прямофазовом (адсорбционный механизм), так и в обращеннофазовом (распределительный механизм) вариантах. Эти фазы применяются при разделении стероидов, антибиотиков.

**Обращеннофазовые слои (RP-слои).** Под RP (reversed-phase)-слоями обычно понимают слои силикагеля, которые модифицированы этильными (RP-2), октильными (RP-8) и октадецильными (RP-18) радикалами [32, 33]. Такая модификация приводит к уменьшению реакционноспособных силанольных групп на поверхности силикагеля [14]. RP-слои используют, как правило, для распределительной хроматографии смесей, применяя гидрофильные подвижные фазы. Компоненты разделяемой смеси удерживаются на слое за счет гидрофобных сил. Степень модификации поверхности RP-слоя определяется как соотношение прореагировавших и непрореагировавших силанольных групп [29]. Максимальная степень модификации не может превышать 50 %, что определяется стерическими факторами [32]. Гидрофобность слоев увеличивается с возрастанием длины цепи радикала и степени модификации. Необходимо отметить, что смачиваемость RP-слоев полярной фазой, содержащей воду, незначительна, поскольку при увеличении содержания воды в подвижной фазе гидрофоб-

ные силы противодействуют капиллярным силам. Так, в случае RP-2-слоев можно использовать элюент, содержащий 70–80 % воды, в то время как для RP-8 и RP-18 эта величина уже составляет 50–60 %. Увеличение количества воды в элюенте приводит к возрастанию времени разделения. Практическое использование RP-слоев весьма разнообразно, однако количество работ, выполненных с использованием наиболее распространенных пластинок RP-18, составляет лишь 1,8 % (по отношению к общему числу работ, в которых использовался метод ПХ) [20], что, возможно, обусловлено их высокой стоимостью [22, 34].

**Ион-парное разделение на RP-слоях.** RP-слои можно также использовать для разделения полярных заряженных соединений посредством ион-парной хроматографии. Такие разделения проводят путем добавления ион-парного реагента (органическая соль) к подвижной фазе, состоящей из воды и буферного раствора. Разделяемые вещества формируют ионные пары – “солеподобные ассоциаты”, которые ведут себя как незаряженные (нейтральные) вещества, или, иными словами, неионные компоненты [35, 36]. В качестве ион-парных реагентов используют: четвертичные и третичные амины, натриевые соли арил- или алкилсульфоновой кислоты, а также натриевые соли моноэфиров серной кислоты.

**9. Слой на основе целлюлозы** используют для разделения гидрофильных соединений; разделение осуществляется по распределительному механизму.

В настоящее время разработаны модифицированные целлюлозы, которые представляют собой ионообменники, например: АЕ (аминоэтил)целлюлоза, ДЕАЕ (диэтиламиноэтил)целлюлоза и РЕИ (полиэтиленмин)целлюлоза, предназначенные для анионного обмена.

Для катионного обмена используют: СМ (карбоксиметил)-целлюлоза, Р (фосфо)-целлюлоза и Ролу-Р (полифосфо)-целлюлоза [14].

**10. Энантиомер-селективные фазы.** Принципы, лежащие в основе энантиомер-селективной лигандообменной хроматографии, были разработаны В. А. Даванковым с сотрудниками для ВЭЖХ и в дальнейшем использованы для ТСХ [37]. В качестве неподвижных фаз в настоящее время широко используются: целлюлоза, ацетилцеллюлоза, циклодекстрин, связанный с силикагелем [35]; RP-слои, модифицированные *L*-4-оксипропином, который, в свою очередь, связан с ионами меди. Разделение на подобных слоях обусловлено различием в стабильности образовавшихся диастереомерных комплексов, приводящим к различию в удерживании энантиомеров (см. также рис. 1.17). Область применения этих фаз – разделение оптических изомеров соединений различных классов.

**11. Слои на основе монолитных сорбентов [38].** Монолитные сорбенты представляют собой новое поколение стационарных фаз, которые могут быть использованы в жидкостной, планарной и газовой хроматографии, капиллярной электрохроматографии, носителей для твердофазного биокатализа и химического синтеза. Монолитные неподвижные фазы получают прямой сополимеризацией метакриловых полимеров, например сополимера глицин-метакрилата и этилендиметакрилата. Монолитные неподвижные фазы не содержат частиц, а роль разделительного пространства выполняют поверхность и объем проточных каналов (пор). Макропористая структура монолитных сорбентов содержит как минимум два вида пор: макро- и мезопоры. Преимущества подобных твердых носителей заключаются в резком повышении емкости, скорости и эффективности разделения, поскольку в данном случае практически отсутствуют обычные диффузионные ограничения межфазового массообмена. Поровые характеристики монолитов обеспечивают высокую проницаемость для больших молекул. Эти сорбенты могут быть использованы для разделения белков, олигонуклеотидов, плазмидных ДНК и наночастиц (вирусы). Фирмой "Merck" [5] освоено выпуск ТСХ-пластинок на основе силикагеля, имеющего монолитную структуру.

В табл. 1.4 приведены физические свойства силикагелей и тип связующих веществ для пластинок, наиболее часто используемых в ПХ, а в табл. 1.5 – характеристики пластинок с модифицированными силикагелями [16].

ТАБЛИЦА 1.4  
Характеристики силикагелей для ТСХ

Характеристики	"Merck", Германия		"Whatman", США	"Macherey-Nagel", Германия
	TLC-Si-60	HPTLC-Si-60	LK5-HP-K	SILG-25
Диаметр пор, нм	6	6	8	6
Объем пор, мл/г	0,82	0,82	0,70	0,75
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	550	550	300	500
Фракционный состав, мкм	5-20	5-10	5-10	5-25
Толщина слоя, мкм	250	200	200	250
Связующие	Органическое полимерное (конкретно не указано)			Гипс

Продолжение

Характеристики	"Kavalier", Чехия	"Арм-сорб", Армения	"Лайне Калур", Эстония		"Сорбфил", Россия	
	"Силуфол"	"Реакром"	АТСХ	ВЭТСХ	АТСХ	ВЭТСХ
Диаметр пор, нм	6	6	120-150	120-150	120-150	120-150
Объем пор, мл/г	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	500	300	350	350	350	350
Фракционный состав, мкм	5-40	10-20	5-20	8-12	5-17	8-12
Толщина слоя, мкм	100	100	130±10	130±10	100±10	100±10
Связующие	Крахмал		Силиказоль			

ТАБЛИЦА 1.5

Характеристики пластинок с модифицированными силикагелями [16]

Фирма-производитель, страна	Обозначение пластинок	Модифицирующая функциональная группа	Диаметр частиц, мкм	Примечание
"Merck", Германия	TLC RP-2	C <sub>2</sub>	11-13	Неполное силинизирование
	TLC RP-8	C <sub>8</sub>	11-13	
	TLC RP-18	C <sub>18</sub>	11-13	
	HPTLC RP-2	C <sub>2</sub>	5-7	
	RP-8	C <sub>8</sub>	5-7	
	RP-18	C <sub>18</sub>	5-7	
	-NH <sub>2</sub>	n-аминопропил	5-7	
	-CN	-циано	5-7	
	-DIOL	-диол	5-7	
	RP-2(S), RP-8(S), RP-18(S)		5-7	
"Macherey-Nagel", Германия	CHIR	L-4-оксипролин + Cu <sup>2+</sup>	5-7	С хиральной фазой [22]
	SILC 18-100	C <sub>18</sub>	5-10	Степень силинизирования 100, 75, 50 %
	SILC 18-75	C <sub>18</sub>	5-10	
SILC 18-50	C <sub>18</sub>	5-10		
"Whatman", США	KC-2	C <sub>2</sub>	10-14	Полное силинизирование (end-capped)
	KC-8	C <sub>8</sub>	10-14	
	KC-18	C <sub>18</sub>	10-14	
	Multi KCS 5	C <sub>18</sub>	10-14	
	-biphenyl	Дифенилметил	10-14	

В настоящее время пластинки “Силуфол”, “Армсорб” и “Лайне Калур” не выпускаются.

Ниже приведены характеристики пластинок с силикагелем, имеющим монолитную структуру, фирма “Merck” (Германия) [5]:

Размер пластинок, мм	60 × 36
Толщина слоя, мкм	10
Диаметр мезопор, нм	3–4
Диаметр макропор, мкм	1–2
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	350
Объем пор, мл/г	0,3

В России с 1988 г. начато промышленное производство хроматографических пластинок “Сорбфил” на базе силикагеля КСКГ, разработанных ИВС АН СССР и НТЦ “Ленхром” (Россия) [патент № 1736541 РФ, 1993] и выпускаемых ЗАО “Сорбполимер” (Россия) [40]. Эти пластинки выпускаются как в аналитическом варианте (размер частиц 5–17 мкм – ПТСХ-А), так и высокоэффективном (размер частиц 8–12 мкм – ПТСХ-В). Слой силикагеля нанесен на полиэтилентерефталатную подложку (ПТСХ-А(В)-П) или на алюминиевую фольгу (ПТСХ-А(В)-П(АФ)-УФ); с флуоресцентным индикатором или без него (ПТСХ-А(В)-П(АФ)). Толщина слоя силикагеля составляет  $100 \pm 10$  мкм; сорбент нанесен на подложку равномерно, что позволяет проводить денситометрические измерения.

Было показано, что метрологические характеристики методик (при количественном определении ряда соединений) на этих пластинках мало отличаются от характеристик, полученных при разделении тех же объектов при использовании аналогичных по классу пластинок фирмы “Merck” (Германия) [41–43]. Однако необходимо отметить, что для получения максимальной эффективности разделения на пластинках “Сорбфил” и фирмы “Merck” необходим индивидуальный подбор подвижной фазы, поскольку толщина и химический состав слоев у этих пластинок неодинаковы. Использование подвижных фаз, рекомендованных для пластинок фирмы “Merck” и “Силуфол” (“Kavalier”, Чехия), для пластинок “Сорбфил”, как правило, неприемлемо и приводит к резкому уменьшению эффективности разделения и падению селективности.

Ряд фирм выпускает двухфазные пластинки, покрытые двумя адсорбентами (рис. 1.18). К ним относят в первую очередь пластинки с зоной для концентрирования проб, у которых полоса шириной 2–2,5 см покрыта адсорбционно-неактивным адсорбентом (обычно силикагель с диаметром пор 500 нм или диатомит) – так называемый преадсорбционный слой, а остальная часть пластинки –

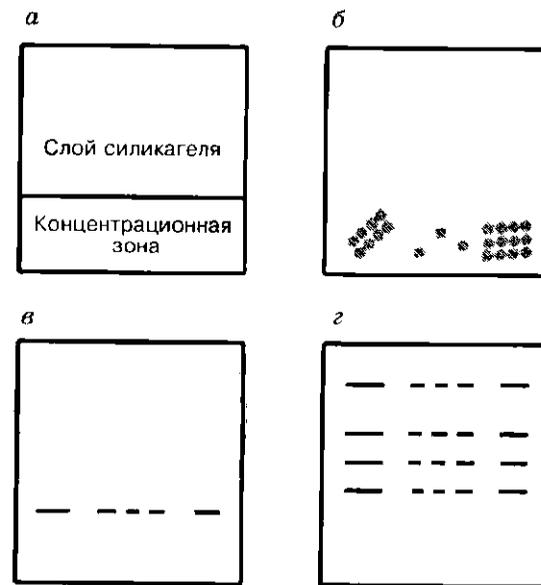


Рис. 1.18. Разделение стандартной смеси пищевых красителей на ТСХ-пластинке фирмы “Macherey-Nagel” с преадсорбционным слоем: а – внешний вид пластинки; б – нанесение образцов; в – концентрирование (фокусирование); г – разделение [34]

обычным силикагелем. Такие пластинки находят широкое применение в биохимии, клинической химии и для контроля качества фармацевтических препаратов. У пластинок указанного типа качество разделения практически не зависит от размера стартового пятна, объема и количества нанесенной пробы вещества, так как нанесенные зоны концентрируются в виде узких полос на границе адсорбентов и далее хроматографируются в виде полос. Это повышает эффективность разделения, экономит время, позволяет предварительно очищать образцы в зоне неактивного адсорбента. Двухфазные пластинки позволяют также концентрировать очень разбавленные пробы. В частности, фирма “Merck” выпускает три разновидности пластинок с зоной концентрирования: обычные, высокоэффективные и для препаративной ТСХ.

В двухфазных пластинках другого типа (фирма “Whatman”) полоса шириной 3 см (2 см – для ВЭТСХ) покрыта силикагелем, модифицированным фазой RP-18, а остальная часть пластинки – обычным силикагелем. На таких пластинках можно реализовать двумерную ТСХ сложных многокомпонентных смесей с

разделением компонентов в обоих направлениях по разным механизмам.

Предложена двухпластиночная (“grafting”) ТСХ-система для этих целей, когда разделение проводят сначала на одной пластинке в одном направлении, а затем пластинки соединяют таким образом, чтобы при хроматографировании во втором направлении вещества переходили на другую пластинку, после чего осуществляется хроматографирование в другом направлении с использованием иного механизма межмолекулярных взаимодействий. Преимущество этой системы заключается в возможности переноса вещества с одной пластинки на другую для дальнейшего анализа без извлечения, элюирования и повторного нанесения [16].

### 1.7. ПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ

В основе хроматографического разделения лежит взаимодействие молекул компонентов разделяемой смеси с неподвижной и подвижной фазами. Однако далеко не все растворители могут быть использованы в качестве подвижной фазы. Элюенты, используемые в ПХ, должны удовлетворять определенным требованиям: быть малотоксичными и содержать минимум компонентов [44, 45]. Результаты, получаемые при использовании многокомпонентных (4 и более) элюентов, как правило, трудно воспроизводимы. Индивидуальные компоненты подвижных фаз должны быть очищены. Подвижная фаза не должна вступать в химические реакции ни с сорбентом, ни с компонентами разделяемой смеси. Часто весьма желательно добавление к подвижной фазе модификаторов – веществ кислого или основного характера для подавления диссоциации молекул компонентов разделяемой смеси. Подвижная фаза должна быстро испаряться с поверхности хроматограммы после проведения разделения.

При использовании элюентов, имеющих незначительную вязкость, необходимо проводить разделения в минимально короткие сроки, чтобы предотвратить уширение хроматографических зон за счет диффузии. Компоненты подвижной фазы не должны существенно различаться по полярности во избежание расслоения элюента непосредственно на слое сорбента [45]. Рассмотрим это явление на конкретном примере: имеется четырехкомпонентная подвижная фаза  $A + B + C + D$  ( $n$ -гексан + метанол + этилацетат + уксусная кислота) (рис. 1.19).

На начальном этапе хроматографирования компонент  $D$  адсорбируется на неподвижной фазе; по мере продолжения элюирования то же самое происходит с компонентом  $C$  и с компонентом  $B$ .

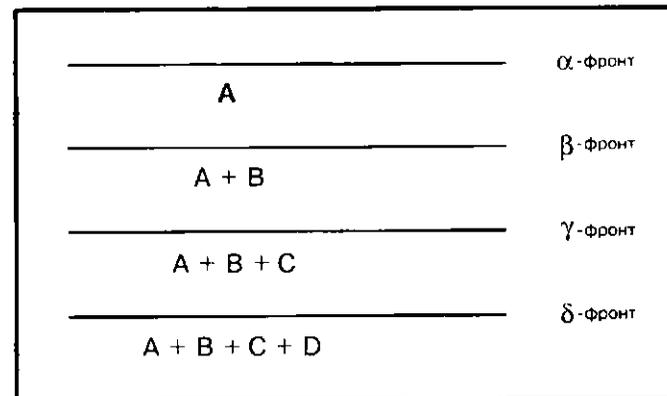


Рис. 1.19. Расслоение смешанной подвижной фазы во время хроматографического разделения, приводящее к образованию вторичных фронтов

В результате только компонент  $A$  движется с фронтом. Такой ступенчатый градиент, как правило, концентрирует отдельные компоненты смеси в виде узких зон в областях, где реализуется изменение полярности подвижной фазы, вызванное адсорбцией слоем сорбента ее индивидуальных компонентов.

Для практического выбора подвижной фазы на начальном этапе рекомендуется использовать треугольник Шталя [46]. Он позволяет произвести ориентировочный выбор подвижной и неподвижной фазы для разделения исследуемых образцов (как полярных, так и неполярных) с учетом механизма хроматографического разделения (адсорбционный или распределительный) (рис. 1.20).

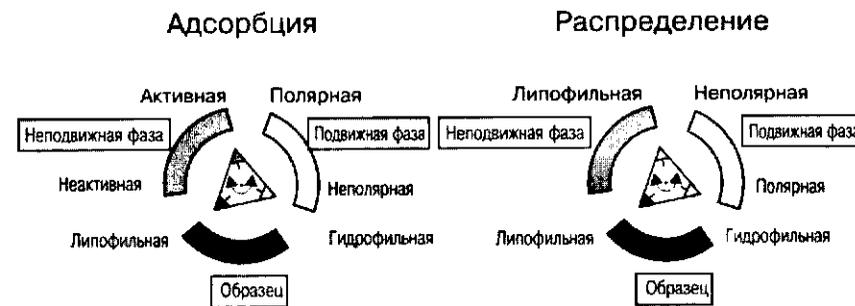


Рис. 1.20. Треугольная диаграмма по Шталю

Из рисунка видно, что один из углов вращающегося треугольника указывает на характерные особенности образцов (липофильность или гидрофильность), а характеристики необходимых для разделения неподвижной и подвижной фаз считаются напротив других углов треугольника.

В настоящее время существует ряд классификаций подвижных фаз, которые основываются, главным образом, на физических свойствах их компонентов. Однако изначальные предпосылки, лежащие в основе этих классификаций, различны, поэтому их прямое сопоставление крайне затруднено [47].

В настоящем разделе будут рассмотрены две классификации, получившие наиболее широкое распространение.

**Элюотропные ряды.** Термин “элюотропные ряды” был впервые использован В. Траппе [48]. Растворители были размещены в ряд по мере возрастания силы элюирования ( $\epsilon^\circ$ ). Элюирующая сила растворителя является безразмерной величиной, зависящей только от вязкости и поверхностного натяжения растворителя. Элюирующая сила *n*-пентана была условно принята за нуль. Элюирующая сила, согласно представлению Траппе, соответствует энергии адсорбции молекул растворителя на единицу площади поверхности сорбента в зависимости от его активности по отношению к “жидкой подвижной фазе”. Учитывая это, вполне понятно, что элюирующая сила различна для каждой комбинации сорбент – подвижная фаза.

Ниже приведено сравнение элюотропных рядов для силикагеля и оксида алюминия в порядке возрастания элюирующей силы:

Силикагель	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Пентан	<i>n</i> -Пентан
<i>n</i> -Гексан	<i>n</i> -Гексан
Циклогексан	Циклогексан
Четыреххлористый углерод	Четыреххлористый углерод
Толуол	Толуол
Хлороформ	Диэтиловый эфир
Дихлорметан	Хлороформ
Диэтиловый эфир	Дихлорметан
Уксусная кислота	Ацетон
Ацетон	Уксусная кислота
Этанол	Пиридин
Метанол	Этанол
Пиридин	Метанол
Вода	Вода

На рис. 1.21 показано разделение смеси антибиотиков тилозина, дезмикозина и реломицина, продуцируемых культурой

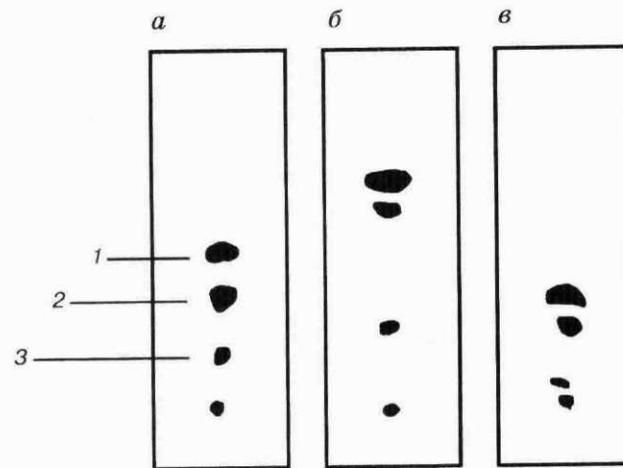


Рис. 1.21. Разделение антибиотиков, содержащихся в культуральной жидкости *Str. fradiae* (1 – тилозин; 2 – дезмикозин; 3 – реломицин) в бинарных смесях растворителей. Элюирующая сила растворителя для бинарной системы  $\epsilon_{ab}^\circ = 0,18$  [43]:

*a* – 7,1 % этилацетата в гексане; *b* – 9,53 % ацетона в гексане; *в* – 29,9 % толуола в гексане

*Str. fradiae*, выполненной на ТСХ-пластинках “Сорбфил” (ПТСХ-П-В-УФ) при 22 °С, относительной влажности 64 % в трех бинарных элюентах, имеющих одну и ту же элюирующую силу ( $\epsilon_{ab}^\circ = 0,18$ ). Как видно из рисунка, в случае каждого разделения эффективность и селективность были различны. Ранее полученные данные [14, 18, 49] также указывают на ограниченность в использовании этой классификации на практике.

**Классификация Снайдера.** В противоположность элюотропным рядам Л. Снайдер распределил [50, 51] большинство растворителей, используемых в ПХ, на восемь групп с учетом их дипольных, протонодонорных и протоноакцепторных свойств. Эти группы были размещены внутри правильного треугольника, каждая из сторон которого отражает увеличение (или



Рис. 1.22. Треугольник селективности по Снайдеру [50, 51]

ТАБЛИЦА 1.6  
Значения силы растворителя  $S_i$  для нормальных неподвижных фаз

Группа	Растворитель	$S_i$
I	<i>n</i> -Гексан	0
	<i>n</i> -Бутиловый эфир	2,1
	Изопропиловый эфир	2,4
	Метил- <i>трет</i> -бутиловый эфир	2,7
	Диэтиловый эфир	2,8
II	1-Бутанол	3,9
	2-Пропанол	3,9
	1-Пропанол	4
	Этанол	4,3
	Метанол	5,1
III	Тетрагидрофуран	4
	Пиридин	5,3
	Метоксиэтанол	5,5
	Диметилформамид	6,4
IV	Ледяная уксусная кислота	6
	Формамид	9,6
V	Дихлорметан	3,1
	1,2-Дихлорэтан	3,5
VI	Этилацетат	4,4
	Метилэтилкетон	4,7
	Диоксан	4,8
	Ацетон	5,1
VII	Ацетонитрил	5,8
	Толуол	2,4
VIII	Нитробензол	4,4
	Хлороформ	4,1
	Нитрометан	6
	Вода	10,2

ТАБЛИЦА 1.7  
Значения силы растворителя  $S_i$  для обращенных неподвижных фаз

Группа	Растворитель	$S_i$
II	Вода	0
	Метанол	2,6
	Этанол	3,9
	2-Пропанол	4,2
III	Тетрагидрофуран	4,5
IV	Ацетонитрил	3,2

уменьшение) протонодонорных свойств, а также силу дипольных взаимодействий (рис. 1.22). На основании хроматографических характеристик каждому элюенту была приписана определенная сила растворителя. Значения силы растворителя ( $S_i$ ) для нормальнофазовой и обращеннофазовой хроматографии представлены в табл. 1.6 и 1.7. В прямофазовой хроматографии сила растворителя для *n*-гексана условно была принята за нуль, что используется в практической работе при подборе элюирующих систем. В случае обращеннофазовой хроматографии (табл. 1.7) за 0 была принята сила растворителя для воды, поэтому именно ее используют для регулирования силы элюентов, применяемых для разделения смесей на RP-фазах. Силу растворителя смеси ( $S_i$ ) рассчитывают на основании силы растворителя индивидуальных компонентов ( $S_i^*$ ) и объемных долей этих компонентов в смеси ( $\theta_i$ ) [52]:

$$S_i = \sum_1^l S_i^* \theta_i$$

## 1.8. МЕТОДЫ ПОДБОРА И ОПТИМИЗАЦИИ ПОДВИЖНЫХ ФАЗ

Для подбора ПФ в планарной хроматографии обычно используют:

- литературные источники;
- стандартные подвижные фазы;
- метод “элюирования пятна”;
- схему, предложенную фирмой “Camag” (Швейцария);
- модель “ПРИЗМА”;
- вариокамеры.

1. В практической работе при использовании подвижных фаз, полученных из литературных источников, для разделения определенной группы соединений необходимо учитывать:

- тип сорбента;
- марку сорбента;
- толщину слоя сорбента;
- условия промывания и активирования пластинок перед работой;
- тип камеры, в которой осуществлялось элюирование;
- насыщение камеры;
- время насыщения камеры, а в некоторых случаях и пластинок;
- температуру и относительную влажность воздуха лабораторного помещения;

– наличие и содержание стабилизаторов в растворителях, таких как хлороформ, метиленхлорид и др., если последние входят в состав подвижных фаз.

Только при учете всех перечисленных выше факторов можно воспроизвести разделение с приемлемым разрешением и селективностью.

2. Фирма “Самэг” предлагает использовать стандартные двух- (трех)компонентные подвижные фазы для адсорбционной и распределительной хроматографии [7]. Соотношения компонентов в этих системах необходимо выбирать, взяв в качестве критерия максимально высокую эффективность разделения и селективность. Представлены следующие стандартные системы для адсорбционной ПХ:

- хлороформ – метанол;
- хлороформ – ацетон;
- диэтиловый эфир – толуол;
- диэтиловый эфир – *n*-гексан – уксусная кислота;
- этилацетат – метанол;
- этилацетат – толуол.

Для распределительной ПХ:

- хлороформ – метанол – вода;
- хлороформ – метанол – вода – водный аммиак;
- хлороформ – метанол – вода – уксусная кислота;
- бутанол – 1-уксусная кислота – вода;
- бутанол – 1-пиридин – вода;
- этилацетат – муравьиная кислота – вода.

3. Метод “элюирования пятна” (“Spot test”) основан на разделении исследуемой смеси с помощью микрокруговой хроматографии методом “проб и ошибок” [53]. Исследуемую смесь растворяют в минимальном объеме растворителя, имеющего невысокую полярность, наносят несколько пятен на пластинку, в центр каждого из пятен вводят растворители (~20 мкл) с различной силой (по Л. Снайдеру), осуществляя круговую хроматографию каждого из пятен (рис. 1.23). При получении положительных результатов разделения компонентов смеси затем подбирают оптимальный состав подвижной фазы. Критерием такого выбора является максимальное количество разделенных компонентов. В нашем примере таким растворителем является бензол. Преимуществами данного метода являются его простота в исполнении и экспрессность, что дает возможность использовать его при массовом скрининге даже в полевых условиях [54].

4. Схема оптимального выбора подвижной фазы, предложенная фирмой “Самэг”, представлена на рис. 1.24 [55]. Она включает

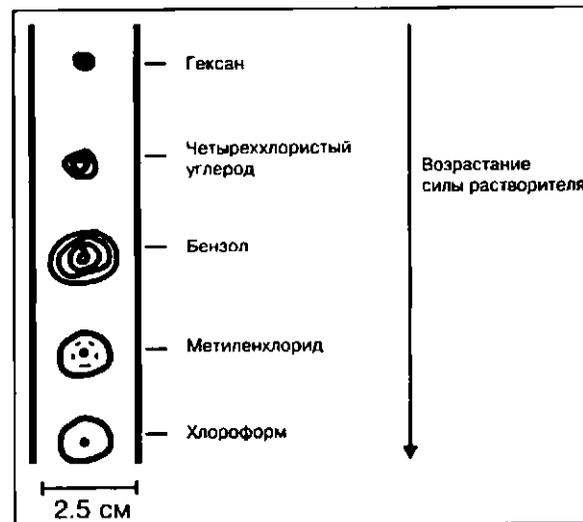


Рис. 1.23. Применение метода “элюирования пятна” (“Spot test”) для выбора подходящего растворителя для разделения компонентов лавандового масла [53]

четыре ступени (уровня): исследуемая смесь на первом этапе подвергается разделению в 12 растворителях, имеющих различную силу и принадлежащих к 1–3 и 5–8 группам селективности Снайдера (рис. 1.24, а) [50].

На втором этапе производится увеличение или уменьшение силы растворителя, в случае использования которого наблюдалось разделение компонентов смеси с помощью добавления воды или *n*-гексана (рис. 1.24, б). На этом этапе осуществляется разделение в подвижной фазе, составленной из двух наиболее селективных элюентов, взятых в соотношении 5/5. На третьем этапе в случае необходимости добавляется модификатор кислой или основной природы в трехкомпонентную систему (рис. 1.24, в). На четвертом этапе производится выбор оптимальной по селективности элюирующей системы посредством вариации компонентов подвижной фазы, полученной на третьем этапе (рис. 1.24, г). Таким образом, согласно примеру, приведенному на рис. 1.24, оптимальная подвижная фаза представляет собой смесь гексана, хлористого метилена и этанола.

5. Модель “Призма” (рис. 1.25) была разработана Ш. Нейреди для подбора и оптимизации элюирующих систем в прямофазовой и обращеннофазовой ПХ [56]. Эта модель представляет собой

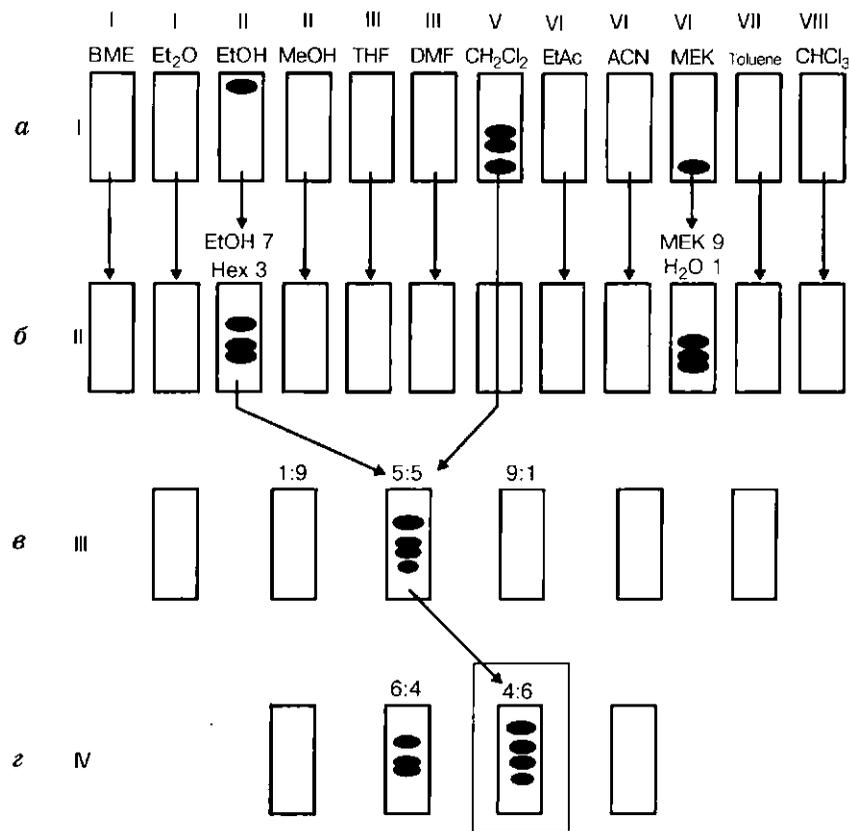


Рис. 1.24. Схема подбора и оптимизации подвижной фазы, предложенная фирмой "Samag" (Швейцария):

*a* – первый уровень: индивидуальные растворители; *b* – второй уровень: уменьшение содержания гексана или увеличение содержания воды с целью повышения силы элюента; *c* – третий уровень: создание трехкомпонентной подвижной фазы (возможно добавление модификатора кислотной или основной природы, в случае необходимости); *d* – четвертый уровень: выбор оптимальной подвижной фазы.

I BME – метилбутиловый эфир; I Et<sub>2</sub>O – диэтиловый эфир; II EtOH – этиловый спирт; II MeOH – метиловый спирт; III THF – тетрагидрофуран; III DMF – диметилформамид; V CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – хлористый метилен; VI EtAc – этилацетат; VI ACN – ацетонитрил; VI MEK – метилэтилкетон; VII – толуол; VIII CHCl<sub>3</sub> – хлороформ

трехмерный вариант треугольника Л. Снайдера, который является основанием призмы. Модель "Призма" дает принципиальную возможность, комбинируя составом 2–5-компонентного элюента, осуществить разделение исследуемых смесей с высоким разрешением и селективностью.

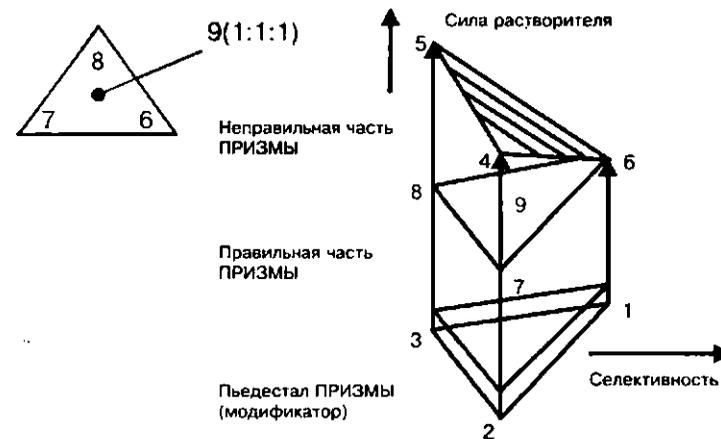


Рис. 1.25. Модель "Призма"

Углы треугольника, лежащего в основании (1, 2, 3), соответствуют селективности трех растворителей, входящих в состав конструируемой подвижной фазы. Эти растворители, как правило, принадлежат к различным группам селективности; причем в предварительных опытах устанавливается, что каждый из этих растворителей в той или иной степени пригоден для разделения исследуемой смеси. Вершины призмы (точки 4, 5, 6) соответствуют силе растворителя, а поскольку используемые растворители отличаются друг от друга по силе, построенная призма имеет неправильную форму. "Изоэлюотропное сечение" (точки 6, 7 и 8) и приводит к правильной призме, причем в точках 6, 7 и 8 сила всех трех растворителей одинакова. Силу растворителей 3 и 2 при этом уменьшают, добавляя *n*-гексан (более слабый растворитель). В таком случае при рассмотрении ребер призмы 2–7 и 3–8 мы получаем бинарную фазу, состоящую из одного растворителя и *n*-гексана. Если рассматривать грань призмы, то получается элюент, состоящий из двух растворителей и гексана. Пространству внутри призмы соответствует подвижная фаза, состоящая из трех растворителей и *n*-гексана.

Если к полученной таким образом элюирующей системе добавляется модификатор, который сконструирован под основанием призмы в виде пьедестала (рис. 1.25), то количество индивидуальных растворителей в элюенте будет равно пяти.

В практической работе первоначально испытывается смесь растворителей, взятая в соотношении (1 : 1 : 1) (точка 9 в центре треугольника 6, 7 и 8), и в том случае, если величины  $R_f$  компонентов

исследуемой смеси лежат в диапазоне выше 0,7, то к четырехкомпонентному элюенту (растворители 1, 2, 3 и *n*-гексан) добавляют дополнительно *n*-гексан, а в случае  $R_f < 0,2$  – к элюенту добавляется вода. Затем переходят к неправильному треугольнику (верхняя грань призмы – рис. 1.25 и 1.26, точки 4, 5 и 6) и проверяют селективность в точках 8:1:1; 1:8:1 и 1:1:8 внутри треугольника 4–5–6. Необходимо отметить, что если в элюирующую систему был введен модификатор, то в последующих экспериментах его нужно добавлять в тех же количествах. Если полученные результаты по разделению смеси будут удовлетворительными, проверяют селективность разделения в точках 7:2:1; 2:7:1 и 1:2:7, а также в их окрестностях, добиваясь наилучшей селективности и эффективности разделения. После нахождения оптимального соотношения компонентов элюента можно провести дополнительную оптимизацию (по селективности и разрешению), увеличивая или уменьшая силу элюента и(или) количество модификатора.

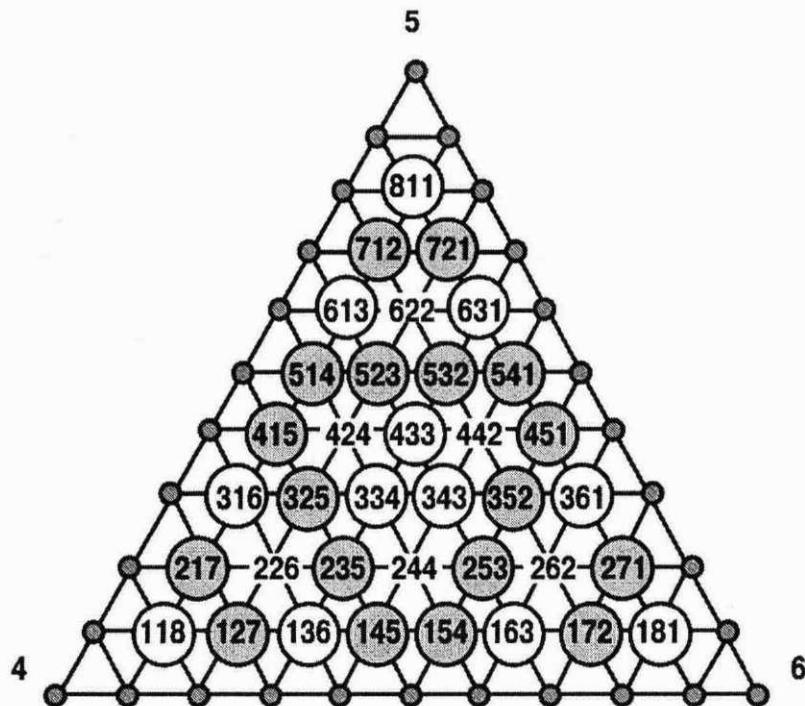


Рис. 1.26. С помощью трехзначных чисел описываются точки селективности в верхнем треугольнике модели “Призма” [56]

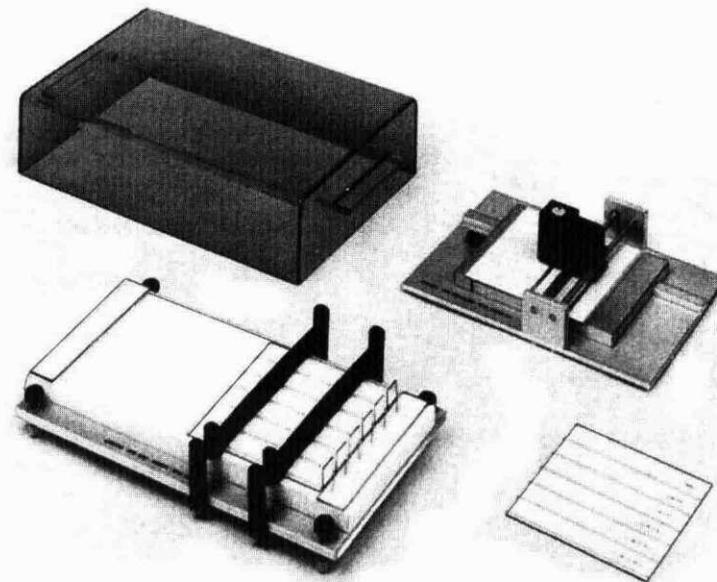


Рис. 1.27. Внешний вид ВЭТСХ-вариокамеры фирмы “Самэг” (Швейцария) [5]

Достоинствами модели “Призма” являются:

- легкость в использовании;
- быстрое получение воспроизводимых результатов;
- применимость ко всем видам ЖХ.

К недостаткам можно отнести следующее:

- отсутствие учета газовой фазы в хроматографической камере;
- трудности при разделении сильнополярных соединений;
- расхождение между расчетными данными и результатами, полученными на практике.

6. Firmой “Самэг” была разработана ВЭТСХ-вариокамера, представляющая собой разновидность горизонтальной S-камеры (рис. 1.27), которая предназначена для разделения исследуемой смеси с применением шести различных элюентов одновременно. Элюирование проводится независимо по шести дорожкам на стеклянной пластинке размером 10 × 10 см. Дорожки разделены бороздками (3 мм), которые вырезаются в слое сорбента с помощью специального приспособления. “Уравновешивание” каждой из 6 дорожек в парах индивидуального элюента осуществляется в пределах от 3 до 5 мин, после чего происходит элюирование на каждой

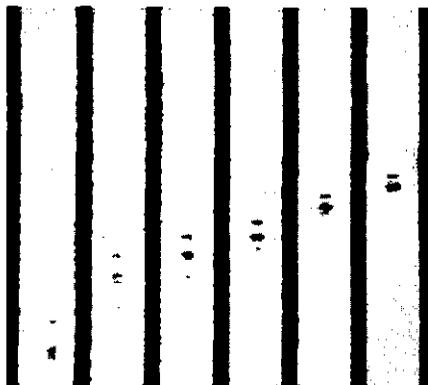


Рис. 1.28. Разделение кортико-стероидов в ВЭТСХ-вариокамере с помощью шести различных элюентов. Относительная влажность 72 %. Элюенты: хлороформ, хлороформ – метанол: 93 : 7; 95 : 5; 90 : 10; 85 : 15 и 80 : 20 [5]

из дорожек. На рис. 1.28 показан пример подбора оптимальной фазы для разделения кортикостероидов [5]. К недостатку вариокамеры можно отнести то, что при работе с ней требуются только ВЭТСХ-пластинки размером  $10 \times 10$  см, выполненные на стеклянной подложке.

### 1.9. МЕТОДЫ НАНЕСЕНИЯ ПРОБ

Как уже было изложено выше, эффективность хроматографического разделения и метрологические характеристики результатов, полученных после количественной обработки хроматограмм, зависят от многих факторов, в том числе и способа нанесения пробы на пластинку. Так, если диаметры стартовых зон велики, то разрешение при разделении существенно ухудшится и значительно возрастет ошибка при количественном определении [44]. Повреждение стартовой зоны при нанесении пробы недопустимо [14]. При нанесении пробы необходимо [29]:

- легкое удаление растворителя со стартовой зоны;
- растворитель должен растворять не менее 1 г исследуемого вещества в 100 мл;
- растворитель не должен иметь высокую полярность (рис. 1.29);
- для удаления растворителя со стартовой зоны при работе с термолabileльными веществами не следует нагревать пластинку. Не рекомендуется использование потока горячего воздуха (фен или термовентилятор), так как это приводит к загрязнению пластинки;
- промытую и активированную хроматографическую пластинку рекомендуется накрывать стеклянной пластинкой, оставляя свободной лишь стартовую зону;

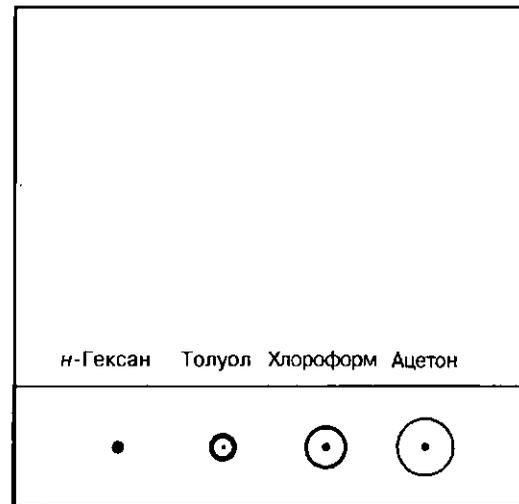


Рис. 1.29. Влияние растворителя на диаметр пятна в стартовой зоне при нанесении одного и того же объема вещества, растворенного в различных растворителях при одинаковой концентрации растворов

– диаметр стартовой зоны для ВЭТСХ-пластинок не должен превышать 1,0–1,5 мм, в случае ТСХ-пластинок он может варьировать от 2 до 4 мм [57].

Существуют три способа нанесения вещества на пластинку: из раствора, нанесение сухого образца и контактное нанесение растворов соединений, имеющих высокую вязкость [46].

На практике обычно используется первый способ. Нанесение пробы на пластинку из раствора осуществляется в точку в виде пятна или в виде полосы. Многочисленные исследования показали, что при нанесении полосой с эжектированием эффективность разделения выше, чем в случае нанесения в виде пятна при одинаковом содержании вещества в пробе и ее объеме. На рис. 1.30 показана эффективность разделения модельной смеси красителей при нанесении в точку 1 и 2 дорожки, в точку с эжектированием – 3 и 4 дорожки, полосой без эжектирования – 5 и 6 дорожки и полосой с эжектированием – 7 и 8 дорожки. Из рисунка видно, что при нанесении в точку без эжектирования нанесение сопровождается круговой хроматографией смеси красителей.

Рассмотрим приборы, которые предназначены для нанесения пробы в точку.

Нанесение пробы на пластинку осуществляется:

- калиброванными капиллярами с тупым концом;

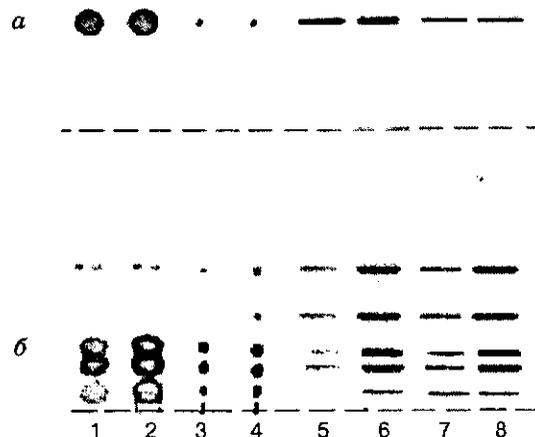


Рис. 1.30. Влияние различных методов нанесения на разрешение при разделении модельной смеси красителей. Растворитель – метанол (5 и 10 мкл). Стационарная фаза – ВЭТСХ-пластинки “Kieselgel 60”. Подвижная фаза – толуол

Слева направо: нанесение в точку без эжектирования – 1 и 2 дорожки (5 и 10 мкл), нанесение в точку с эжектированием 3 и 4 дорожки (5 и 10 мкл), нанесение в виде полосы без эжектирования 5 и 6 дорожки (5 и 10 мкл) и нанесение в виде полосы с эжектированием – 7 и 8 дорожки (5 и 10 мкл);

*a* – зоны нанесения смеси красителей до проведения разделения; *b* – разделение смеси красителей [7]

- микрошприцами (поршневыми) с тупым концом иглы;
- специальными аппликаторами.

Калиброванные стеклянные или платино-иридиевые капилляры, используемые для нанесения пробы, обычно имеют следующие объемы: 0,5; 1,0; 2,0 и 5,0 мкл; при этом погрешность в дозировании не превышает 5 % [5]. Для количественных измерений рекомендуют использовать один и тот же капилляр для нанесения растворов проб и стандартных образцов, промывая его между нанесениями. Капилляры имеют существенный недостаток – растворитель с высокой летучестью может частично испариться из капилляра еще до нанесения пробы, поэтому возникает необходимость в использовании поршневых шприцев.

Поршневые шприцы работают по принципу “замещения объема”, и нет необходимости касаться слоя сорбента при нанесении образца. Объем дозирования при нанесении пробы шприцем (в отличие от микрокапилляров) не лимитирован. Для получения хорошей воспроизводимости результатов при нанесении раствора шприцем на пластинку необходимо использовать шприцы с тупыми концами игл. В этом случае обратный ход жидкости в

шприц должен быть затруднен. Обратный ход можно свести к минимуму посредством покрытия иглы, например, микропленкой фторопласта-4 [14]. Поршень должен иметь хорошее уплотнение на конце, например, выполненное из фторопласта-4, чтобы наносимый раствор не мог проходить между поршнем и стеклянным корпусом. Поршень шприца должен быть всегда в контакте с приводом, чтобы не произошло спонтанное падение поршня. Корпус шприца не должен двигаться во время нанесения.

Для уменьшения погрешности, которая возникает при нанесении шприцем в точку, рекомендуется применять ручные шаговые дозаторы или аппликаторы типа “Nanomat III” фирмы “Camag”. Проба в виде полосы наносится с помощью аппликаторов методом эжектирования. При этом используется азот или сжатый воздух\*. Одновременно происходит удаление растворителя из стартовой зоны. Из выпускаемых и наиболее широко используемых в настоящее время аппликаторов следует отметить: “Linomat IV”, “Linomat V”, ATS-4 (снабжен автосамплером) фирмы “Camag” и AS-30 фирмы “Desaga” (Германия) [58]. Нанесение осуществляется при возвратно-поступательном движении столика аппликатора (по оси X), на котором закреплена пластинка. Управление этими приборами (кроме “Linomat IV”, имеющего встроенный процессор) производится с помощью компьютера. В случае аппликатора “Linomat V” скорость нанесения устанавливается автоматически в зависимости от выбранного растворителя и варьирует в пределах от 30 до 500 нл/с [59]. В аппликаторах “Linomat V” и AS-30 в качестве дозатора используются шприцы объемом 100 или 500 мкл, в то время как в случае ATS-4 используются шприцы объемом 10, 25 и 100 мкл с системой автоматической промывки [60].

В России в настоящее время выпускаются наборы микрокапилляров с тупым концом объемом 0,5; 0,1; 2,0 и 5,0 мкл, микрошприцы объемом 1,0 и 10,0 мкл, а также шаговые дозаторы для этих шприцев. Это оборудование выпускается фирмами ИТЦ “Ленхром” (г. Санкт-Петербург) [61] и ЗАО “Сорбполимер” (г. Краснодар). ЗАО “Сорбполимер” выпускает ручной аппликатор “Сорбфил” для нанесения проб в виде пятна, снабженный микрошприцем МШ-10М и столиком с электроподогревом поверхности для удаления растворителя с хроматографических пластинок при нанесении проб [62]. В 2003 г. ЗАО “Сорбполимер” освоил выпуск автоматического аппликатора “Сорбфил”. Этот прибор позволяет осуществить нанесение 10 проб на пластинку шприцем объемом 10 мкл с автоматической системой промывки. Прибор управляется с помощью компьютера, программа “Сорбфил” выполнена на

\* Сжатый воздух должен быть тщательно очищен.

русском языке. Аппликатор способен наносить пробы как в виде пятна, так и в виде полосы; нанесение пробы производится методом эжектирования [62].

### 1.10. ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КАМЕР К РАЗДЕЛЕНИЮ

В настоящее время в практической работе для элюирования хроматограмм используют вертикальный и горизонтальный способы, а также проявление на установках АМД и "Хромпресс" (см. разд. 1.5). Круговой и антикруговой способы элюирования сейчас не применяются. Для вертикального элюирования выпускаются камеры конструкции Петрина, имеющие в середине дна перегородку (рис. 1.31) [63] и "классические" камеры (рис. 1.32).

В отличие от жидкостной хроматографии, в ПХ при разделении важную роль играет газовая фаза [64–67]. Слой сорбента обладает способностью насыщаться перед началом элюирования присутствующими в газовой фазе молекулами растворителей. Более

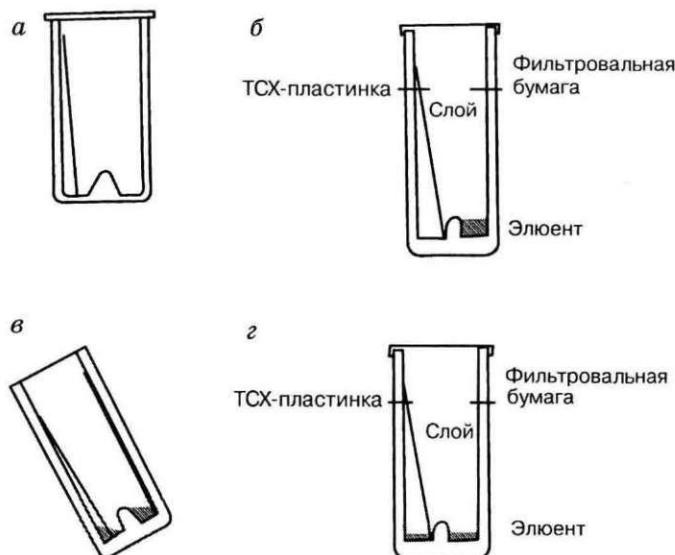


Рис. 1.31. Хроматографическая камера с перегородкой в центре дна:

*a* – элюирование пластинки (без насыщения); *б* – предварительное насыщение пластинки (в свободном от элюента резервуаре камеры) в насыщенной камере; *в* – заполнение растворителем свободного резервуара камеры для проведения элюирования пластинки посредством наклона камеры; *г* – элюирование пластинки, прошедшей стадию предварительного насыщения в насыщенной камере

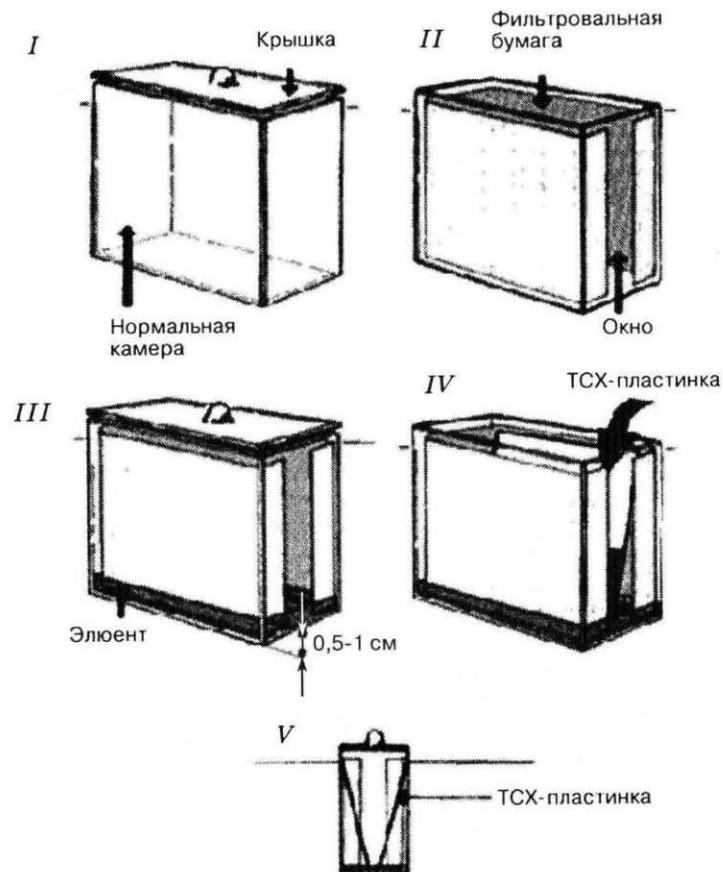


Рис. 1.32. Этапы работы с нормальной насыщенной камерой для ТСХ:

*I* – нормальная камера для ТСХ; *II* – внутренние стенки камеры обложены фильтровальной бумагой; *III* – хроматографическая камера заполнена элюентом (начало стадии насыщения); *IV* – установка ТСХ-пластинки в камеру и начало элюирования; *V* – элюирование двух пластинок в камере (вид сбоку)

того, молекулы элюента, поднимающиеся по слою, тоже взаимодействуют с молекулами газовой фазы. Молекулы компонентов разделяемой смеси, находясь во взаимодействии с молекулами подвижной и неподвижной фаз, также вовлекаются в контакт с молекулами газовой фазы. Перечисленные процессы в большинстве случаев протекают одновременно, и их прохождение нельзя трактовать по отдельности.

Так, по мнению Ф. Гейса, вопрос о насыщении в ПХ так же стар, как и сам метод [67]. Понятию “насыщение” в литературе придается не всегда один и тот же смысл, поэтому необходимо рассмотреть и конкретизировать используемые определения и термины, имеющие отношение к этому процессу.

Под насыщением хроматографической камеры подразумевается такое ее состояние, когда все компоненты подвижной фазы находятся в динамическом равновесии со всеми компонентами газовой фазы как до элюирования хроматографической пластинки, так и во время элюирования.

Под предварительным насыщением (синонимы – частичное насыщение, предварительная адсорбция, предварительное кондиционирование, паровое импрегнирование, предварительное насыщение слоя сорбента хроматографической пластинки газовой фазой) понимается сорбция молекул газовой фазы из атмосферы камеры несмооченным участком хроматографической пластинки независимо от степени насыщения камеры.

Сорбционное насыщение камеры – это такое ее состояние, когда несмооченная часть хроматографической пластинки находится в равновесии со всеми компонентами газовой фазы в атмосфере камеры, насыщенной всеми компонентами элюирующей системы. Иными словами, сорбционное насыщение – это экстремальный случай предварительного насыщения, когда степень предварительного насыщения достигла верхнего предела.

Время насыщения стандартной камеры (для пластинок  $20 \times 20$  см) составляет  $\sim 2,0$ – $2,5$  ч в зависимости от состава подвижной фазы. Однако этот процесс можно существенно ускорить (до  $0,5$ – $1,0$  ч), выложив внутренние стенки камеры фильтровальной бумагой, смоченной элюентом. Этот прием был разработан Э. Шталем в 1959 г. [46].

Все известные конструкции вертикальных камер в ПХ делятся на 2 класса (по объему) или, точнее, на 4 класса, если принять во внимание не только объем, но и наличие насыщения. Так, согласно Э. Шталю [46] камеры с глубиной газового пространства над слоем сорбента свыше 3 мм принято называть нормальными (N-камеры); камеры, у которых эта величина менее 3 мм, принято называть сэндвич-камерами (S-камеры). Необходимо отметить, что в последние годы вертикальные S-камеры используются весьма редко [20]. Основным недостатком “классических” N-камер является то, что невозможно осуществить сорбционное насыщение хроматографических пластинок перед элюированием, не поместив их на не смоченную элюентом подставку на дне камеры. Использование камер с перегородкой позволяет устранить этот

недостаток. Так, растворитель заливается в один из отсеков дна, затем камера насыщается, в свободный отсек помещается хроматографическая пластинка (рис. 1.31, б). После достижения сорбционного насыщения ( $\sim 30$  мин) свободный отсек заполняется элюентом путем поворота камеры на  $45$ – $60^\circ$  (рис. 1.31, в) с последующим возвратом в исходное положение, после чего начинается процесс элюирования (рис. 1.31, г). Камеры с перегородкой имеют и другое существенное преимущество перед классическими камерами: расход элюента в 2–3 раза меньше.

Для горизонтального линейного элюирования применяются S-камеры (рис. 1.33), выпускаемые фирмой “Camag” [5]. Элюирование в таких камерах можно одновременно осуществлять с двух сторон, что увеличивает ее производительность в 2 раза по сравнению с аналогичными камерами вертикального элюирования. Так, используя такую камеру для элюирования ВЭТСХ-пластинки ( $20 \times 20$  см) можно провести разделение 72 образцов при расходе элюента 2,5 мл (на каждый резервуар) и времени насыщения камеры 3–5 мин. Еще одной особенностью этой камеры является то, что движение растворителя по пластинке происходит только за счет капиллярных сил. Вклад гравитации, в отличие от камер вертикального элюирования, отсутствует. Элюирование останавливается в тот момент, когда фронты первого и второго элюентов входят друг с другом в контакт [14].

Таким образом, для получения воспроизводимых результатов необходимо строго учитывать следующие факторы:

- тип камеры;
- ее размер;
- насыщение камеры;
- сорбционное насыщение;
- температуру;
- относительную влажность.

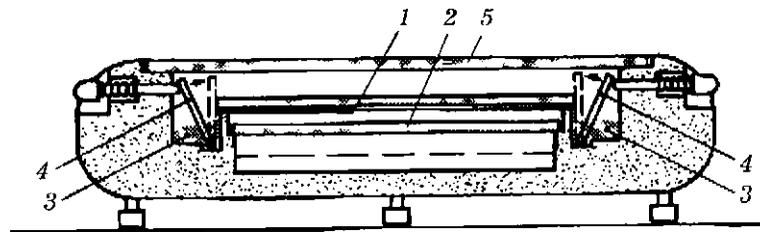


Рис. 1.33. Камера для горизонтального элюирования фирмы “Camag” (Швейцария):

1 – хроматографическая пластинка; 2 – стеклянная пластинка; 3 – резервуар для растворителя; 4 – стеклянные зажимы; 5 – крышка камеры

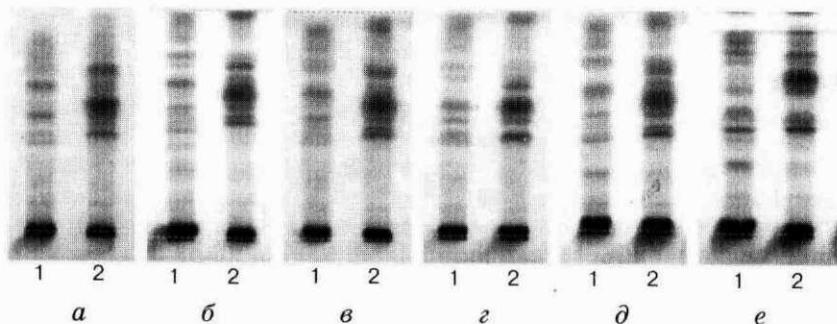


Рис. 1.34. Разделение двух растительных экстрактов (дорожка 1 – *Schisandra chinensis*, дорожка 2 – *Schisandra spenantha*). Стационарная фаза: ВЭТСХ-пластинки «Silica gel 60» F254 фирмы «Merck» (Германия). Подвижная фаза: толуол – этилацетат – уксусная кислота (70 : 30 : 3,0, *v/v*). Обнаруживающий реагент: конц. серная кислота – метанол (10 : 90, *v/v*):

*а* – камера с перегородкой в центре дна, насыщенная; *б* – ненасыщенная; *в* – горизонтальная камера, насыщенная; *г* – горизонтальная камера, ненасыщенная; *д* – горизонтальная сэндвич-камера, насыщенная; предварительное насыщение пластинок в парах элюента в течение 10 мин; *е* – горизонтальная сэндвич-камера (S-камера), ненасыщенная

На рис. 1.34 в качестве примера представлено разделение двух растительных экстрактов: дорожка 1 – *Schisandra chinensis* и дорожка 2 – *Schisandra spenantha*, – проведенное в камерах различного типа. На эффективность разделения существенным образом влияют тип камеры и наличие насыщения.

В России НТИЦ «Ленхром» [61] и ЗАО «Сорбполимер» [62] выпускаются классические N-камеры для элюирования пластинок размером 10 × 10, 10 × 15, 10 × 20 и 20 × 20 см. В ЗАО «Сорбполимер» недавно освоен выпуск камер, имеющих перегородку в середине дна для элюирования пластинок размером 10 × 10 и 10 × 15 см.

### 1.11. ВЛИЯНИЕ ВЛАЖНОСТИ И ТЕМПЕРАТУРЫ ВОЗДУХА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗДЕЛЕНИЯ

Молекулы воды сорбируются на поверхности слоя сорбента и инактивируют его. На рис. 1.35 представлено разделение поликонденсированных ароматических углеводородов (элюент *n*-гексан). Пластинки были промыты, активированы, на них было нанесено одинаковое количество образца, выдержаны в течение 30 мин в камерах с определенной относительной влажностью, после

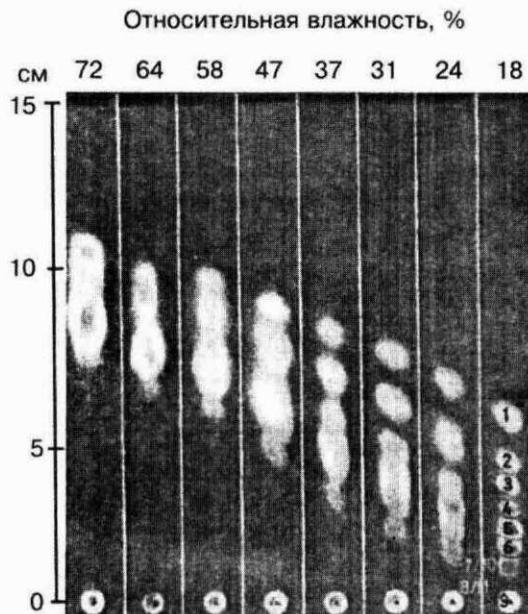


Рис. 1.35. Влияние относительной влажности на разделение поликонденсированных ароматических углеводородов

чего проэлюированы в одинаковых условиях. Из рис. 1.35 видно, что повышение влажности приводит к уменьшению удерживания и ухудшению эффективности разделения компонентов исследуемой смеси [68, 69].

В практической работе перед нанесением образца на слой сорбента необходимо:

- промыть и активировать пластинку;
- предохранять рабочую область пластинки от влияния атмосферной влаги во время нанесения, например, с помощью покровной стеклянной пластинки;
- хранить активированную пластинку в вакуум-эксикаторе или использовать камеру с контролируемой влажностью.

С этой целью используют водные растворы серной кислоты или насыщенные растворы ряда солей (табл. 1.8).

Влияние температуры в условиях одинаковой относительной влажности на эффективность разделения в планарной хроматографии сравнительно невелико. Видимо, этим и объясняется сравнительно небольшое количество работ, посвященных данному вопросу.

ТАБЛИЦА 1.8

Значения относительной влажности над растворами серной кислоты и насыщенными растворами солей [67]

Массовая доля серной кислоты, %	Относительная влажность, %	Соль, насыщенный раствор	Относительная влажность, %
10	96	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	96
20	88	KBr	84
30	75	NaNO <sub>2</sub>	66
40	56	NaHSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	52
50	35	KF	31
60	16	HCOOK	21
70	3	ZnCl <sub>2</sub> · 1,5H <sub>2</sub> O	10

Так, было показано [67], что изменение температуры в пределах  $\pm 5^\circ\text{C}$  вызывает колебания в величинах  $\Delta R_f$ ,  $\pm 0,02$  для большого ряда соединений, принадлежащих к различным классам, что находится в пределах воспроизводимости используемых методов разделения. Однако при разделении *L*-фенилаланина и *L*-тирозина при  $20^\circ\text{C}$  и  $60^\circ\text{C}$  была обнаружена разница в величинах  $\Delta R_f$ ,  $0,15 \pm 0,03$  при использовании подвижной фазы, состоящей из буганола-1, уксусной кислоты и воды (насыщение камеры 45 мин) [70]. Возможно, это обусловлено повышением растворимости *L*-тирозина при  $60^\circ\text{C}$ .

Разделение при температуре ниже комнатной проводят в том случае, если исследуемые соединения нестойки или обладают высокой летучестью.

## 1.12. ОБНАРУЖЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ НА ХРОМАТОГРАММАХ

Одним из преимуществ ПХ по сравнению с ВЭЖХ является возможность варьирования детектирующими методами и обнаруживающими реагентами (синонимы – визуализирующий, проявляющий (ранее)) для визуализации исследуемых соединений на хроматограммах.

Была предложена следующая классификация методов детектирования в ПХ [70–73]:

- физические методы;
- микробиологические и биохимические методы;
- химические методы.

### 1.12.1. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

К физическим методам относятся:

- собственное поглощение;
- гашение флуоресценции;
- флуоресценция;
- радиоактивные методы.

Они используются после хроматографического разделения.

Детектирование на хроматограммах пятен большого количества соединений, имеющих поглощение в УФ-области, обычно осуществляется при использовании пластинок, слой сорбента которых содержит флуоресцентный индикатор (люминофор), возбуждаемый при облучении УФ-светом (обычно при  $\lambda = 254$  или  $\lambda = 365$  нм). Пятна исследуемых соединений в этом случае можно наблюдать в виде темных зон на желто-зеленом или голубом фоне (в зависимости от типа люминофора).

Флуоресценция является наиболее чувствительным методом. Ее можно наблюдать при облучении хроматограммы УФ-светом (сорбент не должен содержать люминофора). Для увеличения интенсивности флуоресценции хроматограмму обрабатывают раствором сенсibilизатора или на короткое время погружают в жидкий азот [71].

Детектирование пятен на хроматограммах в условиях применения физических (поглощение или флуоресценция) и химических методов осуществляется визуально или с помощью фотоумножителя (сканер). Простейший метод визуализации – невооруженный глаз [18]. Флуоресцирующие или окрашенные вещества, а также их производные или комплексы, получаемые в результате дериватизации, могут быть оценены визуально по интенсивности флуоресценции или интенсивности окраски хроматографических зон. При проведении подобных полуколичественных исследований обученный лабораторный персонал должен уметь делать оценку с точностью до  $\pm 1,0\%$  [73]. Этот метод до сих пор широко применяется в отечественном фармакоанализе [74].

Радиоактивные методы вынесены нами в отдельный подраздел 1.12.2.

### 1.12.2. РАДИОАКТИВНЫЕ МЕТОДЫ

Радиоактивные методы количественного определения в ПХ основаны на детектировании элементарных частиц, испускаемых во время самопроизвольного распада ( $\alpha$ -,  $\beta^-$ -,  $\beta^+$ -распад, *k*-захват,  $\gamma$ -излучение и спонтанное деление тяжелых ядер) неустойчивых изотопов [46, 47, 75, 76].

В радиохроматографии обычно используются соединения, в состав молекул которых входят изотопы следующих элементов:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{131}\text{I}$ .

Радиоактивные методы можно использовать не только применительно к радиоактивным веществам, но и для количественного анализа нерадиоактивных соединений посредством введения в их молекулы радиоактивных “меток” или превращения нерадиоактивных веществ в радиоактивные [77].

Радиоактивные методы детектирования обладают высокой селективностью. Ряд детекторов чувствителен к виду излучения и его энергии, что позволяет селективно детектировать отдельные изотопы. Радиоактивные методы в ПХ характеризуются высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью и очень низким пределом обнаружения, который зависит от энергии элементарных частиц, условий разделения и системы детектирования.

Воспроизводимость результатов при использовании радиоактивных методов зависит от воспроизводимости нанесения пробы на пластинку, скорости сканирования, воспроизводимости условий разделения, чистоты материалов, используемых в конструкциях детекторов, а также от ряда других факторов, характерных для всех методов детектирования в ТСХ. В этих методах воспроизводимость определения может быть аналогичной воспроизводимости результатов в оптических методах детектирования. Следует учитывать, что радиоактивный распад – статистический процесс, поэтому, при прочих равных условиях, длительность процесса детектирования выше в ядернофизических методах по сравнению с оптическими методами. В связи с низкой скоростью сканирования радиохроматограмм потребность в такой характеристике детекторов, как постоянная времени, практически отсутствует.

Стабильность показаний детектирующей системы при количественном определении радиоактивных веществ зависит не только от электронной схемы самого детектора, но и в значительной степени от условий хроматографического разделения. Загрязнение сорбента радиоактивными веществами приводит к существенному искажению результатов анализа. При наличии радиоактивности у сорбента, подложки, элюента или связующего материала появляется фон, мешающий детектированию и приводящий к возникновению дрейфа нулевой линии при сканировании.

В настоящее время количественную обработку радиохроматограмм проводят следующими методами:

- Радиоавтография.
- Метод Ф. Снайдера.
- Автосцинтиллография.

- Элюирование вещества с хроматографических зон с последующим измерением радиоактивности с помощью жидких сцинтилляторов.
- Метод сжигания.
- Сканирование хроматографических полос с помощью денситометров, снабженных различными детекторами (детекторы Гейгера – Мюллера, на фотоэлементах и электронных фотоумножителях; детекторы на ионизационных и ионизационно-искровых камерах и т. д.) [78–87] (см. главу 2).

### Радиоавтография

Радиоавтографические методы детектирования ионизирующего излучения используют, в основном, для получения непосредственной или косвенной картины локальных распределений радиоактивных зон на ТСХ-пластинке. Радиоавтография осуществляется наложением рентгеновской пленки на готовую хроматограмму. Это должно обеспечивать разрешение, сравнимое с разрешением исходной хроматограммы, но время экспозиции, в зависимости от уровня радиоактивности, может изменяться от нескольких часов до нескольких дней или даже недель. Количественный анализ осуществляется сканированием проявленной пленки с помощью денситометра.

### Метод Ф. Снайдера

В этом методе детектируют разделенные на тонком слое сорбента радиоактивные вещества последовательным или выборочным отбором зон вещества и перенесением их вместе с сорбентом в жидкий сцинтиллятор [88].

В этом методе помимо количественной информации о каждой из зон можно получить распределительную кривую (гистограмму), нанося на график значения радиоактивности смежных зон вдоль траектории сканирования. С помощью этого метода можно количественно определять вещества в смежных зонах, значительно различающихся по уровню радиоактивности, так как разрешающая способность этого метода составляет 1–2 мм. Все операции могут быть полностью автоматизированы, что исключает контакт оператора с радиоактивными веществами. Преимущества метода можно оценить, сравнив автограмму смеси радиоактивных веществ после ее оптического сканирования и гистограмму, полученную по методу Ф. Снайдера (рис. 1.36) [81, 89, 90].

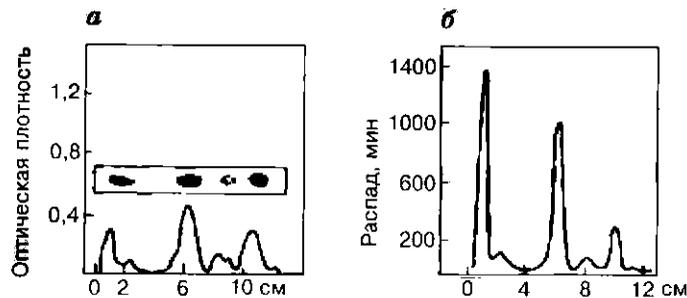


Рис. 1.36. Сравнение результатов детектирования ТСХ-хроматограмм автордиографическим методом (а) и методом Ф. Снайдера (б). Автордиограмму количественно обрабатывали с помощью денситометрии [81]

### Автосцинтиллография

Метод автосцинтиллографии отличается от автордиографии тем, что в состав сорбирующего материала вводят сцинтиллятор, и в результате этого происходит дополнительная засветка фотоэмульсии под воздействием возникающего светового излучения. Особенностью автосцинтиллографии является возрастание чувствительности и эффективности с понижением температуры при использовании фотоэмульсий, чувствительных в видимой области спектра. Интересным приемом, позволяющим сохранять хроматограмму для дальнейших исследований, является пропитка слоя сорбента бензолом, охлаждение ТСХ-пластинки до температуры жидкого азота (при которой бензол является хорошим сцинтиллятором) с последующим детектированием и нагревом хроматограммы до комнатной температуры с одновременным испарением бензола, так что хроматограмма остается без изменений и пригодна для дальнейшего исследования. Метод автосцинтиллографии характеризуется более низким пределом детектирования, чем радиоавтография.

### Измерение радиоактивности с помощью жидких сцинтилляторов после элюирования хроматографических зон

Для измерения радиоактивности с помощью жидких сцинтилляторов отдельные зоны сорбента с хроматограммы переносят в раствор, содержащий люминесцирующее вещество, которое помещается в измерительную кювету. Разрешение этого метода определяется шириной участков хроматограммы, отобранных для измерения, и если используется небольшое число участков, то

разрешение будет недостаточным. Перенесение хроматографических зон с пластинки в люминофор – весьма медленная и трудоемкая операция, хотя в литературе описан прибор для выполнения этой процедуры автоматически [81].

### Метод сжигания

Хроматографические зоны сжигают в атмосфере кислорода, газообразные продукты сжигания пропускают над оксидом меди(I), чтобы превратить углерод и водород в оксид углерода(IV) и воду, соответственно. Эти зоны затем собирают и измеряют их радиоактивность с помощью жидких сцинтилляторов. В настоящее время этот метод практически не используется.

### 1.12.3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

К ним относятся:

- биоавтография;
- фермент-субстратная реакция.

Эти методы используются только после хроматографического разделения.

Микробиологические и биохимические методы разделения имеют очень высокие (по сравнению с другими методами) чувствительность и избирательность [91]. Так, биоавтография применяется при скрининге новых антибиотиков [92]. Фермент-субстратная реакция используется для идентификации как индивидуальных отравляющих веществ, так и их смесей в случае одновременного применения последних [93–95].

### 1.12.4. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

К химическим методам относятся:

- использование “универсальных” реагентов;
- применение реагентов, которые избирательно взаимодействуют с определенными функциональными группами исследуемых соединений.

Эти методы позволяют:

- обеспечить обнаружение пятен соединений, не имеющих полос поглощения как в видимой, так и в УФ-области;
- снизить предел обнаружения;
- осуществить обнаружение не только основного продукта в смеси, но и минорных примесей;
- провести избирательное обнаружение отдельного компонента (компонентов) разделяемой смеси;

- инициировать флуоресценцию компонентов разделяемой смеси;
- осуществить дериватизацию близких по структуре или полярности соединений с целью их разделения.

Анализ литературы показал, что в подавляющем большинстве работ обнаружение пятен соединений, не имеющих собственных полос поглощения в видимой или УФ-области спектра, проводится с помощью химической модификации (дериватизации), в зависимости от поставленной задачи – до или после хроматографического разделения смеси [20].

Задачей дохроматографической дериватизации является не только введение хромофорной группы в молекулы компонентов разделяемой смеси, но и улучшение селективности и эффективности разделения производных, полученных в результате модификации. Дериватизацию в зависимости от задачи осуществляют до нанесения на пластинку или непосредственно на пластинке (*in situ*).

Основными требованиями к реакциям дохроматографической модификации являются [72]:

- количественный выход продуктов реакции дериватизации в широком диапазоне концентраций исходных компонентов смеси;
- получение индивидуальных и стабильных продуктов;
- простота исполнения и высокая скорость химической реакции.

К достоинствам дохроматографической дериватизации можно отнести:

- наличие контроля условий при проведении реакции;
- возможность увеличения стабильности анализируемых соединений;
- возможность уменьшения полярности и летучести разделяемых соединений;
- предотвращение появления фона на хроматограмме.

Дохроматографическую дериватизацию первичных и вторичных спиртов производят обычно переводом последних в ксантаты или 2,4-динитробензоаты [96]. Полученные производные имеют интенсивные полосы поглощения в видимой области и могут быть легко обработаны с помощью денситометрии. Для визуализации и последующего количественного определения карбонильных соединений используется классическая реакция с 2,4-динитрофенилгидразином [97], а вещества, содержащие карбоксильную группу, переводят в соответствующие динитробензиловые эфиры, после чего образец наносят на пластинку [98]. Для разделения аминокислот предварительно получают их 2,4-динитрофторфенильные,

дансильные или ортофталевые производные [99–100]. Обработка смеси корриноидов водно-спиртовым раствором желтой кровяной соли предотвращает их окисление на слое силикагеля [101–102].

Однако получение перечисленных выше производных требует конденсирующих агентов и большого количества операций, выполняемых вручную.

Дохроматографическая дериватизация *in situ*, как правило, лишена этого недостатка, она выполняется непосредственно на пластинке. Растворы исследуемых веществ и модифицирующих агентов наносятся последовательно в одну и ту же хроматографическую зону с помощью одних и тех же дозирующих устройств (микрошприцы, ручные и полуавтоматические аппликаторы).

Ниже в качестве примеров приведены некоторые реакции (гидролиз, нитрование, diaзотирование, окисление-восстановление, получение гидразонов и дансильных производных и др.), которые используются для модификации как отдельных классов соединений, так и индивидуальных веществ непосредственно на слое силикагеля. Необходимость публикации этого экспериментального материала обусловлена еще и тем, что он практически отсутствует в отечественных и зарубежных монографиях, кроме [72], в то время как реагенты для постхроматографической дериватизации и условия проведения цветных реакций представлены весьма широко [46, 72].

### Гидролиз

#### а) Кислотный

1. Сульфаниламиды – конц. соляная кислота, нагревание 100 °С, 30 мин [103].
2. Эпоксиды – 10 %-я ортофосфорная кислота, 20 °С, 30 мин [104].
3. Кумарин – 12 %-я соляная кислота, обработка в атмосфере оксида азота(IV) [105].

#### б) Щелочной

1. Эфиры  $\alpha$ -аминобензойной кислоты – 7 %-й этанольный раствор гидроксида калия, 55 °С, 4,0 ч [106].
2. Гликозиды наперстянки – выдерживание хроматограммы, предварительно смоченной водой, в парах аммиака 48 ч [107].

#### в) Ферментативный

1. Цитидин – 5'-монофосфат – обработка раствором фосфоноэстеразы, 20 °С, 2 ч [108].
2. Гликозиды наперстянки – раствор лизоцима, инкубирование в закрытой камере при 50 °С в течение 2–5 ч [109].

### Реакции с ар(алкил)гидразинами

1. Альдегиды и кетоны – обработка 0,2 %-м раствором 2,4-динитрофенилгидразина в ледяной уксусной кислоте, опрыскивание ледяной уксусной кислотой, выдерживание при 55 °С в закрытой камере в течение 1,5 ч, затем нагревание в течение 2,0 ч при 80 °С [110].
2. Стероидные кетоны – обработка 0,1 %-м раствором ацетилгидразина в 10 %-й уксусной кислоте с последующим выдерживанием в закрытой камере в атмосфере уксусной кислоты в течение 15 ч, а затем нагреванием при 80 °С в течение 2,0 ч [111].
3. Ацетофенон и ментон – 0,2 %-й раствор 4-нитрофенилгидразина или 2,4-динитрофенилгидразина в лед. уксусной кислоте с последующим выдерживанием в закрытой камере в течение 10 ч, а затем нагреванием при 80 °С в течение 2,0 ч [112].
4. 3-Метоксибензальдегид и его производные – 0,5 %-й раствор 2,4-динитрофенилгидразина в лед. уксусной кислоте, выдерживание в закрытой камере в течение 10 ч при 60 °С с последующим нагреванием при 80 °С в течение 1,0 ч [113].

### Этерификация

1. Афлотоксины – трифторуксусный ангидрид, выдерживание при комнатной температуре 45 мин [114].
2. Ментол (линалол) – уксусный ангидрид, нагревание 100 °С в течение 15 мин [115].
3. Пагулин – смесь уксусного ангидрида и пиридина (9 + 1), выдерживание в течение 5 мин при 20 °С, затем 15 мин при 40 °С [116].
4. Спирты – суспензия ацетата натрия в смеси: уксусный ангидрид – лед. уксусная кислота (3 + 1), выдерживание при 50 °С в течение 3 ч в закрытой камере, удаление избытка уксусного ангидрида в вакууме [117–118] или потоком теплого воздуха (фен).
5. Вторичные спирты (стеролы) – ацетилхлорид, 5 мин при 20 °С с последующим удалением избытка реагента потоком теплого воздуха (фен) [102].
6. Карбоновые кислоты – обработка раствором диазометана в диэтиловом эфире [119].
7. Фенолы – насыщенный раствор метилата натрия в диэтиловом эфире с последующей обработкой 4 %-м раствором 2,4-динитрофторбензола в ацетоне и выдерживанием при 190 °С в течение 40 мин [120].

### Дансильрование

1. Гербициды на основе фенилмочевины – обработка 1,0 н. раствором гидроксида натрия и выдерживание в течение 40–30 мин при 80 °С с последующим добавлением 0,2 %-го раствора дансилхло-

- рида в ацетоне, выдерживанием в темном месте при 20 °С в течение 60 мин (хроматограмма должна быть накрыта покровной стеклянной пластинкой) [121].
2. Гербициды на основе мочевины (диурон, метоксиурон и линурон) – хроматограмму накрывают стеклянной пластинкой и нагревают в течение 25 мин при 160 °С, на охлажденную хроматограмму наносят 0,2 %-й раствор дансилхлорида в ацетоне, накрывают стеклянной пластинкой и выдерживают 1 ч в темном месте [122].
3. Морфин и 6-ацетилморфин – обработка 0,2 %-м раствором дансилхлорида в ацетоне, затем 8 %-м водным раствором бикарбоната натрия, выдерживание при комнатной температуре в течение 10 мин, с последующим высушиванием при 70 °С [123–124].
4. β-Блокаторы (в пробах мочи) – обработка 0,1 %-м раствором дансилхлорида в ацетоне и 8 %-м водным раствором бикарбоната натрия с последующим нагреванием при 120 °С в течение 15 мин [125].
5. Сывороточные белки (альбумин) – обработка 0,05 %-м раствором дансилхлорида в ацетоне, высушивание и выдерживание в течение 10 ч в парах (закрытая емкость) 0,1 М триэтиламмонийбикарбонатного буфера, рН = 8,5 [126].
6. Консерванты (бензойная и пропионовая кислоты) – обработка 0,2 %-м раствором дансилхлорида в ацетоне и 0,4 %-м раствором N,N'-дициклогексилкарбодиимида в ацетоне [126].

### Окисление

1. Холестерин – обработка 4-нитронадбензойной кислотой, выдерживание при комнатной температуре 5–10 мин [127, 128].
2. Поликонденсированные ароматические углеводороды – обработка раствором трифторуксусной кислоты с последующим нагреванием при 100 °С в течение 5 мин [129].
3. Стрихнин и бруцин – обработка насыщенным водным раствором бихромата калия, выдерживание при комнатной температуре в течение 10 мин [130].
4. Алкалоиды наперстянки – обработка 10 %-м раствором хромовой кислоты в лед. уксусной кислоте, выдерживание при комнатной температуре 5 мин и высушивание [131].

### Восстановление

1. Стероиды – обработка смесью 10 %-го этанольного раствора боргидрида натрия и 0,1 н. водного раствора гидроксида натрия (1 + 1), выдерживание 35 мин при комнатной температуре с последующей нейтрализацией избытка реагента 0,1 н. соляной кислотой [132].

2. Алкалоиды наперстянки – обработка смесью 10 %-го этанольного раствора боргидрида натрия, выдерживание в течение 10 мин при комнатной температуре [133].
3. Дисульфиды – обработка 0,4 %-м этанольным раствором боргидрида натрия, выдерживание при комнатной температуре в течение 15–20 мин [134].
4. Насыщенные карбоновые кислоты – обработка коллоидным водным раствором палладия, выдерживание в течение 1 ч при 80–90 °С, охлаждение и выдерживание хроматограммы при комнатной температуре в течение 1 ч в эксикаторе, заполненном водородом [135].
5. Нитросоединения – обработка 15 %-м раствором хлорида цинка в 0,01 н. соляной кислоте, выдерживание при комнатной температуре в течение 10 мин и высушивание [136].

### Нитрование

1. Поликонденсированные ароматические углеводороды – выдерживание хроматограммы в течение 20 мин в закрытой камере с перегородкой в центре дна (double through), содержащей 2 г оксида фосфора(V), к которому добавлено 2–3 мл конц. азотной кислоты [137].
2. Фенолы – выдерживание хроматограммы в течение 10 мин, при комнатной температуре в закрытой камере в парах конц. азотной кислоты [138].
3.  $\alpha$ - и  $\beta$ -Нафтолы – обработка 90 %-й азотной кислотой с последующим выдерживанием при 105 °С в течение 30 мин [139].
4. Ксантоксин – выдерживание хроматограммы в закрытой камере в течение 1,0 ч при 55 °С в парах смеси конц. азотная кислота – лед. уксусная кислота (3 + 1) [140].
5. Бруцин – обработка конц. азотной кислотой и выдерживание в течение 15 мин при комнатной температуре [141].
6. Эстрогены – выдерживание хроматограммы в закрытой камере в парах оксида азота(IV) при комнатной температуре в течение 15 мин с последующей сушкой при комнатной температуре [142].

### Диазотирование и азосочетание

1. *o*-, *m*- и *n*-Анизидины – обработка 10 %-м раствором нитрита натрия в 1,0 н. соляной кислоте и выдерживание в течение 5 мин при 105 °С. После охлаждения обработка 5 %-м раствором  $\alpha$ -нафтола в этиловом спирте [143].
2. 2,5-Диметоксианилин – обработка пластинки раствором хлорида фенилдиазония, затем 5 %-м раствором  $\alpha$ -нафтола в этиловом

- спирте с последующим выдерживанием при комнатной температуре в течение 2 мин [144].
3. Эстрон – хроматограмму погружают на 1 с в насыщенный раствор прочного черного (Fast Black), калиевая соль, высушивают, наносят пробу. Повторно погружают на 1 с в этот же раствор, высушивают, затем погружают на 1 с в 4 %-й раствор пиридина в циклогексане, высушивают и выдерживают в течение 10 мин при температуре 100 °С [145].

### Иодирование

1. Пиридин, пиррол, алкалоиды, содержащие индольное кольцо, – выдерживание хроматограммы в закрытой камере в парах иода в течение 18 ч, с последующим удалением избытка иода с пластинки с помощью вентилятора [146].
2. Поликонденсированные ароматические углеводороды, нафтиламины – выдерживание хроматограммы в закрытой камере в парах иода в темном месте в течение нескольких часов с последующим удалением избытка иода с хроматограммы с помощью вентилятора [147].
3. Фенолсодержащие стероиды – выдерживание хроматограммы (ТСХ-пластинки только на основе оксида алюминия) в закрытой камере в парах иода 1,0 ч с последующим удалением избытка иода с хроматограммы с помощью вентилятора [148–149].

### Хлорирование

1. Кофеин, кодеин фосфат – выдерживание хроматограммы в закрытой камере в атмосфере хлора в течение 5 мин с последующим удалением избытка хлора нагреванием пластинки при 105 °С в течение 5 мин. Опрыскивание смесью 0,5 %-го раствора бензидаина в этиловом спирте и 10 %-го водного раствора иодистого калия ( $v/v = 49/1$ ) [150].
2. Ацетанилид, *n*-хлорацетанилид, 2,5-дихлорацетанилид – выдерживание хроматограммы в закрытой камере в атмосфере хлора в течение 20 с, с последующим удалением избытка хлора в вентилируемом термостатированном шкафу при 60 °С в течение 5 мин [151].
3. Холестерин – обработка хроматограммы безводным бензолом с последующим выдерживанием в закрытой камере в парах смеси хлористый тионил – бензол ( $v/v = 1/1$ ) [152].

### Бромирование

1. Бензойная кислота – обработка хроматограммы в закрытой камере в парах брома при комнатной температуре в течение 10 мин с

последующим удалением избытка брома с пластинки с помощью вентилятора [153].

2. Флуоресцин – погружение хроматограммы в 0,1 %-й раствор брома в хлороформе на 1 с с последующим удалением избытка брома с пластинки [154].
3. Холестерин – погружение хроматограммы в 0,1 %-й раствор брома в хлороформе на 1 с с последующим высушиванием на воздухе и выдерживанием при 60 °С в течение 10 мин [155].

Вместе с тем дохроматографическая дериватизация имеет и ряд недостатков:

- обнаруживающий реагент в большинстве случаев вступает в реакцию не только с компонентами разделяемой пробы, но и с посторонними примесями;
- использование обнаруживающих реагентов, молекулы которых содержат объемные радикалы, может привести к утрате способности к разделению компонентов исследуемой смеси;
- существенное уменьшение выхода реакции при большом содержании в пробе посторонних примесей;
- увеличение времени пробоподготовки.

Цель постхроматографической дериватизации – детектирование разделенных на хроматограмме пятен компонентов исследуемых смесей; к ее достоинствам можно отнести:

- независимость от процесса деления;
- одновременное обнаружение пятен всех соединений на хроматограмме.

Недостатками данного метода являются:

- образование окрашенного фона на хроматограмме;
- невозможность детектирования пятен соединений за счет их собственного поглощения или флуоресценции;
- технические трудности, связанные с процедурой нанесения растворов обнаруживающих реагентов на хроматограмму (см. ниже).

В настоящее время используется ряд методов обработки хроматограммы обнаруживающими реагентами [72]:

- выдерживание хроматограммы в закрытой камере, где присутствуют пары обнаруживающего реагента (иод, аммиак, хлор, хлористый водород и др.);
- термическая обработка хроматограммы;
- внесение обнаруживающего реагента в подвижную фазу;
- использование специального пресса (20 × 20 см), пористая подложка которого обработана раствором обнаруживающего реагента (подложка выполнена из полимерного материала, устойчивого к большинству органических растворителей) [156];

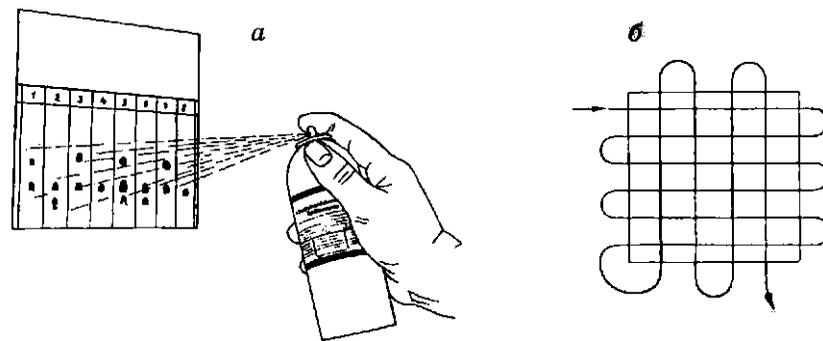


Рис. 1.37: а – Опрыскивание хроматограммы с помощью специального “спрея”; б – траектория движения струи “спрея” при опрыскивании хроматограммы; схема Д. Вальди [46]

- опрыскивание хроматограммы раствором обнаруживающего реагента;
- погружение хроматограммы в раствор обнаруживающего реагента.

Однако из вышеперечисленных методов только два последних нашли свое применение в количественной ТСХ/ВЭТСХ.

Так, опрыскивание (spraying) хроматограмм раствором обнаруживающих реагентов обычно осуществляется с помощью мелкодиспергирующих пульверизаторов [5, 61, 62, 157] или готовых “спреев” (рис. 1.37, а) [5, 14, 158]. По мнению Ж. Тоучстона [29], опрыскивание хроматограммы является искусством, а не рутинной инструментальной операцией. Обычно для равномерного опрыскивания хроматограммы используется схема, предложенная Д. Вальди (рис. 1.37, б) [46]. Трудности, с которыми сталкиваются исследователи при выполнении операции опрыскивания, обусловлены многими факторами: скорость подачи воздуха, давление, средний размер (диаметр) капель, распределение диаметра капель по размерам, расстояние от пульверизатора до пластинки и угол, под которым производится распыление.

Были сделаны попытки автоматизации операции опрыскивания [159–161], однако, несмотря на удовлетворительные результаты, сконструированные установки не получили широкого применения. Основным недостатком метода опрыскивания является неравномерность нанесения обнаруживающего реагента на различные участки хроматограммы даже в пределах площади отдельных пятен. К другим недостаткам можно отнести:

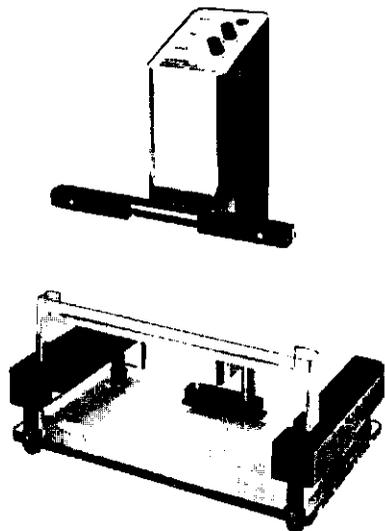


Рис. 1.38. Прибор для нанесения обнаруживающего реагента на хроматограмму методом погружения [5]

- выброс в окружающую среду аэрозоля обнаруживающего реагента, как правило, весьма токсичного;
- наличие фреона в “готовых спреях”.

Метод погружения хроматограммы в раствор обнаруживающего реагента (dipping, immersion) лишен этих недостатков. При денситометрировании хроматограмм, обработанных методом погружения, как правило, получаются результаты с лучшими метро-

логическими характеристиками, чем в случае использования опрыскивания [41, 72, 162]. Метод легко поддается автоматизации. Так, фирма “Camag” [5] много лет выпускает приборы, предназначенные для погружения хроматограмм в раствор обнаруживающего реагента (рис. 1.38); минимальное время экспозиции такого прибора – 1 с; серийно производятся также и камеры для ручного погружения хроматограмм [5, 61, 62]. К недостаткам метода погружения можно отнести:

- изменение состава и загрязнение раствора обнаруживающего реагента при длительном использовании;
- размывание хроматографических зон при больших временах экспозиции (более 1 мин) и(или) использовании сильнополярных растворителей.

Последний недостаток легко устраним путем предварительного погружения хроматограммы в *n*-бутанол (5 с) с последующим высушиванием [41, 72, 162]. Для приготовления растворов обнаруживающих реагентов, предназначенных для обработки хроматограмм методом погружения, используется менее полярный растворитель, и концентрация этих растворов, как правило, в 2–4 раза меньше, чем у растворов тех же реагентов, которые используются при опрыскивании хроматограмм [20, 72].

Данные об обнаруживающих реагентах, методах нанесения, условиях проведения цветных реакций более подробно см. [46, 72, 163, 164].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Измайлов Н. А., Шрайбер М. С. Капельно-хроматографический метод анализа и его применение в фармации // Фармация. 1938. № 3. С. 1–3.
2. Stahl E. 20 years of TLC // J. Chromatogr. 1979. V. 165. P. 59–71.
3. Kalasz H. The History and Perspective of Thin-Layer Chromatography // Proceedings of Chromatographic Conference. Budapest, Hungary, 1983. 145 p.
4. Fond der Chemischen Industrie. Umweltbeich Wasser. Folienserie. Frankfurt, 1999. 293 S.
5. Planar Chromatography 2003. Modern Thin-Layer Chromatography. Camag. Muttenz, 2003. 44 p.; Chrom Book 2004. Merck. Darmstadt, 2004. 187 p.
6. Anex P. S., Dadoo R. Advance towards the routine use of thin-layer chromatography // GC-LC. 1997. V. 10. P. 33–36.
7. Camag. <http://www.camag.com>.
8. Fenimore D. C., Davis C. M. HPTLC // Anal. Chem. 1981. V. 53. P. 253–260.
9. FDA Bull. 1994. 546 p.
10. Skavkova I., Ostry V. Application of a planar chromatography for determination of micotoxins // Camag Bibliogr. Service. 2001. V. 87. P. 1–4.
11. Grinberg N. Modern Thin-Layer Chromatography. London. N. Y.: Marcel Dekker, 1990. 490 p.
12. Tyihak E., Minksovics E. Trends in overpressured thin-layer chromatography // J. Planar Chromatogr. 1991. V. 4. P. 288–296.
13. Kelker H. Dunnschicht oder saulenflussigkeits-chromatographie // Nachr. Chem. Tech. Lab. 1983. V. 31. P. 786.
14. Baner K., Gros L., Saurev W. Thin-Layer Chromatography. Merck. Heidelberg: Huthig Buch Verlag, 1991. 166 p.
15. Ligny C. I., Kok E. C. Condition for minimum separation time // J. Chromatogr. 1968. V. 35. P. 269–272.
16. Ганкина Э. С. // Аналитическая хроматография / Под ред. К. И. Сакодынского. М.: Химия, 1993. 453 с.
17. Morlok G. E., Naumen H. Thin-Layer Chromatography. N. Y., 1997. 410 p.
18. Frey H., Zeeloff K. Quantitative Dunnschicht-Chromatographie. Weinheim: VCH, 1992. 420 s.
19. Wagner H., Bladt S. Plant Drug Analysis. Frankfurt: Springer-Verlag, 1996. 384 p.
20. Camag Bibliogr. Service. CD-ROM Disk. version 108. Camag. Muttenz. 2003.
21. Jost W., Michali H., Herbert H. Sorbent won DC und HPTLC Chromatographia // GIT Fuchz. Lab. 1991. 30. S. 307–313.
22. Малахова И. И. Количественная высокоэффективная тонкослойная хроматография аминокислот: Дисс. ... канд. хим. наук. СПб, 2003. 165 с.

23. *Chmel K.* Einflub der geschichte des kieselgel in der D. C. // *J. Chromatogr.* 1974. V. 97. P. 131–140.
24. *Merck E.* Firmaenbroshure. Dunnschicht-Chromatographie. Merck. Darmstadt, 1991. 184 s.
25. *Wang K. T., Lin Y.* Advanced in Chromatography. N. Y.: Marcel Dekker, 1974. 220 p.
26. *Snyder L. R., Poppe H.* Mechanism of solute retention and role of the mobile phase in effecting separation // *J. Chromatogr.* 1980. V. 184. P. 363–371.
27. *Sherma J.* Planar chromatography // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 9–48.
28. *Bhushan R.* // *Handbook on Thin-Layer Chromatography* / Ed. J. Sherma. N. Y.: Marcel Dekker, 1991. 1047 p.
29. *Touchstone J. C.* Practice of Thin-Layer Chromatography. N. Y.: J. Wiley and Sons, 1992. 270 p.
30. *Kowalik G., Rogosz K., Kowalska T.* Separation of ethanolamine esters // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1999. V. 82. P. 297–305.
31. *Klaus R., Fisher W., Hauck H. E.* Separation of C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> fatty acids by reversed-phase chromatography // *Biochem. J.* 1991. V. 46. P. 532–539.
32. *Hauck H. E., Jost W.* Packing and Stationary Phases in Chromatographic Techniques. N. Y.: Marcel Dekker, 1990. 251 p.
33. *Hauck H. E., Jost W.* RP-stationary phases // *Chromatographie.* 1986. V. 27. P. 3–12.
34. *Catalog. Macherey-Nagel.* Duren, 1997. 105 p.
35. *Lilling B.* Git Fachz. Lab. Supplement Chromatographie, 1982. 27 s.
36. *Snyder L. R.* Introduction to Modern Liquid Chromatography. N. Y.: Wiley-Interscience, 1979. 383 p.
37. *Davankov V. A., Bochkov A. S., Unger R. K.* // *Chromatographie.* 1980. V. 13. P. 677.
38. *Podgornik A., Tennikova T. B.* // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* / Ed. T. Scheper and R. Freitag. Berlin–Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. V. 76. P. 165.
39. *Gunter K.* // *Handbook of Thin-Layer chromatography* / Ed. J. Sherma. N. Y.: Marcel Dekker, 1991. 1047 p.
40. Пластины марки “Sorbfil”. ТУ-26-11-17–89.
41. *Degterev E. V., Tyaglov B. V., Malakhova I. I., Krasikov V. D.* Quantitative analysis of L-tryptophan in fermentation broth // *J. Planar Chromatogr.* 2000. V. 13. P. 194–199.
42. *Degterev E. V., Tyaglov B. V., Malakhova I. I., Krasikov V. D.* Quantitative analysis of L-lysine, L-threonine, L-homoserine and cobalamines in fermentation broth // *J. Planar Chromatogr.* 2000. V. 13. P. 217–220.
43. *Tyaglov B. V., Sizova I. A., Zvenigorodskii V. I.* Quantitative determination of virginiamycin antibiotics in cultural broth // *J. Planar Chromatogr.* 1995. V. 8. P. 374–377.
44. *Kaiser R. E.* Simple and instrumentalized high performance planar chromatography. HFC-HyperCard. Course-paper. version. I.F.E.A.R. Bad Duerkheim, 1996. 157 p.

45. *Shoenmaker P. J.* Optimization of Chromatographic Selectivity. Amsterdam – Oxford – N. Y.: Elsevier, 1986. 215 p.
46. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Штала. М.: Мир, 1965. 508 с.
47. *Junchen D.* Thin-Layer Chromatography. Camag. Muttenz, 1988. 247 p.
48. *Trappe W.* // *Biochem Z.* 1940. V. 305. P. 150.
49. *Zerr W., Puffe D.* Instrumental HPTLC. Wurzburg, 1985. 311 p.
50. *Snyder L. R.* Classification of the solvent properties // *J. Chromatogr. Sci.* 1978. V. 16. P. 223.
51. *Saunders D. L., Snyder L. R.* // *Anal. Chem.* 1984. V. 46. P. 470–480.
52. *Meger V. R.* Praxis der Hochdruckflussigkeits-Chromatographie. Frankfurt, 1988. S. 360.
53. *Randerath K.* Dunnuschiht-Chromatographie. Weinheim: Verlag Chemie, 1962. 241 s.
54. *Brikinshaw F. L., Waters D. G.* A rapid cost effective approach to TLC method development // *Proceedings of 8th International Symposium on Instrumental Planar Chromatography.* Interlaken., Switzerland, 1995. P. 12.
55. *Camag Bibliogr. Service.* 1993. V. 76. P. 11.
56. *Nyiredy Sz., Evdelmeier C. A., Meier B.* TLC mobile phase optimization procedure using the “PRIZMA” model // *Planta Med.* 1985. P. 241–252.
57. *Jork H., Wimmer H.* Quantitative Auswertung von Dunnschicht-Chromatogrammen. Darmstadt: GIT-Verlag, 1982. 119 s.
58. *Catalog. Desaga.* TLC. Heidelberg. 1997. 70 p.
59. *Camag. Linomat V.* Muttenenz. 2001. 4 p.
60. *Camag. ATS-4.* Muttenenz. 2000. 4 p.
61. Каталог. Оборудование для ТСХ. НТЦ “Ленхром”. Санкт-Петербург, 2001 (<http://www.lenchrom.spb.ru>).
62. Каталог. Материалы и оборудование для ТСХ. ЗАО “Сорбполимер”. Краснодар, 2001 (<http://www.sorbfil.com>).
63. *Petrin P.* A twin-through developing tank for TLC // *J. Chromatogr.* 1976. V. 123. P. 65–69.
64. *Geiss F.* The role of vapor phase in planar chromatography // *J. Planar Chromatogr.* 1988. V. 1. P. 102–111.
65. *Stewart G. H.* Evaporation in TLC // *J. Chromatogr. Sci.* 1970. V. 8. P. 129–141.
66. *Zeeuw R. A.* The role of solvent vapour in TLC // *J. Chromatogr.* 1968. V. 32. P. 43.
67. *Гейсс Ф.* Основы тонкослойной хроматографии. М., 1999. Т. 2. С. 89.
68. *Krans L., Koch A.* Dunnschicht-Chromatographie. N. Y.–London: Springer-Verlag, 1996. 205 s.
69. *Funk W., Gluck V., Schuch B.* Polynuclear aromatic hydrocarbons. Charge transfer chromatography // *J. Planar Chromatogr.* 1989. V. 2. P. 28–34.
70. *Жданова Н. И., Гусятинер М. М., Буриков Э. А., Козырева Л. Ф., Тяглов Б. В.* Получение кристаллического L-фенилаланина // *Материалы*

- риалы конференции "Микробиологический и ферментативный синтез аминокислот". Пушино, 1980. С. 36–39.
71. *Treiber L. R.* Quantitative TLC and its Industrial Application. N. Y.: Marcel Dekker, 1987. 370 p.
  72. *Jork H., Funk W., Fisher W.* Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods. Weinheim, 1990. V. 1. 464 p.
  73. *Jork H., Winner H.* Quantitative Auswertung von Dunnschicht-Chromatographie. Darmstadt: GIT-Verlag, 1985. 140 s.
  74. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. М.: Медицина, 1987. Вып. 1. 334 с.
  75. *Несмелов Ан. Н.* Радиохимия. М.: Химия, 1972. 420 с.
  76. *Мухеева Л. М., Мухеев Н. В.* Радиоактивные изотопы в аналитической химии. М.: Госхимиздат, 1972. 256 с.
  77. *Лукьянов Б. В., Бердоносков С. С., Богатырев И. О., Заборенко К. Б.* Радиоактивные индикаторы в химии. М.: Высшая школа, 1975. 287 с.
  78. *Snyder F.* Thin-Layer Radiochromatography and Related Procedures // Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods / Ed. A. Niederwieser and G. Pataki. Ann. Arbor. Science, 1970. P. 53–72.
  79. *Catch J.* Purity and Analysis of Labeled Compounds. U. K. Atomic Energy Authority. Radiochemistry Center. London, 1978. 424 p.
  80. *Березкин В. Г., Бочков А. С.* Количественная хроматография. М.: Наука, 1980. 183 с.
  81. *Шеллард Э.* Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. М.: Мир, 1971. 192 с.
  82. *Touchstone J. C.* // New developments in thin-layer chromatography. LC-GC-Int. 1993. V. 6. P. 406–420.
  83. *Touchstone J. C.* Practice of Thin-Layer Chromatography. N. Y.: J. Wiley and Sons, 1992. 320 p.
  84. *Sherma J.* Thin-Layer Chromatography // Anal. Chem. 1988. V. 67. P. 74R–88R.
  85. Planar Chromatography / Ed. R. E. Kaiser. Heidelberg: Huething Verlag, 1986. 265 p.
  86. *Shulman S.* A review of radiochromatogram analysis instrumentation // J. Liquid Chromatogr. 1983. V. 6. P. 35–58.
  87. *Nyieredy Sz.* Planar Chromatography – A. Retrospective View for the Third Millennium. Budapest: Springer, 2001. 614 p.
  88. *Snyder F.* Radioisotope Sample Measurement in Medicine and Biology. IAEA. Vienna, 1965. 521 p.
  89. *Wilde P. F.* Thin-Layer Chromatography. London: United Trade Press, 1965. 229 p.
  90. *Schutte L.* Radioisotope sample measurement technique // J. Chromatogr. 1972. V. 72. P. 303–315.
  91. *Jork H., Funk W., Fisher W.* Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods. Weinheim, 1991. V. 3. 296 p.
  92. *Kreuzig F.* Application of Quantitative HPTLC in the Antibiotic Industry. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. Comp., 1997. 193 p.
  93. *Wietkiewicz Z., Mazurek M., Szule J.* Chromatographic analysis of chemical warfare agents // J. Chromatogr. 1990. V. 503. P. 293–325.

94. *Wietkiewicz Z., Mazurek M.* Analysis of organophosphoric warfare agents in presence of other warfare agents by overpressured thin-layer chromatography // J. Planar Chromatogr. 1991. V. 4. P. 379–385.
95. Clinical Liquid Chromatography / Ed. P. M. Kobra and L. J. Marton. Cleveland: CRC Press, 1984. 253 p.
96. *Mikes O.* Laboratory Handbook on Chromatographic Methods. London, 1966. 474 p.
97. *Marsek K.* Pharmaceutical Application of Thin-Layer and Paper Chromatography. Amsterdam: Elsevier, 1972. 320 p.
98. *Neher N.* Thin-Layer Chromatography. Amsterdam: Elsevier, 1964. 175 p.
99. *Metrione R. M.* TLC of dansyl amino acids // J. Chromatogr. 1978. V. 154. P. 247–253.
100. *Bhushan R., Reddy G. P.* TLC of amino acids on silica gel impregnated with metal ions // Chromatographia. V. 25. 1998. P. 455–499.
101. *Канонкайте С. И.* Кобаламины. Вильнюс: Моксалас, 1978. 140 с.
102. *Попова Я., Попов Х., Илиева М.* Количественный метод определения витамина В<sub>12</sub> тонкослойной хроматографией // Прикл. биохим. и микробиол. 1965. № 1. С. 693–699.
103. *Guggisberg D., Mooser A. E., Kohn H.* Method of determination sulphonylamides in meat // J. Chromatogr. 1922. V. 624. P. 425–437.
104. *Wand V., Ding J.* Studies on the stability aremethers epoxides by TLC // J. Chinese Herb. Med. 1989. V. 20. P. 297–299.
105. *Knupp G., Polleman H., Jonnas D.* An improved HPTLC method for the rapid identification of coumarin // Chromatographia. 1981. V. 22. P. 21–24.
106. *Jork H.* Quantitative HPTLC in the Field Pharmaceutical Application. Bad Duerkheim, FRG, 1987. 239 p.
107. *Junker A., Jork H.* High Performance Thin-Layer Chromatography. Darmstadt: Merck Spectrum, 1989. 36 p.
108. *Kruger J. R., Buts R. G., Cork D. J.* Aerobic and anaerobic soil metabolism of Dicamba // J. Agric. Food Chem. 1991. V. 39. P. 395–359.
109. *Wang Sh., Ma L., Zhaug J.* Analysis of digitalis glycosids by TLC // Chinese Biochem. Biophys. 1993. V. 20. P. 134–138.
110. *Tyihak E., Kardos K., Mincovics E.* Behavior of DHF derivatives of some aldehydes and ketones in normal and reversed phase TLC and OPLC // J. Planar Chromatogr. 1992. V. 5. P. 376–382.
111. *Brown S. M., Busch K. L.* Surface derivatization of steroid ketones on TLC-plates // Anal. Chim. Acta. 1990. V. 218. P. 231–239.
112. *Auzi A. A., Hartley T. G., Waterman P. G.* Determination of flavonoids, alkaloids, acetophenons in *Genus Bosistra* // Biochem. System and Ecology. 1997. V. 25. P. 611–617.
113. *Smidrkal J.* 3-Methoxybenzaldehyde as a starting compound for synthesis of isoquinoline alkaloids // Coll. Cz. Chem. Comm. 1982. V. 47. P. 2140–2144.
114. *Dawlatana M., Coker R. D., Nagber M. J.* HPTLC method for quantitative determination of aflatoxines in maize // Chromatographia. V. 47. 1998. P. 215–218.

115. Schild W., Adam K. P. Quality testing of freely available essential oil // Apoth. Ztg. 1997. Bd. 137. S. 4690-4693.
116. Gemeno A. Determination of patulin in food raw material and food stuff // Hungarian Norm. 1985. V. 373. P. 1-5.
117. Jeszenszky Z. Paper and thin-layer chromatography in food laboratories // Borgazdasag (Hungarian). 1998. V. 38. P. 21-24.
118. Spauh H., Prinoth M. Determination of alcohols in plasma and urine by TLC // J. Chromatogr. 1985. V. 342. P. 458-464.
119. Laposata M., Brown H. E. Fatty acids and ethyl esters // Essent. Fatty Acids. 1995. V. 52. P. 87-91.
120. Putter J. E., Wall P. On site identification of trace concentrations of phenols and cresols in contaminated land leachates using TLC // J. Planar Chromatogr. 1993. V. 6. P. 372-377.
121. Lautie J. P., Stankovic V. Automated multiple development TLC of phenylurea herbicides in plants // J. Planar Chromatogr. 1996. V. 9. P. 113-123.
122. Weiher-Sandov W., Ratkovics R. Study of the decomposition of some urea herbicides // Magya Kemiai Folyoirat (Hungarian). 1987. V. 93. P. 129-132.
123. Li W., Zung H., Chen J. Determination of morphine in pulverized opium by TLC // Chinese J. Anal. Lab. 1994. V. 13. P. 92-93.
124. Hostafi S., Repasi J. Analytical characterization of dansyl derivatives of morphin-like substances // Acta Pharm. Hungarica. 1994. V. 64. P. 22-25.
125. Schulz H. G., Zapka R. Dansylation and thin-layer chromatography of  $\beta$ -blockers // Z. anal. Chim. 1986. V. 323. P. 162-167.
126. Junker A., Jork H. Merck Spectrum. Darmstadt, 1988. P. 22-25.
127. Fulberth F., Rossler D. Comparison of solid-phase extraction methods for clean up of cholesterol oxidation products // J. Agric. Food Chem. 1988. V. 46. P. 2634-2637.
128. Fenton M. Chromatographic separation of cholesterol in food // J. Chromatogr. 1992. V. 624. P. 369-388.
129. Peltonen K., Kuljukka T. Air sampling and analysis PAHS // J. Chromatogr. 1995. V. A710. P. 93-108.
130. Hunter R. T., Creekmur R. E. TLC-determination of strychnine as a poison for domestic animals // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984. V. 67. P. 542-547.
131. Brell T. A., Safertein R. Forensic science // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 123R-143R.
132. Nachimento E. S., Savador M. S. Determination of synthetic estrogens in illegal veterinary formulation by HPTLC // J. Chromatogr. Sci. 1996. V. 34. P. 330-336.
133. Chia J. C., Chang F. R., Li C. M. Protoberberine alkaloids from *Fissigtingma balansae* // Phytochemistry. 1988. V. 48. P. 367-379.
134. Kuss P. TLC-separation of some dithia[3.3]phases // J. Chromatogr. 1988. V. 442. P. 378-380.
135. Wang X., Lay B., Yan X., Lu P. Analysis of fatty acids in linseed oils // Chinese J. Pharm. Anal. 1998. V. 18. P. 176-180.

136. Bagnato L., Grasso G. TLC separation and identification of nitroderivatives in explosive materials // J. Chromatogr. 1986. V. 357. P. 440-444.
137. Tanaka K., Masuda K. Determination PAHs in soil // Anal. Sci. 1987. V. 3. P. 89-90.
138. Fisher W., Hauck H. E. TLC-chromatographic analysis of phenols on TLC-aluminium sheets // J. Anal. Chem. 1996. V. 354. P. 889-891.
139. Wardas W. Visualizing agents for phenols and naphthols in TLC // J. Planar Chromatogr. 1992. V. 5. P. 471-474.
140. Elgaman M. H., Fayez M. B. // Frereniuz Z. anal. Chem. 1967. Bd. 226. S. 408-417.
141. He Y., Wu X., Cai B. Influence of different processing methods on the contents of four alkaloids in *Strychnos vomical* // J. Chin. Trad. Med. 1986. V. 20. P. 85-86.
142. Smets F., Vandmalle M. Purification of biological samples by HPTLC for the simultaneous determination of anabolics by HPTLC // Z. Lebensm. Uniters. Forsch. 1982. Bd. 175. S. 29-39.
143. Sachse J. Characterization of tannins from roots of *Rheum emodium* by TLC/HPTLC // Z. Lebensm. Uniters. Forsch. 1988. Bd. 186. S. 407-411.
144. Funk W. Derivatization reactions in quantitative TLC // Fresenius Z. anal. Chem. 1984. Bd. 318. S. 206-219.
145. Funk W., Kevler R., Arnodt F. Pre-chromatographic derivatization samples for (HP)TLC // J. High Resolut. Chromatogr. 1982. V. 5. P. 534-538.
146. Toro M. R., Muller A. H., Aruda A. C. Alkaloids and coumarines from *Ticorea longiflora* // Phytochemistry. 1997. P. 4585-4593.
147. Kalman J., Siklos P., Szebeny L. Decreasing of PAHs content of petrochemical waste water activated by carbon powder // Magyar Kemikusok. Lapja (Hungarian). 1984. V. 39. P. 402-408.
148. Wilk M., Taupp W. A new steroid glycoside from *Bombax ceiba* // Z. Naturforsch. 1969. V. 24B. S. 16-23.
149. Szeplsi G., Gazga M. Steroids. Chromatogr. Sci. / Ed. J. Sherma. 1991. V. 55. P. 907-938.
150. Hahn E., Hahn V. Determination of caffeine by TLC // NIU-Chimie. 1988. V. 9. P. 23-26.
151. Vamos J., Jozan M. Studies on the dependence of the chromatographic behavior on chemical structure for some p-substituted anilines and anilide derivatives // Magyar Kemiai Folyirat (Hungarian). 1983. V. 89. P. 250-257.
152. Elgaman M. H., Fayez M. B. TLC steroids in butterfat // Fres. Z. anal. Chem. 1967. Bd. 226. S. 408-417.
153. Zuying Y. Determination of benzoic and sorbic acids in food // Chinese Biol. Rev. 1982. V. 2. P. 32-33.
154. Schubal H., Scharf H., Sachs C. On the properties of fluorescing compounds in guard and epidermal cells of *Allium Cepa* // Planta. 1987. V. 171. P. 88-95.

155. *Wardas W., Pyka A.* Visualizing agents for fatty acids in TLC // *J. Planar Chromatogr.* 1996. V. 9. P. 196–201.
156. *Postaire E., Sarbuch C., Regnault C.* New method of derivatization by overpressure derivatization system // *J. Planar Chromatogr.* 1990. V. 3. P. 247–252.
157. High Speed TLC-scanner CS-920. Shimadzu. Kioto, 1983. 48 p.
158. Catalog 1973. Merck. Darmstadt.
159. *Kreuzig F.* // *Chromatographia.* 1980. V. 13. P. 238–246.
160. *Kreuzig F.* // *J. Chromatogr.* 1977. V. 142. P. 441–447.
161. *Жданова Н. И., Козырева Н. Ф., Пермогоров В. И., Тяглов Б. В. и др.* Получение L-треонина // Материалы конференции “Микробиологический и энзиматический синтез аминокислот”. Пущино, 1980. С. 40–41.
162. *Tyaglov B. V., Sizova I. A., Zvenigorodskii V. I.* Quantitative chromatographic determination of moenomycin antibiotics // *J. Planar Chromatogr.* 1997. V. 10. P. 200–204.
163. *Pachaly P.* *Dunnschicht-Chromatographie in der Apotheke.* Wissenschaftlich. Verlagsges. GmbH. Stuttgart, 1995. 450 s.
164. *Кирхнер Ю.* Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981. Т. 1. 616 с.

## 2 ГЛАВА КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Ранее для количественной оценки содержания вещества в хроматографических зонах использовались два способа. Первый способ (2.1) – это перенос хроматографической зоны с пластинки в приемник с последующим элюированием вещества с сорбента и определением его с помощью классических методов количественного анализа – колориметрических, спектрофотометрических и др.; второй способ (2.2) – оценка результатов хроматографического разделения непосредственно на пластинке без использования денситометрии.

В настоящее время количественная обработка хроматограмм осуществляется с помощью денситометров (2.3).

### 2.1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С УДАЛЕНИЕМ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ЗОНЫ С ПЛАСТИНКИ

Это определение можно осуществлять двояко: переносом хроматографической зоны вместе с сорбентом (1) либо экстрагированием хроматографической зоны со слоя сорбента (2).

Извлечение хроматографических зон анализируемых веществ с отбором сорбента производилось вручную с применением шпателей, ножей и других приспособлений. Зону сорбента, содержащую исследуемое вещество, удаляют также с помощью вакуума.

На рис. 2.1 представлено устройство, представляющее собой воронку с пористым стеклянным фильтром (№ 4), в которую вставлена пробка с изогнутой трубкой; нижний конец воронки присоединен к водоструйному насосу. Сорбент, содержащий зону анализируемого вещества, всасывается с хроматограммы через трубку за счет вакуума. Затем анализируемое вещество элюируется с сорбента растворителем, и полученный раствор упаривается до концентрации, пригодной для детектирования (например, спектрофотометрическим методом) [1].

Г. Казанг [2] предложил установку для удаления хроматографических зон исследуемого вещества с тонкого слоя сорбента в заранее приготовленные специальные емкости; данное устройство

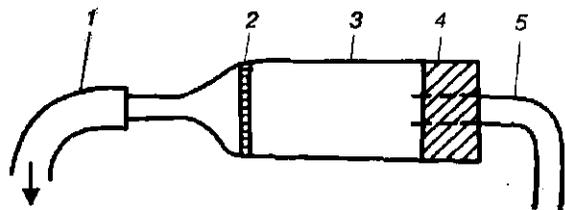


Рис. 2.1. Устройство для отсоса сорбента:

1 - шланг вакуумной линии; 2 - стеклянный фильтр; 3 - воронка; 4 - пробка; 5 - стеклянная трубка

позволяло проводить эту процедуру одновременно для нескольких проб (рис. 2.2). Для оптимизации процесса переноса участка сорбента, содержащего анализируемое вещество, хроматограмму закрепляли на штативе наклонно так, чтобы частицы сорбента могли падать под действием собственного веса. Угол наклона хроматограммы в держателе по отношению к вертикали мог варьироваться от 20 до 40°. На штативе установлены две наклонные направляющие, по которым перемещается держатель скребков; число скребков можно изменять от 6 до 20. Под держателем скребков

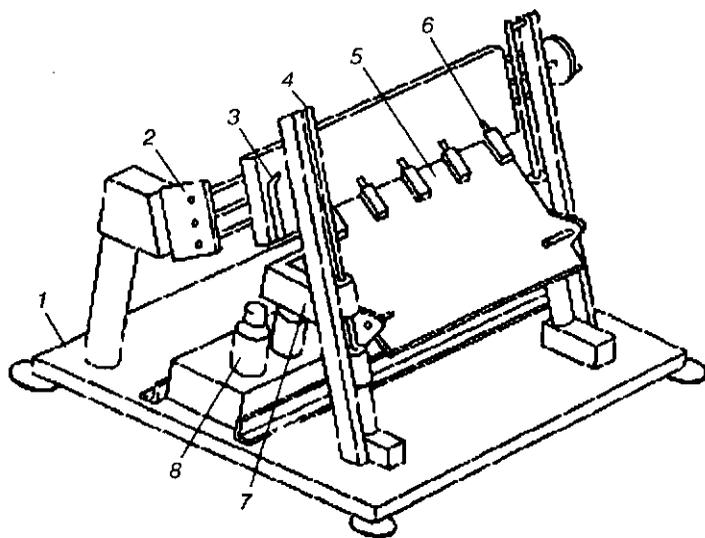


Рис. 2.2. Установка Казанга для удаления части сорбента с подложки:

1 - станина; 2 - держатель; 3 - прижимы хроматограмм; 4 - направляющие; 5 - держатель скребков; 6 - скребок; 7 - штатив для воронок; 8 - приемные сосуды

установлен штатив для воронок, направляющих сорбент, удаленный с подложки, в емкости, количество которых соответствует числу скребков. Фирмой "Analab" (США) была выпущена установка, работающая по такому же принципу и управляемая с помощью компьютера [3]. Воспроизводимость результатов анализа составляла 6-8 %.

В случае применения способа (2) наибольшее распространение получили два метода извлечения вещества из хроматографической зоны: непосредственно в элюент и перенос на промежуточные капиллярные материалы, например хроматографическую бумагу.

Наиболее простой вариант прямого элюирования заключается в вырезании участков хроматограммы (подложка: фольга или полимерный материал), которые помещали в пробирки с растворителем для извлечения анализируемых соединений. На этом принципе была основана работа установки "Элюквик", которая ранее выпускалась фирмой "Camag" (Швейцария). Время анализа составляло 30-60 мин, а воспроизводимость результатов 5-8 % [4].

Следующим шагом к усовершенствованию метода прямого элюирования был прибор, принцип работы которого заключался в создании герметичной полости вокруг хроматографической зоны анализируемого соединения и прокачивания через эту полость соответствующего растворителя, поступающего после извлечения определяемого вещества в детектор. Схема ячейки для элюирования показана на рис. 2.3. Режим работы ячейки подбирали таким образом, чтобы во время извлечения вещества не разрушить закрепленный слой сорбента и тем самым избежать стадии фильтрования или центрифугирования. Сохранение целостности слоя сорбента позволяло контролировать полную элюирования исследуемых соединений посредством обработки этих участков хроматограммы обнаруживающим реагентом.

Фирмой "Camag" был сконструирован прибор "Элюхром", состоящий из реактора с шестью ячейками для извлечения, в который можно добавлять обнаруживающие реагенты для дериватизации определяемых соединений, и проточного спектрофотометра (рис. 2.4) [5]. Используя установку "Элюхром",

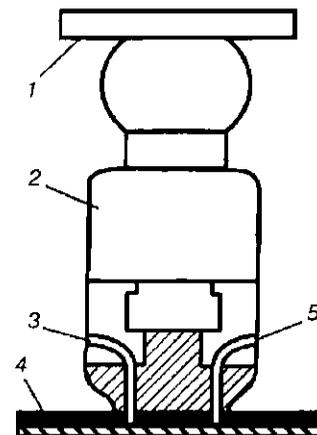


Рис. 2.3. Ячейка для элюирования:

1 - прижимное устройство; 2 - корпус ячейки; 3 - ввод растворителя; 4 - хроматограмма; 5 - вывод раствора

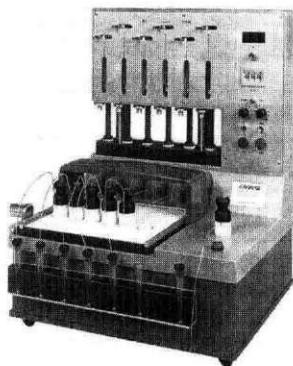


Рис. 2.4. Внешний вид установки "Элюхром" фирмы "Camaq" (Швейцария)

можно было достичь величины стандартного отклонения менее 1,5 % в зависимости от определяемого соединения, однако время анализа могло доходить до нескольких часов.

При элюировании веществ из слоя сорбента органическими растворителями исследуемые растворы, как правило, содержали мелкие частицы сорбента, образующие устойчивые суспензии, что при-

водило к существенным ошибкам при спектрофотометрических измерениях.

Для устранения этих проблем В. Де Дейном был предложен способ, позволяющий сконцентрировать, а затем выделить хроматографические зоны с помощью проточного элюирования [6]. На первом этапе проводили обычное элюирование смеси в одном направлении, затем анализируемые хроматографические зоны оставляли на пластинке в виде небольших выступов, удаляя слой сорбента с пластинки (рис. 2.5, а). На втором этапе на выступы с хроматографическими зонами накладывали полоски хроматографической бумаги, прижимали их покровными стеклами и осуществляли элюирование в направлении, перпендикулярном первоначальному (рис. 2.5, б). После того как анализируемые вещества достигали вершины угла на листе бумаги и концентрировались там,

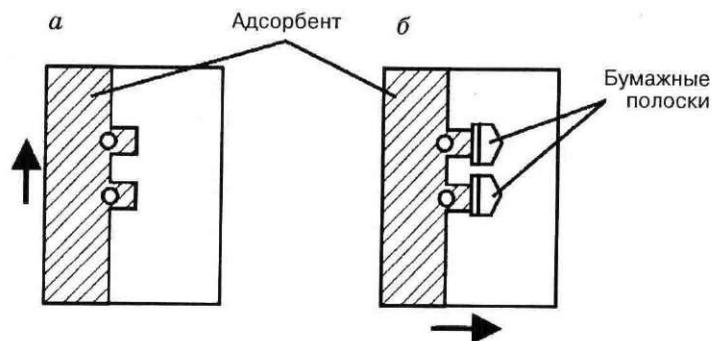


Рис. 2.5. Концентрирование пятен и перенесение их на полоски бумаги: а – хроматограмма с частично удаленным слоем сорбента после разделения в одном направлении; б – элюирование в направлении, перпендикулярном первому, и перенесение пятен на полоски бумаги

зону бумаги с определяемым соединением вырезали, вещество экстрагировали и подвергали дальнейшей идентификации. Время анализа составляло несколько часов, а воспроизводимость результатов варьировала в пределах 6–10 %.

Ниже приведены пределы детектирования (мкг) ряда анализируемых соединений после элюирования с хроматограмм с помощью различных методов [7–11]:

Гравиметрия	100
Титриметрия	10
Полярография	100
Спектрофотометрия	10
ИК-спектрометрия	100
Масс-спектрометрия	100
Флуоресцентные	0,05
Биологические	0,01

## 2.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ НЕПОСРЕДСТВЕННО НА ПЛАСТИНКЕ

Для определения содержания анализируемых соединений на хроматограммах используют метод визуального сравнения размеров площадей пятен и интенсивностей их окраски с соответствующими параметрами пятен стандартных образцов. Как правило, на пластинку наносят ряд пятен стандартных образцов для того, чтобы по возможности охватить область предполагаемой концентрации анализируемого соединения; при этом необходимо, чтобы при нанесении пятен стандартных и исследуемых образцов использовались одинаковые объемы [1, 12–14].

На размер пятна и, следовательно, на точность проведенного анализа влияет ряд факторов. В частности, необходимо, чтобы:

- 1) адсорбент был гомогенным;
- 2) толщина слоя была равномерной;
- 3) размеры стартовых пятен были одинаковыми;
- 4) микрошприцы или капиллярные пипетки были точно откалиброваны;
- 5) давление паров элюента в камере для разделения было постоянным;
- 6) применяемые элюенты обеспечивали четкое разделение соединений;
- 7) опрыскивание хроматограммы обнаруживающими реактивами было равномерным;
- 8) разделение стандартных растворов и растворов проб проводилось одновременно;

9) обнаруживающие реактивы были подобраны так, чтобы обеспечить четкое контрастирование пятен.

При одинаковом пределе обнаружения предпочтение отдается обнаруживающему реагенту, в случае использования которого реакция проводится в одну стадию. При этом сокращается время анализа и уменьшается вероятность ошибки, возникающей на дополнительной стадии.

Лучше всего использовать обнаруживающие реактивы, которые после проведения цветной реакции окрашивают пятна исследуемых соединений в чистые цвета, такие как красный и голубой, чем смешанные (фиолетовый и оранжевый). Сравнение интенсивности коричневых цветов, полученных, например, с помощью метода обугливания, представляет наибольшую трудность.

Если пятна исследуемых соединений имеют полосы поглощения в УФ-области спектра или обладают флуоресценцией, определение содержания вещества в пятне проводят путем сравнения площадей и интенсивностей поглощения или флуоресценции при облучении хроматограммы УФ-светом (с длинами волн 254, 302 или 365 нм).

При исследовании ряда соединений было установлено, что существует линейная зависимость между квадратным корнем из площади пятна и логарифмом массы соединения. Площади пятен измеряли, накладывая лист кальки на хроматограмму и срисовывая контур пятен. Изображение хроматограммы помещали затем на диаграммную миллиметровую бумагу, чтобы можно было определить площадь пятен. При этом исследуемые соединения и стандартные образцы элюировались на одной и той же пластинке [1, 15].

Н. Найбом [16] исследовал зависимость площадь – масса и нашел, что на характер этой зависимости влияет толщина слоя. Так, для слоя целлюлозы толщиной 0,2 мм обнаружена линейная зависимость между логарифмом массы и площадью, а для слоя толщиной 1,0 мм – линейная зависимость между массой и корнем квадратным из площади пятна. Было также показано, что на вид зависимости масса – площадь влияет природа обнаруживающего реагента. Так, если пятна β-аланина обрабатываются изатином, зависимость логарифм площади – логарифм количества вещества линейная, если эти же пятна обрабатываются нингидрином, наблюдается линейная зависимость площадь пятна – lg количества вещества.

Б. Г. Беленьким с сотрудниками [17] также был предложен метод количественной оценки анализируемых соединений по размерам хроматографических зон. К. Фишер [18] для количественного определения учитывал не только максимальный и минимальный диаметры пятен, но и оптическую плотность в центре

пятна. При этом расчет количества исследуемого вещества проводился по формуле:

$$x = kADd \quad (1)$$

где  $x$  – количество исследуемого вещества;  $k$  – коэффициент пропорциональности;  $A$  – оптическая плотность в центре пятна;  $D$  и  $d$  – максимальный и минимальный диаметры пятна.

Этот метод основан на допущении, что максимальная оптическая плотность локализована в центре пятна и прямо пропорциональна количеству исследуемого соединения. Для проведения измерений с помощью этого метода был использован спектрофотометр, соединенный с источником света и микроскопом [18]. Погрешности при использовании методов с измерением площади и размеров хроматографических зон обычно составляли 5–8 %; при этом на величину ошибки могут оказывать влияние неравномерность распределения вещества в хроматографической зоне и некоторые другие факторы [17–18]. С. Пурди и Е. Трутером был предложен метод количественного определения содержания вещества без построения калибровочных кривых. Для этой цели были приготовлены: раствор смеси, подлежащий анализу, разбавленный раствор той же смеси и стандартный раствор [19–20]. Одинаковые объемы этих растворов наносили на одну пластинку, элюировали, и после разделения определяли площади пятен стандартного и анализируемых образцов.

Содержание анализируемого образца определяли по формуле:

$$\lg W = \lg W_s + \frac{\sqrt{A} - \sqrt{A_s}}{\sqrt{A_d} - \sqrt{A}} \lg K_d \quad (2)$$

где  $W$  и  $A$  – масса и площадь пятна из раствора анализируемой пробы;  $W_s$  и  $A_s$  – масса и площадь пятна из стандартного раствора;  $A_d$  и  $K_d$  – площадь пятна из разбавленного раствора анализируемой пробы и коэффициент разбавления соответственно.

Погрешность определения при использовании этого метода составляла 3–6 %.

Пределы детектирования (мкг) ряда анализируемых соединений после удаления соответствующих хроматографических зон без элюирования с помощью различных методов представлены ниже [7, 9, 11, 21]:

Отражательная спектрометрия	$10^{-3}$
Масс-спектрометрия	10
ИК-спектрометрия	10
Атомно-эмиссионный	$10^{-6}$
Атомно-абсорбционный	$10^{-3}$
Радиоактивационный	$10^{-6}$

## 2.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОМ ДЕНСИТОМЕТРИИ

### 2.3.1. ОСНОВЫ ДЕНСИТОМЕТРИИ

Количественные определения, выполненные с высокой точностью, стали доступными только после появления в 1962 г. прямого сканирования хроматограмм в видимом и УФ-свете с помощью "хроматографических спектрофотометров" (денситометров). Прибор для прямой спектрофотометрии хроматограмм в тонком слое был разработан фирмой "С. Zeiss" (Германия) совместно Э. Шталем и Г. Йорком [22, 23] (рис. 2.6). Он состоял из спектрофотометра PMQ II, снабженного дополнительной системой зеркал и сканирующей платформой. Хроматограммы помещали горизонтально на сканирующую платформу, которая двигалась с постоянной скоростью в направлении оси ординат с помощью сервомотора. Свет с определенной длиной волны, проходящий через монохроматор, попадал на слой сорбента вертикально, а круговая апертура или щель четко фиксировалась над хроматограммой с помощью системы линз. Для количественной оценки содержания анализируемого вещества в хроматографических зонах к спектрофотометру было подключено счетное устройство – счетчик или интегратор. Автоматическая регулировка параметров щели способствовала уменьшению времени получения денситограммы.

Первый серийный ТСХ-сканер был выпущен в 1965 г. фирмой "Camag", Швейцария (рис. 2.7) [24].

Денситометры позволяют измерять поглощение света веществом на хроматограмме в режиме пропускания или отражения, а также флуоресценцию или ее гашение. Режим пропускания доступен, если только исследуемое вещество имеет полосы поглощения, лежащие в видимой области спектра. В УФ-области регистрацию

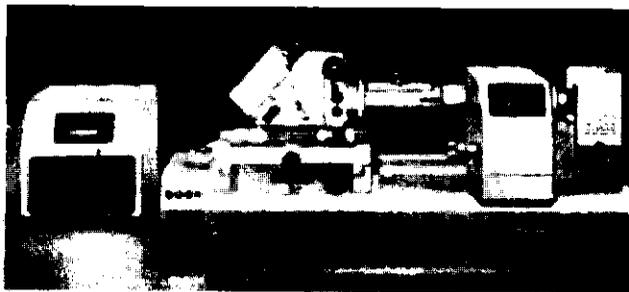


Рис. 2.6. Спектрофотометр для хроматограмм

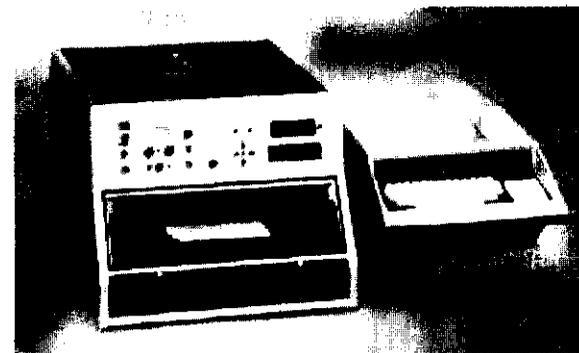


Рис. 2.7. "Camag TLC-Scanner" [24]

в режиме пропускания осуществить нельзя ввиду собственного поглощения силикагеля и подложки хроматограммы. Поэтому поглощение света в этой области регистрируется в режиме отражения. Если разделяемые вещества флуоресцируют, то количественные измерения проводят по величине интенсивности флуоресценции.

Как указывалось выше, регистрация поглощения в режиме пропускания света на хроматограммах, имеющих стеклянную подложку, осуществляется только в видимой области спектра. При этом необходимо учитывать, что в величину поглощения пятном измеряемого образца вносится существенный вклад за счет поглощения, обусловленного неравномерностью частиц сорбента на слое, наличием мелких трещин и даже "кратеров", возникших из-за лопнувших микропузырьков воздуха, образовавшихся при изготовлении пластинок [25]. В случае измерения поглощения на слое в режиме отражения закон Бугера – Ламберта – Бэра [26] не выполняется, поскольку при этом свет не только поглощается пятном, но и рассеивается многочисленными частицами сорбента (под различными углами), преломляется, а также претерпевает дифракцию (рис. 2.8).

Свет, падающий на поверхность хроматограммы в области локализации пятна исследуемого вещества, в значительной степени поглощается пятном, поэтому интенсивность отраженного света уменьшается. В основу принципа работы щелевого денситометра положено измерение разницы между интенсивностью отраженного света, падающего на участок хроматограммы, который не содержит пятна исследуемого вещества, и интенсивностью света, отраженного от зоны хроматограммы, содержащей пятно исследуемого соединения (рис. 2.9). К сожалению, для описания процессов

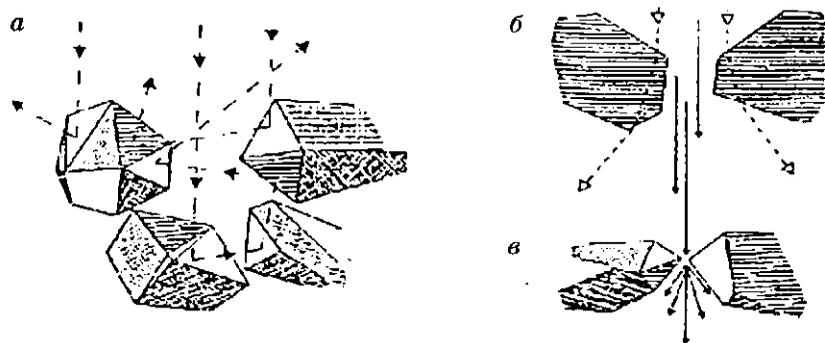


Рис. 2.8. Схема, иллюстрирующая процессы, параллельно протекающие при облучении светом слоев силикагеля:

*a* – рассеяние; *b* – преломление; *в* – дифракция

поглощения, рассеяния, преломления и дифракции света, протекающих одновременно на слое, до настоящего времени не существует четкой математической базы. Предложена лишь феноменологическая теория поглощения и рассеяния света в диффузно-рассеивающих слоях, разработанная Кубелкой и Мунком [27, 28].

$$\frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{2,303}{S} \cdot a_m C \quad (3)$$

где  $R_{\infty}$  – коэффициент отражения непрозрачного слоя бесконечной толщины;  $a_m$  – коэффициент молярного поглощения пробы;  $C$  – молярная концентрация пробы;  $S$  – коэффициент рассеяния на единицу толщины.

Это уравнение нельзя применять для количественных измерений, так как его параметры зависят от многих взаимосвязанных факторов, таких как поглощение, рассеяние, преломление и дифракция света. Поэтому используют линеаризованные функции, описывающие зависимость поглощения пятна от содержания

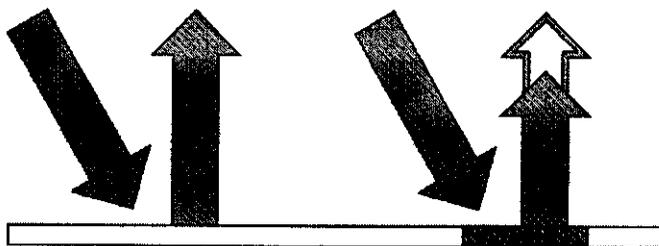


Рис. 2.9. Схема, иллюстрирующая работу денситометра при регистрации поглощения в режиме отражения света

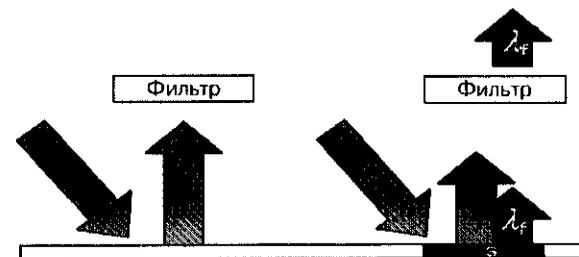


Рис. 2.10. Схема, иллюстрирующая работу денситометра при регистрации флуоресценции в режиме отражения света

веществ, имеющие линейный участок в весьма узком диапазоне концентраций (например, такие, как линейная регрессия, полиномиальная регрессия, а также регрессия Михаэлиса – Ментен первого и второго порядка – см. ниже) [28].

Многие соединения обладают флуоресценцией при возбуждении УФ-светом. Длина волны испускаемого света больше, чем длина волны, при которой происходит возбуждение и поглощение света. Поэтому для измерения флуоресценции большинство денситометров оснащено отсекающими фильтрами (рис. 2.10), которые установлены по ходу луча между хроматограммой и фотоумножителем. Этот фильтр пропускает лишь свет, испускаемый молекулами исследуемого вещества. Флуориметрические измерения в ПХ имеют следующие преимущества перед измерениями поглощения, выполненными в режиме отражения и пропускания:

- наличие линейности в более широком диапазоне концентраций;
- независимость сигнала денситометра от формы пятна;
- снижение предела детектирования в 10–100 раз [29].

К недостатку этого метода можно отнести влияние гасителей флуоресценции (например, катионы тяжелых металлов, анионы иода или брома), которые могут присутствовать в слое сорбента.

### 2.3.2. ПРИБОРЫ ДЛЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ДЕНСИТОМЕТРИИ

Приборы для сканирующей денситометрии имеют много сходного. Для того чтобы охватить весь диапазон УФ и видимого излучения в пределах 200–800 нм, в качестве источников света используются лампы различных типов. Видимое излучение получают с помощью галогеновых или вольфрамовых ламп, а УФ-излучение – с помощью дейтериевых ламп. Для флуоресцентного анализа используются высокоинтенсивные ртутные или ксеноновые дуговые



Рис. 2.11. Схематическое изображение хроматограммы, показывающее ориентацию щели по отношению к направлению сканирования

лампы. Выбор длины волны осуществляют с помощью монохроматора или фильтра. В денситометрах с фильтрами обычно используются ртутные лампы и узкополосные фильтры, которые пропускают только излучение, соответствующее отдельным длинам волн. Преимущество этих приборов заключается в их низкой цене. Для измерения величины сигналов обычно используются фотоумножители или фотодиоды.

В ПХ существуют два типа сканеров, различающихся геометрией светового луча.

Щелевые денситометры – приборы, в которых размеры луча задаются параметрами щели (ширина и высота) (рис. 2.11). К ним относятся следующие серийно выпускаемые приборы: PMQ II, КМЗ, фирма “Zeiss” (Германия); CS-900, фирма “Shimadzu” (Япония), Camag II и 3, фирма “Camag” (Швейцария). Движение хроматограммы, закрепленной на платформе, – линейное (ось  $y$ ) (рис. 2.12,  $a$ ).

Другой тип денситометров имеет постоянные размеры щели; при этом луч может перемещаться в двух направлениях ( $x$  и  $y$ ). Возможны три траектории перемещения луча по хроматограмме:

- по меандру (CS-920(300), фирма “Shimadzu”) (рис. 2.12,  $b$ );
- зигзагообразное сканирование (CS-9000, фирма “Shimadzu”) (рис. 2.12,  $в$ );
- сканирование “бегущим лучом” с траекторией синусоиды (ТСХ-сканер, фирма “Vitatron”, Германия) (рис. 2.12,  $г$ ).

Денситометры первого типа классифицируются также по оптической схеме сканирования. Выпускаются однолучевые, двухлучевые и двухволновые сканеры, а также приборы, имеющие два или сразу три режима работы.

Наиболее просты по конструкции и недорогие однолучевые денситометры, которые могут обеспечивать измерение флуоресценции и поглощения (пропускание и отражение). Однако они весьма восприимчивы к неравномерности слоя сорбента и загрязнению хроматограммы, например, в области фронта элюента, неравномер-

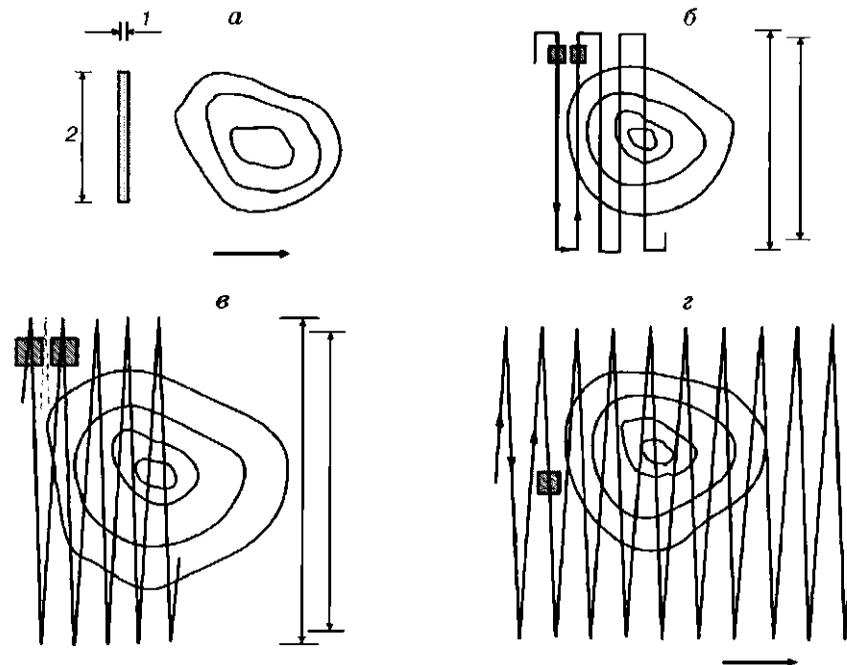


Рис. 2.12. Геометрические размеры сечения светового луча и способы сканирования хроматограмм [67]:

$a$  – сканирующее устройство со щелью;  $b, в, г$  – устройства, обеспечивающие сканирование лучом с малым сечением ( $b$  – сканирование по меандру;  $в$  – зигзагообразное сканирование;  $г$  – сканирование бегущим лучом); 1 – ширина щели; 2 – высота щели; горизонтальная стрелка указывает направление сканирования

ности распределения посторонних поглощающих примесей, присутствующих в слое сорбента (рис. 2.13,  $a$ ).

Флуктуации выходного сигнала могут быть более сильными в случае использования ТСХ-пластинок, приготовленных в лаборатории из сорбента с частицами большего размера, чем для ТСХ/ВЭТСХ-пластинок, имеющих в продаже.

Фоновые помехи можно до некоторой степени скомпенсировать при использовании двухлучевой схемы. Два луча можно либо разделить во времени на одной и той же точке пластинки, либо разделить в пространстве и зарегистрировать при помощи двух детекторов. В двухлучевой оптической схеме с разделением в пространстве один луч монохроматического света разделяется на два луча, которыми сканируют разные участки хроматограммы (рис. 2.13,  $b$ ). Одним лучом сканируют участок пластинки с пробой,

в то время как другой проходит по области хроматограммы, не содержащей пробы. Оба луча последовательно детектируются при помощи спаренных фотоумножителей, разностный сигнал подается на детектор, и таким образом компенсируются флуктуации выходного сигнала источника. Хотя два луча падают на разные области хроматограммы, тем не менее небольшие неоднородности на поверхности пластинки и нежелательный фон, обусловленный примесями, содержащимися в слое сорбента, могут приводить к увеличению погрешностей при измерениях. К недостаткам таких приборов относятся уменьшение рабочей поверхности хроматограммы в 2 раза и высокая стоимость.

При использовании однолучевой двухволновой схемы флуктуации, вызванные рассеянием излучения с длиной волны поглощения  $\lambda_1$ , компенсируются при помощи вычитания флуктуаций, образующихся при облучении светом с другой длиной волны  $\lambda_2$ , которые не поглощаются пятнами, но претерпевают такое же рассеяние, как и при облучении  $\lambda_1$ . Два луча модулируются при помощи обтюлятора и объединяются в один луч для подачи разностного сигнала на детектор. Поскольку коэффициент рассеяния зависит от длины волны, коррекция фона будет лучше, когда величины  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  будут по возможности близкими (рис. 2.13, в) [30, 31].

Чувствительность сканирующего щелевого денситометра зависит от качества электронных и оптических узлов прибора. На рис. 2.14 показана зависимость величины сигнала поглощения от размеров щели. По мере увеличения ширины щели величина сигнала снижается незначительно, тогда как при изменении высоты щели наблюдается более заметное уменьшение выходного сигнала. Когда высота щели велика по сравнению с диаметром пятна, поток света, отражаемый от участков пластинки, не содержащих

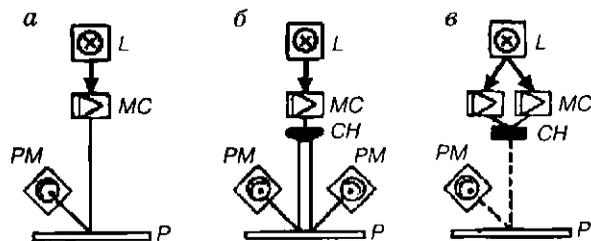


Рис. 2.13. Оптические схемы, используемые в щелевых денситометрах: а – однолучевая; б – одноволновая двухлучевая с разделением в пространстве; в – двухволновая однолучевая с разделением во времени. L – источник облучения; MC – монохроматор; PM – фотоумножитель; CH – обтюратор; P – хроматограмма

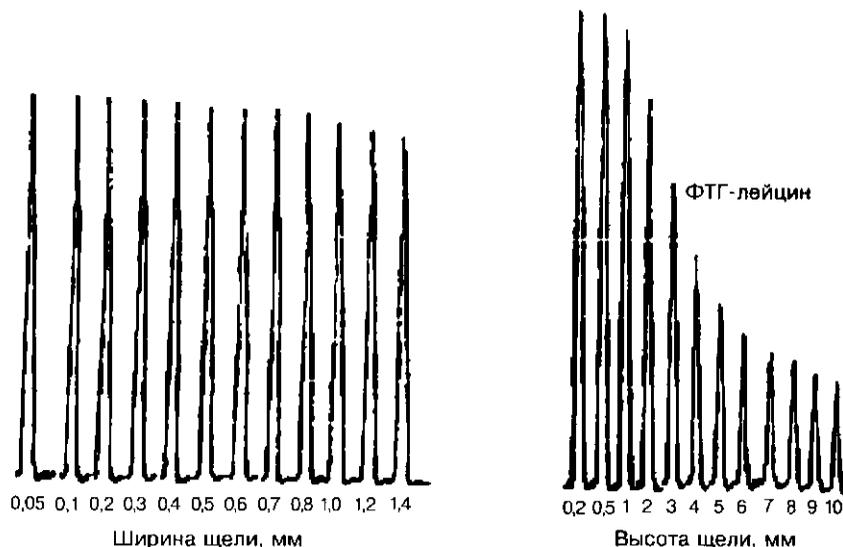


Рис. 2.14. Изменение сигнала детектора в зависимости от параметров щели для щелевого сканирующего денситометра при измерении поглощения в режиме отражения [31]

анализируемой пробы, велик по сравнению с вкладом поглощения света, обусловленного присутствием пятна. Сигнал в этом случае будет слабым. По мере того как высота щели уменьшается до величины, близкой к диаметру пятна, наблюдается существенное увеличение сигнала. Это объясняется тем, что световой поток, отраженный частью пластинки, не содержащей анализируемой пробы, уменьшается, в то время как количество света, поглощенного пятном, в этих условиях остается постоянным [31].

Максимум чувствительности обеспечивается, когда высота щели меньше диаметра пятна на 20–30 % [30]. Однако на практике не рекомендуется использовать малые высоты щели, так как если путь, по которому перемещалась проба, не совсем линейен, то в этом случае при сканировании различных зон будут получены ошибочные результаты. В этом отношении для точного определения центра каждого пятна на треке реальное преимущество имеет позиционное сканирование под управлением компьютера.

В России в 1968 г. Ленинградское оптико-механическое объединение совместно с Институтом высокомолекулярных соединений АН СССР разработали сканирующую установку микроабсорбциометр-флюориметр МФТХ-1 для ТСХ, регистрирующую интенсивность

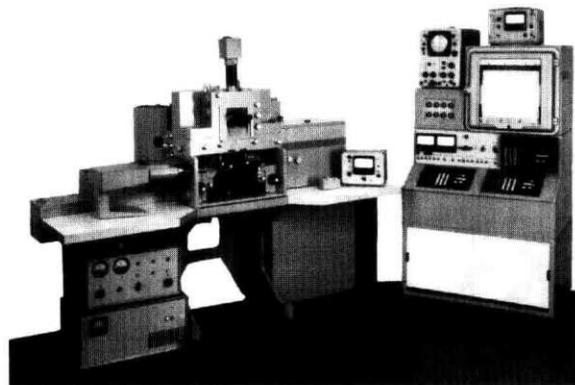


Рис. 2.15. Микроабсорбциометр-флюориметр МФТХ-1 для ТСХ

поглощения или отражения монохроматического пучка света, а также интенсивность флуоресценции или гашение флуоресценции анализируемых образцов (рис. 2.15). Используемый диапазон длин волн составлял 240–700 нм. При фотометрических измерениях прибор работал по одно- и двухлучевому принципу. Воспроизводимость результатов количественных измерений составляла менее 1 % [32, 33].

Примером современного денситометра может служить “Camag TLC-Scanner 3” [34, 35] фирмы “Camag” (рис. 2.16). Это многоцелевой прибор, обеспечивающий количественную обработку ТСХ/ВЭТСХ хроматограмм и электрофореграмм размером до 20 × 20 см. На приборе можно измерять флуоресценцию или гашение флуоресценции, а также поглощение исследуемых объектов,



Рис. 2.16. Денситометр “Camag TLC-Scanner 3” [5]

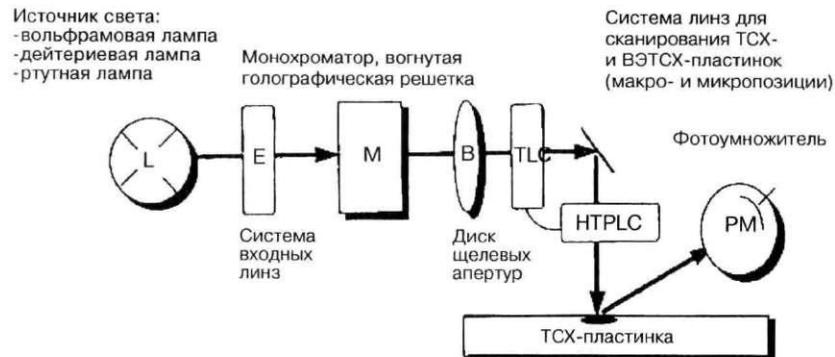


Рис. 2.17. Оптическая схема денситометра “Camag TLC-Scanner 3”

используя режим отражения или пропускания. Спектральный диапазон прибора лежит в области от 190 до 800 нм; максимальная скорость сканирования – 100 мм/с. Денситометр снабжен тремя лампами – дейтериевой, вольфрамово-галогеновой и ртутной, которые, в зависимости от задачи, переключаются автоматически. Оптическая схема сканера представлена на рис. 2.17.

Контроль за работой всех электронных узлов сканера осуществляется автоматически. “Scanner 3” полностью управляется с помощью компьютера; последняя версия программы – “winCATs”, версия 1.03. Данная программа позволяет:

- Осуществлять сканирование дорожек в широком диапазоне скоростей от 0,5 до 100 мм/с. Так, время сканирования 18 дорожек (80 мм каждая) со скоростью 20 мм/с, с последующим интегрированием, количественной обработкой и выдачей документации составляет 8 мин.
- Производить интегрирование как с ручной, так и с автоматической коррекцией нулевой линии.
- Выбирать калибровочные функции: одноуровневую и многоуровневые (линейная и полиномиальная регрессия) при работе как с внешним, так и с внутренним стандартом, с последующей выдачей результатов и метрологических характеристик.
- Рассчитывать содержание примесей в лекарственных препаратах в соответствии с требованиями Европейской или Американской фармакопеи.

Программа позволяет также осуществлять:

- Двухволновое сканирование;
- Многоволновое сканирование (количество длин волн может варьировать от 3 до 31).

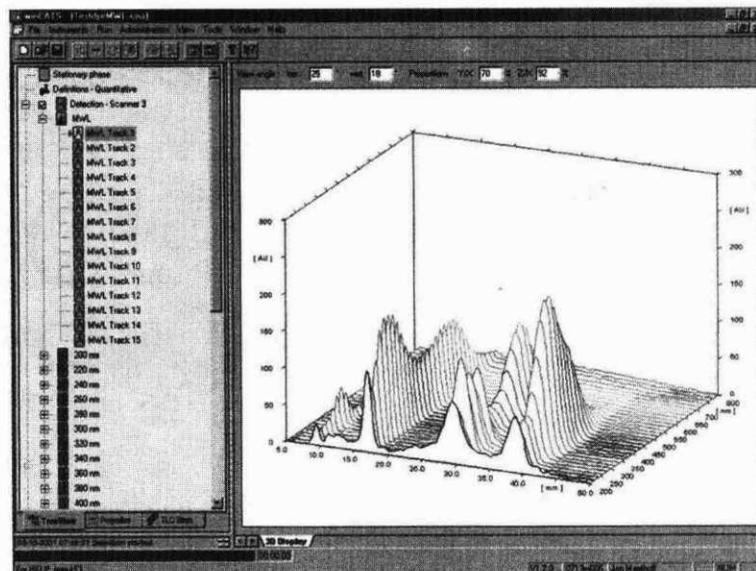


Рис. 2.18. 3D-Изображение денситограммы (разделение модельной смеси красителей), выполненное при 31 длине волны

Ось  $x$  – длина участка разделения (мм); ось  $y$  – длины волн (нм); ось  $z$  – оптическая плотность (отн. ед.) [36]

- Многократное сканирование дорожек.
- Использование заложенной и создание новой библиотеки спектров для решения вопроса об идентификации неизвестных соединений.

На рис. 2.18 представлено трехмерное изображение денситограммы; разделение смеси красителей, выполненное при 31 длине волны.

"Camag TLC-Scanner 3" с программой "winCATs", версия 1.03, а также автоматические аппликаторы "Linomat V" и "ATS-4" успешно используются в рамках требований GLP (Good Laboratory Practice).

### 2.3.3. ВИДЕОДЕНСИТОМЕТРИЯ

Видеоденситометрия – сравнительно новый метод для количественной обработки хроматограмм. Принцип видеоденситометрии основан на введении изображения хроматограммы в компьютер с помощью видеокамеры (цветной или черно-белой) или цифровой камеры с последующим сравнением интенсивностей

пятен стандартных и исследуемых соединений. Опытная партия денситометров "ДенСкан-01" была выпущена в 1989 г. НТЦ "Ленхром" (г. Ленинград). Данная система была предназначена для количественной обработки хроматограмм и электрофореграмм размером  $10 \times 10$  см в видимой области спектра [37, 38]. В 1990–1991 гг. большая партия этих приборов была установлена в ЦЗЛ ряда отечественных крупных заводов химической и микробиологической промышленности, что полностью решило проблему количественного анализа продуктов, выпускаемых этими предприятиями по нормативно-технической документации, в которой был заложен метод ПХ.

С 1975 по 1989 г. было опубликовано лишь четыре работы, в которых использовались смонтированные в лабораторных условиях ("home made") видеосистемы для количественной обработки хроматограмм в видимой области спектра [39–42]. За рубежом серийные приборы аналогичного класса были выпущены фирмами "Shimadzu" (Япония) и "Zeiss" (Германия) только в 1995 г. [43].

Современная модель видеоденситометра – "ДенСкан-04" представлена на рис. 2.19 [44]. Денситометр "ДенСкан" включает: осветительный бокс, черно-белую либо цветную видеокамеру с платой видеоввода (видеобластера), или сканер – персональный компьютер с установленной операционной системой "Windows" – и программным обеспечением "Dens".



Рис. 2.19. Комплект денситометра "ДенСкан-04"

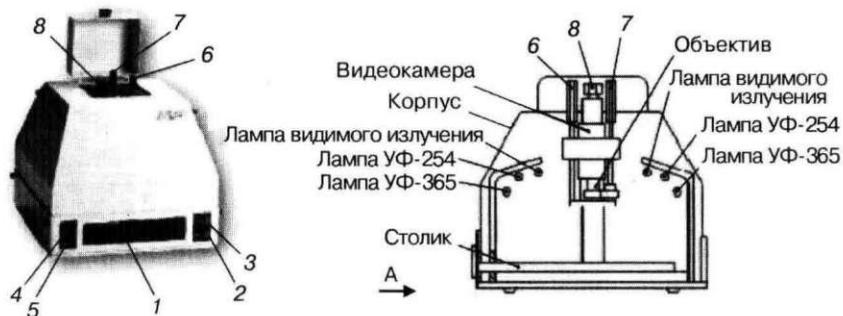


Рис. 2.20. Денситометр “ДенСкан-04”:

1 – установочный столик; 2 – тумблер включения прибора; 3 – тумблер включения дневного света; 4 – тумблер включения УФ-254; 5 – тумблер включения УФ-365; 6 – ручка установки светофильтров; 7 – ручка регулировки диафрагмы; 8 – ручка регулировки видеокамеры

Осветительный бокс выполнен в виде блочной конструкции, включающей следующие основные узлы: источники света видимого (400–800 нм) и УФ диапазона (210–400 нм), набор корректирующих светофильтров, установочный столик для хроматограмм размером не более 150 × 150 мм, кабель связи с блоком ввода изображения (рис. 2.20).

В типовой комплектации используется черно-белая малогабаритная видеокамера OS-45D (Япония) или аналогичная ей с чувствительностью не менее 0,02 люкс с ручной фокусировкой и регулировкой диафрагмы (рис. 2.20), либо цветной сканер с разрешением от 200 dpi и выше с интерфейсом, соответствующим TWAIN стандарту.

Программа обработки хроматографических данных “Dens” (на русском языке) позволяет выполнять следующие функции:

- Вводить изображения хроматограмм: а) с помощью телекамеры – для хроматограмм, анализируемых как в видимом свете, так и при ультрафиолетовом облучении, б) посредством стандартного сканера (для большинства типов хроматограмм, электрофореграмм, радиоавтограмм и блотов, анализируемых в видимом свете). Введенные изображения можно сохранить.

Система позволяет установить несколько видеобластеров и сканеров.

Время ввода изображения хроматограммы посредством телекамеры составляет нескольких секунд, а при использовании стандартного сканера может достигать нескольких минут. При этом обеспечивается более высокое разрешение и качество регистрации. При использовании телекамеры для ввода изображения имеется возможность подбора светофильтра для получения более кон-

трастного изображения. На рис. 2.21, а и б представлены трехмерное изображение хроматограммы (3D) и двумерное (2D).

- Считывать ранее введенные изображения хроматограмм с жесткого диска либо записывать введенные изображения на жесткий диск.
- Выделять на введенном изображении хроматограммы рабочий участок, в котором будет производиться дальнейшая обработка изображения.
- Производить автоматический или ручной поиск пятен.
- Выполнять измерение содержания вещества в анализируемых пятнах (в относительных единицах).
- Вводить значения концентраций (содержание вещества) для построения калибровочных зависимостей. В программе построение калибровочной зависимости может быть выполнено: а) линейной интерполяцией; б) линейной аппроксимацией более чем через две точки; в) квадратичной интерполяцией.

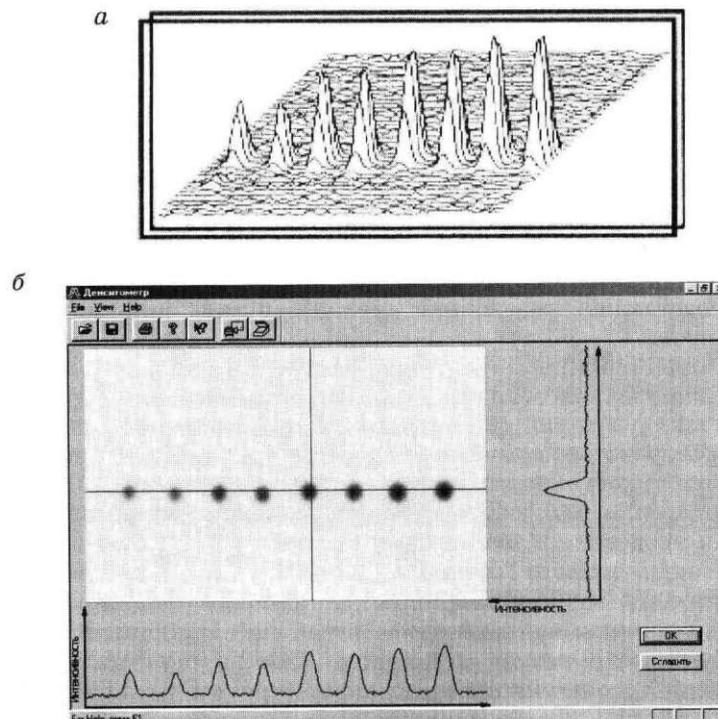


Рис. 2.21. а – Трехмерное (3D) и б – двумерное (2D) изображения хроматограммы

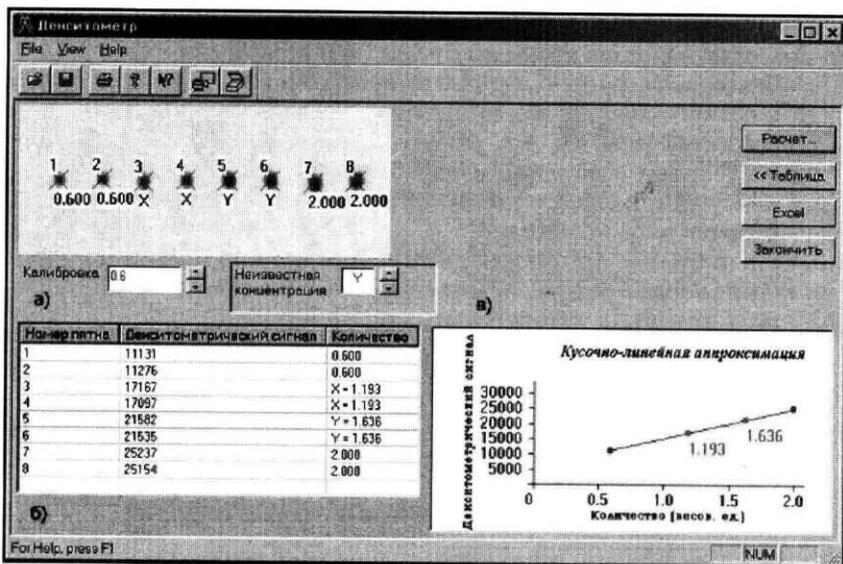


Рис. 2.22. Итоговая таблица результатов количественной обработки хроматограммы:

а – полутоновое монохромное изображение рабочей области хроматограммы; б – таблица результатов анализа; в – калибровочная зависимость с указанием метода ее построения

- Автоматически вычислять содержание вещества в анализируемых пятнах по введенным калибровочным значениям.
- Представлять результаты анализов в виде печатных документов.

Итоговая таблица результатов представлена на рис. 2.22.

Количественная обработка пятна в видеоденситометрии проводится по двум характеристикам: по площади пятна и его “объему” в пространстве, при этом в качестве третьей координаты используется яркость (интенсивность окраски) пятна (рис. 2.23).

Определение как “объема”, так и площади пятна зависит от того, как проведена “базовая поверхность”, образующая нижнюю границу оцениваемого “объема”. Программа обработки пятен видеоденситометром “ДенСкан” формирует базовую поверхность, анализируя величины яркости хроматограммы в локальной области вокруг пятна.

Для каждого пятна программа формирует *локальные границы* таким образом, чтобы площадь локальной области превышала прогнозируемую площадь пятна не менее чем в 8–10 раз. По фоновым точкам (т. е. не принадлежащим пятну) находят положение

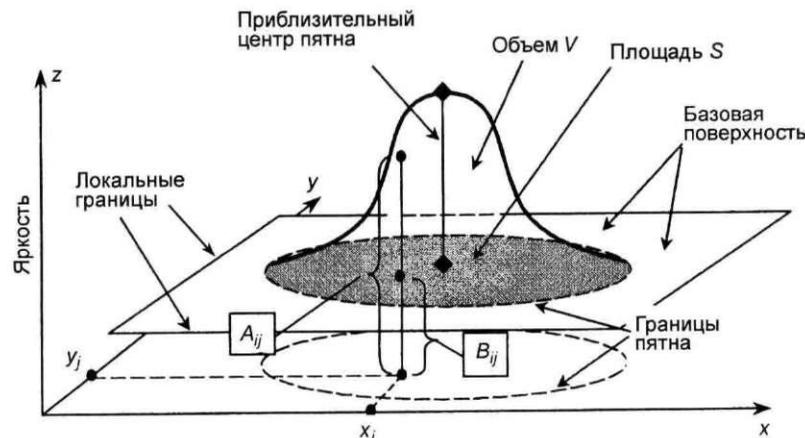


Рис. 2.23. Вид пространственного распределения яркости в области пятна:

$A_{ij}$  – значение уровня яркости точки пятна;  $B_{ij}$  – значение уровня яркости точки на базовой поверхности

базовой поверхности. В настоящее время в качестве базовой поверхности в программах количественной обработки пятен в системах “ДенСкан” используется плоскость. При обработке пятна определяется сумма превышений фотометрических отсчетов пятна  $A_{ij}$  над соответствующей точкой базовой поверхности  $B_{ij}$ :

$$V_i = \sum_{i,j \in S} (A_{ij} - B_{ij}). \quad (4)$$

В видеоденситометрах серии “ДенСкан” может быть использована обработка *двумерных* изображений, и этим они существенно отличаются от щелевых денситометров, которые осуществляют *одномерное* сканирование по прямолинейной траектории, пересекающей хроматографические зоны. Видеоденситометр обеспечивает “растровое” сканирование при обработке хроматографических зон и способен учесть все точки объекта.

Денситометр “ДенСкан-04” внесен в Государственный Реестр средств измерения (номер гос. регистрации 19834-00).

Недавно фирмой “Camag” был выпущен видеоденситометр “Video Store/Video Scan”, который по назначению и характеристикам мало отличается от отечественного прибора “ДенСкан-04” [34, 44]. Внешний вид этого прибора представлен на рис. 2.24.

Основным преимуществом видеоденситометров по сравнению с классическими сканерами является высокая скорость количествен-



Рис. 2.24. Денситометр "VideoStore/VideoScan" [34, 36]

ной обработки хроматограмм, электрофореграмм, радиоавтограмм и блотов, а также возможность обработки двумерных хроматограмм.

Развитие электронных цифровых приборов, переводящих изображение из аналоговой в цифровую форму, позволило унифицировать выпускаемое оборудование. Если в первых моделях российских видеоденситометров (включая один из первых в мире "ДенСкан-01") ПЗС-матрица с холодильником Пелтье (уменьшает "шумы") изготовлялась по спецзаказам, то в последней версии "ДенСкан" для хранения изображений уже используются стандартные видеосистемы (цифровые аппараты, видеокамеры, флэш-камеры и т. д.).

Чувствительность видеосистем, используемых в качестве приемника изображения, в разных спектральных диапазонах играет определяющую роль.

Все видеосистемы (используемые как в нашей стране, так и за рубежом), как цветные, так и не цветные, при обработке изображений (хроматограмм, электрофореграмм) используют прием перевода изображений в двухромную (черно-белую) форму и именно в таком режиме проводят количественную обработку, поскольку при прочих равных условиях чувствительность черно-белых камер выше, чем цветных.

В 2002 г. фирмой "J. M. Analytische und Regeltechnik GmbH" (Германия) был выпущен видеоденситометр "TIDAS TLC 2010", снабженный фотодиодноматричным детектором (рис. 2.25). Детектор обеспечивает регистрацию спектров хроматографических зон исследуемых соединений в интервале длин волн от 190 до 1000 нм без использования фильтров. Прибор осуществляет вывод спектров на экран и позволяет не только сохранить их в памяти

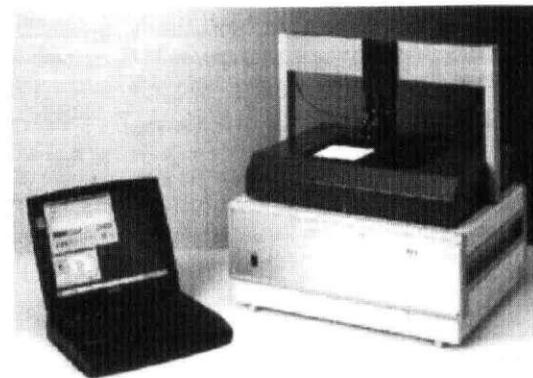


Рис. 2.25. Видеоденситометр "TIDAS TLC 2010" с фотодиодноматричным детектором

компьютера, но и сравнить со спектрами соединений, имеющихся в базе спектральных данных – "спектральной библиотеке". Денситометр может осуществлять количественную обработку хроматограмм, выполненных на ТСХ-, ВЭТСХ- и УТСХ-пластинках [45]. На рис. 2.26 представлена денситограмма (а) и трехмерное изображение (3D) хроматограммы, полученные при количественном определении кодеина в биологических жидкостях с помощью видеоденситометра "TIDAS TLC 2010".

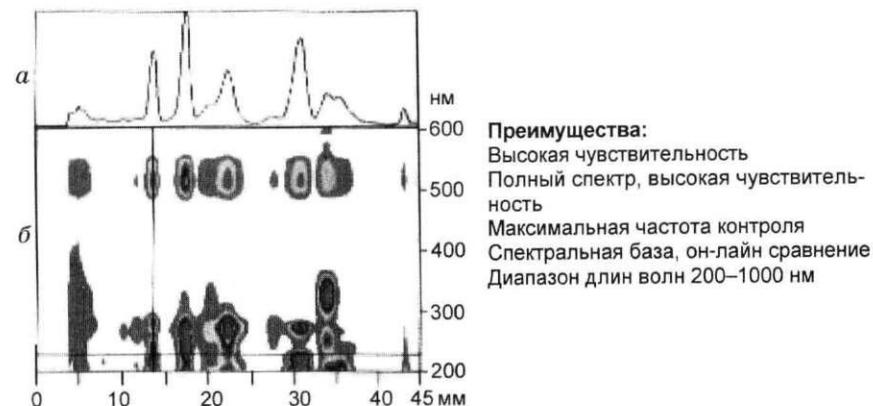


Рис. 2.26. Определение кодеина ( $R_f = 13,6$  мм) в биологических жидкостях. Видеоденситометр "TIDAS TLC 2010". УТСХ-пластинка с силикагелем, имеющим монокристаллическую структуру  $36 \times 6,0$  см, фирмы "Merck":

а – денситограмма (двумерное изображение по осям  $x$ - $y$ ); б – двумерное изображение по осям  $x$ - $z$

## 2.3.4. ДЕНСИТОМЕТРИЯ С ПЛАНШЕТНЫМ СКАНЕРОМ

Для количественной обработки хроматограмм в видимой области спектра можно использовать планшетные сканеры. Программное обеспечение для обработки хроматограмм практически

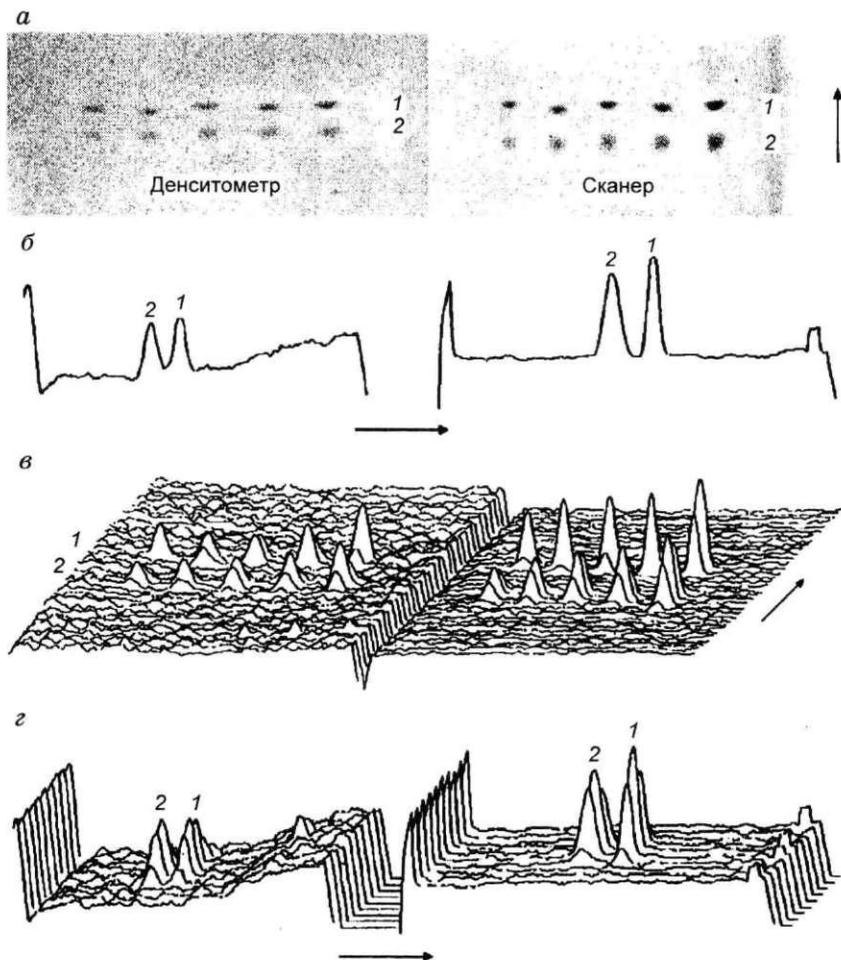


Рис. 2.27. Хроматограммы, полученные при разделении красителей азорубина (1) и амаранта (2) с применением системы ввода изображений с помощью видеоденситометра "ДенСкан-2" (слева) и планшетного сканера "Mustek Scan Express" (справа):

а – полутоновое изображение рабочей области; б – денситограммы; в – 3D-изображение рабочей области; г – 3D-изображение области разделения пиков

ничем не отличается от стандартных программ, применяемых для видеоденситометров. Стоимость планшетных сканеров гораздо ниже стоимости серийных видеоденситометров.

Было показано, что результаты, полученные при обработке хроматограмм с помощью планшетного сканера и видеоденситометра, хорошо коррелируют друг с другом [46]. При этом сканирование хроматограмм с помощью планшетного сканера дает более четкое изображение хроматографических зон, что можно объяснить пониженным влиянием неравномерности освещения исследуемых объектов, чем в случае видеоденситометра, требующего специального программного обеспечения для увеличения соотношения сигнал/шум. На рис. 2.27 представлены данные, полученные при сканировании хроматограмм (разделение смеси красителей) с помощью планшетного сканера и видеоденситометра.

Современные планшетные сканеры могут обеспечить различную степень разрешения при сканировании. Было установлено, что степень разрешения несущественно влияет на точность полученных результатов. При этом повышение степени разрешения требует увеличения времени обработки хроматограмм и объема памяти ЭВМ, необходимого для сохранения хроматограммы. Оптимальным разрешением сканирования при обработке хроматограмм планшетным сканером является диапазон 150–300 dpi [47]. Недостаток планшетных сканеров – отсутствие возможности работать в режимах флуоресценции и гашения флуоресценции.

## 2.3.5. ВИДЕОДЕНСИТОМЕТРИЯ С КОМПЬЮТЕРНЫМ "СПЕКТРАЛЬНЫМ" АНАЛИЗОМ

В случае реализации монохромной (цветной) видеоденситометрии можно применить интересный прием компьютерного "спектрального" анализа цветной ЭВМ-обработки в стандартном режиме СМУК по шкалам С (синий цвет), М (красный), Y (желтый) и К (шкала яркости), используя возможности ввода изображений хроматограмм в определенных цветовых диапазонах. Такой прием был применен при анализе пищевых красителей [48, 49]. Поскольку интенсивность окраски зависит от концентрации красителя в пробе, для анализа применяют значения сравнительной интенсивности  $I$  (С : М : Y). Для этого максимальную интенсивность окраски принимают по отдельным шкалам за 100 % и относительно этой индивидуальной шкалы пересчитывают интенсивности оставшихся двух шкал. Такой подход позволяет наблюдать индивидуальное вещество в различных "спектральных" режимах (рис. 2.28).

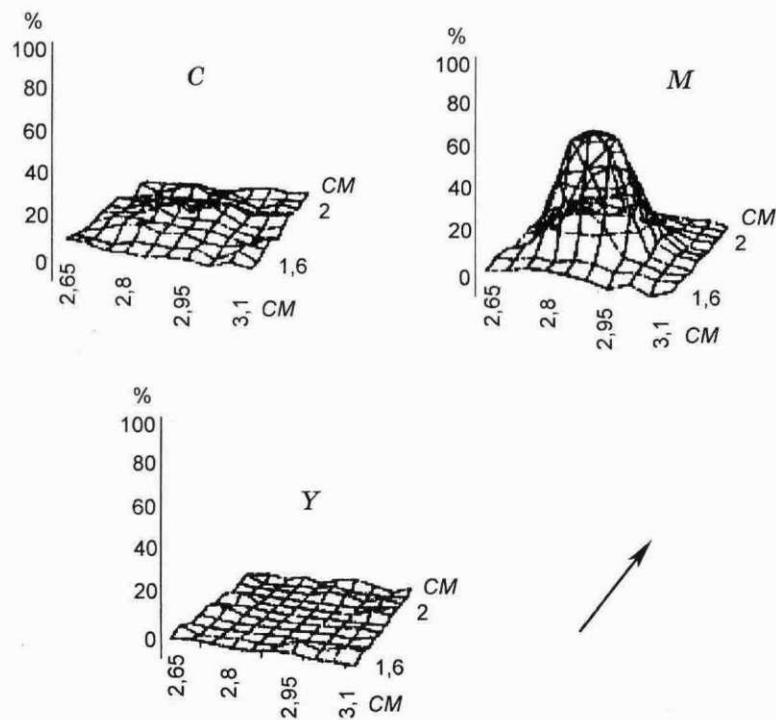


Рис. 2.28. 3D-изображение хроматографического пятна, содержащего 0,12 мкг амаранта E123 в синей (С), красной (М) и желтой (Y) цветовой области. Стрелкой указано направление движения элюента. Интенсивность окраски по отдельной шкале принимается за 100 %, интенсивности оставшихся двух шкал пересчитывают относительно этой индивидуальной шкалы (СМ)

Каждое окрашенное соединение обладает своим индивидуальным набором сравнительной интенсивности с некоторым разбросом интенсивностей окраски в относительно небольшом диапазоне (С : М : Y), зависящем в основном от концентрации анализируемого вещества.

Основываясь на данных характеристиках, можно проводить как качественный, так и количественный анализ, выбирая максимальные чувствительности по шкале (С : М : Y). Данный подход полезно применять в случае недостаточно четкого разделения хроматографических пятен, не прибегая к сложным процедурам обчета недостаточно хорошо разделенных пиков.

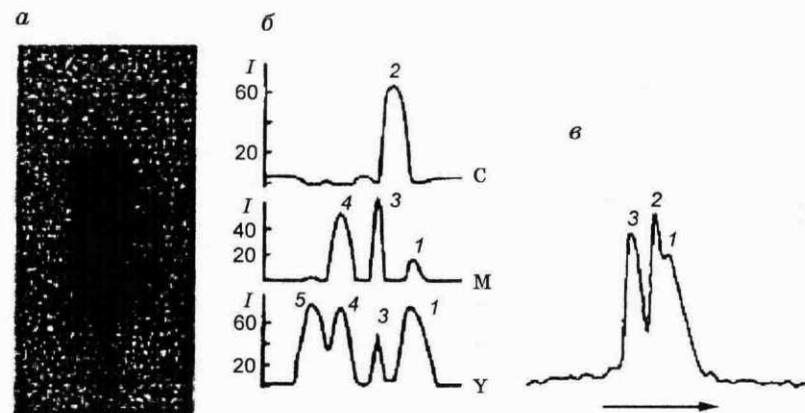


Рис. 2.29. Внешний вид хроматограммы разделения пяти красителей (а) и денситограммы, полученные при ее компьютерной обработке (б) в синей (С), красной (М) и желтой (Y) областях спектра. I – интенсивность окраски

Краситель: 1 – желтый солнечнозакатный; 2 – бриллиантовый голубой; 3 – азорубин; 4 – понсо 4R; 5 – тартразин

в – Денситограмма разделения смеси из пяти красителей, полученная на промышленном денситометре

Краситель: 1 – желтый солнечнозакатный + бриллиантовый голубой; 2 – азорубин; 3 – понсо 4R + тартразин

Преимущества данного метода можно проиллюстрировать сравнением полученных при компьютерной обработке результатов (рис. 2.29, б) с денситограммой той же пластинки в условиях искусственно неразделенных пятен на хроматограмме (рис. 2.29, а) и полученной на денситометре (рис. 2.29, в). Из денситограммы, представленной на рис. 2.29, можно видеть, что смесь состоит только из трех плохо разделенных компонентов. При этом сильно размытый пик отражает содержание желтого солнечнозакатного и бриллиантового голубого, пик 2 соответствует понсо 4R и тартразину. В целом по данным рис. 2.29, а, в однозначно идентифицировать и количественно рассчитать (не применяя сложные процедуры обработки неразделенных пиков) можно только азорубин, в то время как разработанный подход позволяет сделать вывод о наличии всех пяти красителей, которые можно идентифицировать и количественно обработать [50].

### 2.3.6. РАДИОДЕНСИТОМЕТРИЯ

Метод сканирования радиохроматограмм основан на перемещении хроматограммы над детектором, чувствительным к радиоактивному излучению. В настоящее время выпускается целый ряд

денситометров с детекторами, представляющими собой ионизационные счетчики различной конструкции. Так, фирмы "Desaga" и "Bertold" (Германия) выпускают сканеры, в которых в качестве детектора используется газовый проточный счетчик [51–53]. Детектор заполнен смесью газов, состоящей из 90 % аргона и 10 % метана. Он позволяет определять практически все  $\beta$ -частицы, покидающие хроматографическую зону на поверхности сорбента.

В случае применения нескольких меток одновременно в детекторе используют специальные диафрагмы для раздельного счета различных изотопов (рис. 2.30).

Сканирование радиохроматограмм проводят без каких-либо подготовительных операций. Общее время анализа с момента нанесения пробы до получения количественных результатов составляет 1–3 ч. Сканирование можно производить по заранее заданной траектории, принятой за оптимальную для данной задачи (рис. 2.31). Сканирование можно осуществлять при непрерывном перемещении хроматограммы относительно детектора или при последовательном ее перемещении на определенные расстояния, минимальное из которых равно  $\sim 2,5$  мм. Для достижения воспроизводимости результатов расстояние между детектором и поверхностью сорбента поддерживают строго постоянным. Прибор позволяет сканировать хроматограммы с толщиной слоя от 0,1 до 10 мм. При скорости сканирования 30 мм/ч полный анализ хроматограммы размерами  $200 \times 200$  мм с восемью пробами занимает 40 ч (5 ч для одной пробы).

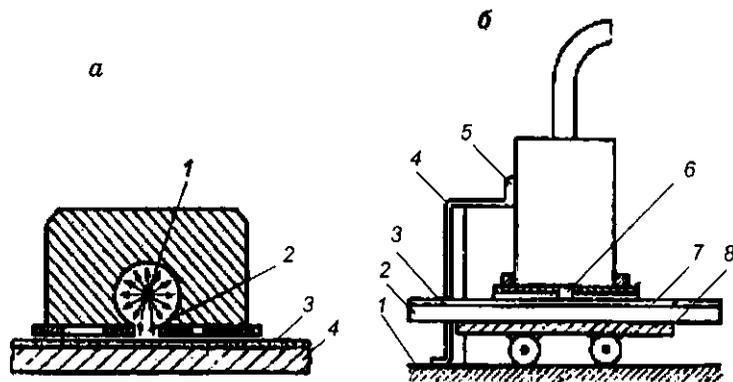


Рис. 2.30. Схема ионизационного сканирующего детектора [52]:

а — счетчик Гейгера — Мюллера: 1 — проволочный анод; 2 — диафрагма; 3 — слой сорбента; 4 — подложка хроматограммы;  
б — детектор: 1 — основа; 2 — подложка хроматограммы; 3 — слой сорбента; 4 — каркас-держатель; 5 — счетчик Гейгера — Мюллера; 6 — апертура; 7 — диафрагма; 8 — столик для хроматограммы

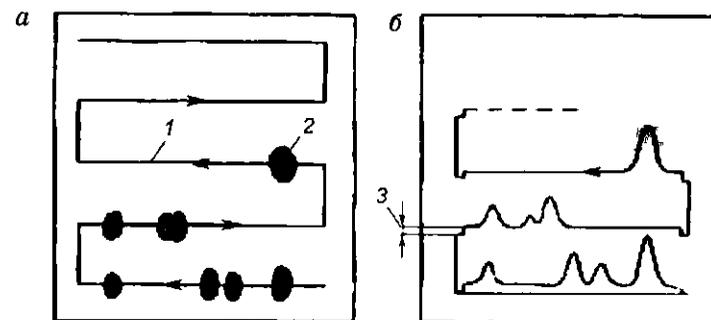


Рис. 2.31. Схема траектории сканирования хроматограммы (а) и соответствующий сигнал детектора (б) [52]:

1 — траектория сканирования; 2 — зона анализируемого вещества; 3 — фоновый сигнал

Для получения оптимальных результатов на этих приборах необходимо соблюдать следующие правила:

- применять низкую скорость сканирования, чтобы иметь возможность регистрировать максимальное число импульсов;
- напряжение, подаваемое на нить анода счетчика, должно быть достаточно высоким.

Величина выходного сигнала счетчика и, следовательно, эффективность счетчика зависят от напряжения на электродах. Оптимальное значение напряжения на электродах можно определить, если поместить счетчик над радиоактивным препаратом и построить кривую зависимости скорости счета от напряжения (рис. 2.32). Число импульсов в секунду возрастает с увеличением напряжения до тех пор, пока не достигнется плато. При дальнейшем увеличении напряжения из-за разряда в детекторе появляется нестабильность. Для получения максимальной эффективности и стабильности счета следует выбрать напряжение, соответствующее центральному участку плато. Напряжение, при котором появляется нестабильность, зависит, по-видимому, от уровня радиоактивности пробы, причем для проб с высокой активностью оно ниже.

Расстояние между хроматограммой и детектором должно быть минимальным, чтобы увеличить разрешение и повысить эффективность детектора [54].

Для изучения влияния высоты детектора, т. е. расстояния между хроматограммой и детектором, на форму пика проводили сканирование радиоактивной пробы при высотах детектора в интервале от 0,25 до 2,00 мм. Пробу готовили следующим образом:

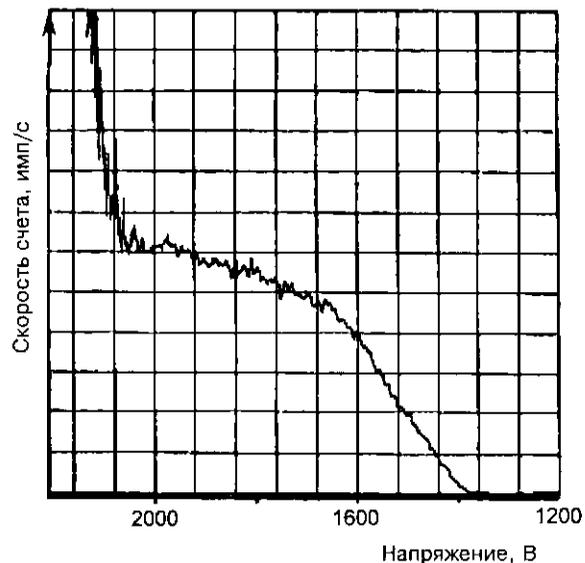


Рис. 2.32. Кривая зависимости скорости счета от напряжения для детектора, наполненного смесью газов, состоящей из 90 % аргона и 10 % метана [53]

Скорость диаграммной ленты 30 см/ч; отклонение на полную шкалу 300 имп/с; постоянная времени 3 с. Скорость возрастания напряжения 40 В/мин

на поверхности ТСХ-пластинки выделяли участок силикагеля размером  $5 \times 2$  мм и на него наносили радиоактивный раствор. С помощью шагового механизма устанавливали высоту детектора. Кривые сканирования для высот детектора 0,25 и 2 мм представлены на рис. 2.33, а и б. Влияние высоты детектора на высоту и полуширину пика показано на рис. 2.34 и 2.35. Из этих данных видно, что для получения пика с максимальной высотой и минимальной шириной детектор следует расположить настолько близко к хроматограмме, насколько это возможно. Однако, чем ближе к пластинке находится детектор, тем больше опасность загрязнения детектора сорбентом с поверхности хроматограммы.

Эффективность счетчика есть отношение числа импульсов, зарегистрированных в единицу времени, к числу  $\beta$ -частиц, попадающих в чувствительный объем детектора за то же время. Эффективность зависит от конструкции детектора и постоянна при данном напряжении и выбранной для заполнения счетчика смеси газов. Если при сканировании хроматограмм действует хотя бы один из факторов, уменьшающих число  $\beta$ -частиц, попадающих

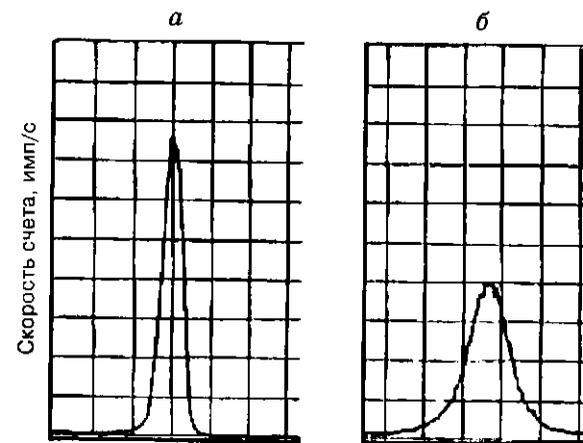


Рис. 2.33. Влияние расстояния между хроматограммой и детектором на высоту и ширину пика. Площадь над диаграммами соответствует величине радиоактивной пробы [53]

Скорость сканирования 12 см/ч, скорость диаграммной ленты 30 см/ч; отклонение на полную шкалу 300 имп/с; постоянная времени 3 с. Расстояние между хроматограммой и детектором составляет 0,25 (а) и 2,00 мм (б)

в детектор, то кажущаяся эффективность будет меньше, чем истинная. Например, с увеличением высоты детектора его эффективность понижается приблизительно на 1 % на каждые 0,05 мм в интервале 0,5–2,0 мм.

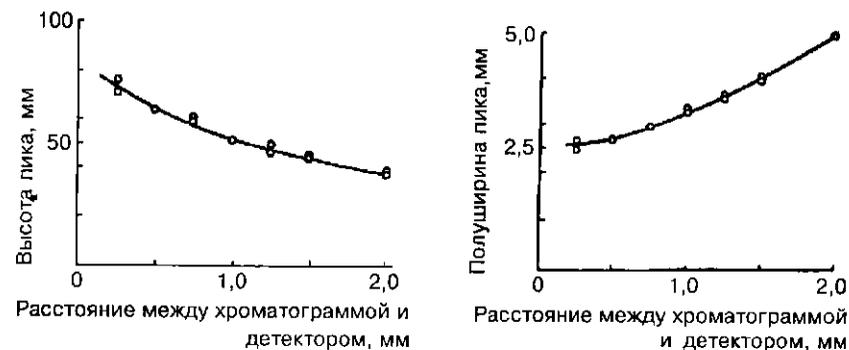


Рис. 2.34. Зависимость высоты пика от расстояния между хроматограммой и детектором [53]

Рис. 2.35. Зависимость полуширины пика от расстояния между хроматограммой и детектором [53]

Для увеличения скорости количественной обработки радиохроматограмм была разработана установка, получившая название  $\beta$ -камеры [54, 55]. Установка позволяет осуществить сканирование всей поверхности хроматограммы ( $20 \times 20$  см), в которой детектор состоит из 1622 миниатюрных счетчиков Гейгера – Мюллера на площади  $20 \times 20$  см, соответствующей размерам стандартной ТСХ-пластинки. С помощью этой установки можно получить результаты, аналогичные результатам автордиографического детектирования, но в  $10^4$  раз быстрее. Разрешающая способность установки составляет 1–2 мм.

Более совершенным по сравнению с  $\beta$ -камерами является устройство для детектирования радиохроматограмм и радиофореграмм модели “Chromalex 101”, выпускаемое фирмой “Numelex” (Франция) [56]. В этом устройстве в качестве детектора используют пропорциональный счетчик, в который дополнительно введена линия запаздывания в виде спирали. При попадании электрона на анод в линии запаздывания индуцируется заряд, считывание которого с обоих концов линии запаздывания позволяет определить положение зоны радиоактивного вещества на хроматограмме. В связи с тем что блок детектирования накрывает всю хроматограмму и чувствительные элементы детектора находятся над всем слоем сорбента, отпадает необходимость в перемещении счетчика или хроматограммы.

Искровые камеры также широко использовались в лабораторной практике [54, 57]. Выпускались два вида искровых камер: с плоскопараллельными электродами и со спиральным катодом.

В камере с плоскопараллельными электродами оба электрода чувствительны к излучению радиоактивных веществ, разделенных на хроматограмме (рис. 2.36). В камере со спиральным катодом размещен ряд индивидуальных ионизационных элементов, в каждом из которых катодом служит спираль из проволоки, а анодом – тонкая проводящая нить, натянутая вдоль оси каждой спирали.

Радиохроматограмму помещают в камеру с плоскопараллельными электродами таким образом, чтобы ее активная поверхность находилась вблизи нитей катода. После этого камеру заполняют газом, например смесью аргона и метана (9 : 1). Электрическая схема камеры проста: положительный полюс высоковольтного источника присоединен

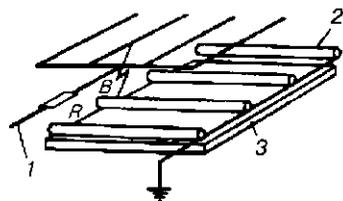


Рис. 2.36. Схема искровой камеры с плоскопараллельными электродами:  
1 – анод; 2 – катод; 3 – хроматограмма

через сопротивление к аноду камеры, а катод заземлен. Каждая искра разряжает емкость камеры, после чего напряжение восстанавливается с “постоянной времени”, определяемой последовательно включенными сопротивлением и емкостью камеры. При емкости камеры в 150 пф минимальное сопротивление для стабильной работы должно составлять 10 Мом. “Мертвое” время при этих параметрах близко к  $5 \cdot 10^{-3}$  с, а стабильная работа камеры становится возможной при напряжении на 200 В выше порога образования искры. При этом камера функционирует нормально в интервале напряжений от 3300 до 3500 В. Хроматограмму фотографируют в поляризованном свете с помощью специального поляроидного фотоаппарата. В зависимости от активности анализируемых веществ время экспозиции может изменяться от 10 с до 1 ч.

При детектировании радиохроматограмм искровыми камерами возникает осложнение, связанное с трудностью количественного определения зон (в особенности смежных) с сильно различающимся уровнем радиоактивности. В этом случае после экспозиции, достаточной для детектирования зон с высоким уровнем радиоактивности, над этими зонами следует помещать поглощающий фильтр или удалять их с пластинки, а затем продолжать процесс детектирования зон с низким уровнем радиоактивности.

В табл. 2.1 представлено сравнение возможностей методов количественной обработки радиохроматограмм.

ТАБЛИЦА 2.1

Сравнение возможностей методов детектирования радиоактивных веществ, разделенных на тонком слое сорбента

Метод	Эффективность счета, %	Предел детектирования, кюри	Время анализа	Разрешение, мм	Литература
Автордиография	60( $^{14}\text{C}$ )	$10^{-7}$ – $10^{-8}$	Часы, дни	1–6	[58]
Использование жидких сцинтилляторов	55( $^3\text{H}$ ), 85( $^{14}\text{C}$ )	$10^{-7}$ – $10^{-9}$	Минуты, десятки минут	1–2 2–6	[59]
Сканирующие сцинтилляционные детекторы	20–25 ( $\beta$ -излучение)	$10^{-8}$ – $10^{-10}$	Десятки минут, часы		[60]
Сканирующие ионизационные детекторы	3( $^3\text{H}$ )		То же	2–5	[61]
Камеры	5( $^3\text{H}$ ), 44( $^{14}\text{C}$ )	$10^{-8}$	Минуты	2–5	[62]
Электронные каналы-умножители	5( $^3\text{H}$ ), 47( $^{14}\text{C}$ )	$10^{-8}$	Минуты, часы	1–2	[63]

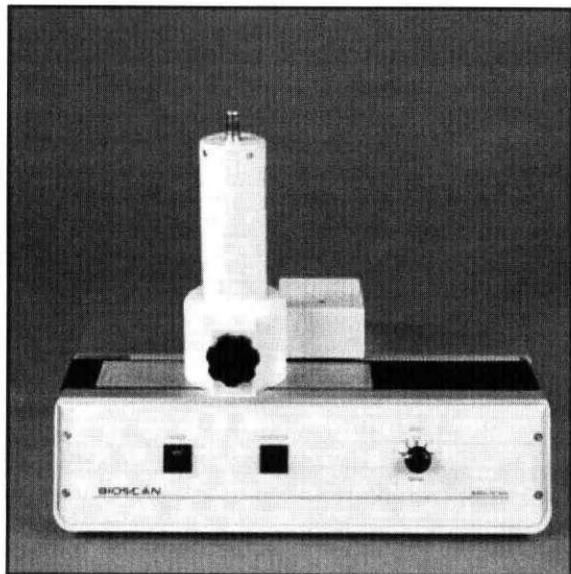


Рис. 2.37. Внешний вид радиоденситометра “Mini-Scan MS 100F”

Примером современного радиоденситометра является сканер “Mini-Scan MS 100F”, выпущенный фирмой “Bioscan” (США). Этот прибор позволяет детектировать большое количество радиоактивных изотопов, включая  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$  и  $^{131}\text{I}$ ; время количественной обработки одной хроматограммы  $5 \times 20$  см составляет менее 100 с [64]. Общий вид этого прибора представлен на рис. 2.37.

Использование этого сканера обеспечивает высокую степень стандартизации при компьютерной обработке радиохроматограмм, сохранение результатов анализа в электронном виде, а также позволяет свести к минимуму радиационные нагрузки на персонал.

#### 2.4. КАЛИБРОВОЧНЫЕ ФУНКЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПХ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

При сканировании индивидуальных пятен на хроматограммах выходной сигнал денситометра имеет форму пика. В современных денситометрах количественная обработка может осуществляться по высоте или площади пика, а также по двум этим параметрам

одновременно. Как правило, для количественного анализа используются площадь и высота пика (“объем пика”). Для сведения к минимуму погрешностей, обусловленных дрейфом базовой линии или неполным разрешением пиков, прибегают к компьютерному анализу, заложенному в программном обеспечении денситометра [34, 45, 65–68].

При проведении количественных измерений необходимо, чтобы точки, соответствующие количеству вещества в исследуемых хроматографических зонах, находились в центре калибровочной функции, которая снизу ограничена пределом детектирования [65]. Калибровочные зависимости могут быть построены по методу внутреннего или внешнего стандарта. Необходимо отметить, что при построении калибровок по внутреннему стандарту хроматографические и спектральные характеристики внутреннего стандарта и исследуемого вещества могут быть не идентичны, если отсутствует нормировочный коэффициент, а это, в конечном счете, может привести к ошибочным результатам [65–68].

В зависимости от поставленной задачи калибровки могут быть одноуровневыми и многоуровневыми. В случае одноуровневых калибровок используется стандарт, взятый только в одной концентрации, а точки, соответствующие концентрации исследуемого вещества, должны лежать в непосредственной близости от точек стандарта [65, 68].

Многоуровневые калибровки должны быть выполнены не менее чем на пяти уровнях, отвечающих разным концентрациям стандарта [65]. Калибровочные кривые могут быть выражены как линейными, так и полиномиальными функциями. Линейные калибровки в денситометрии (уравнение  $y = a_0 + ax$ ) могут быть выполнены в строго ограниченном диапазоне концентрации (рис. 2.38, а). Они используются при сравнительно невысоком содержании вещества в пробе. Как правило, этот диапазон не превышает одного порядка по концентрации. В случае измерения флуоресценции предел детектирования в 10–100 раз меньше, чем в случае измерения поглощения, и поэтому линейный диапазон увеличивается на 2–3 порядка [29, 68–70].

Использование полиномиальных функций значительно расширяет диапазон концентраций исследуемых соединений. На практике применяются:

а) полиномиальная функция (рис. 2.38, б) (уравнение  $y = a_0 + a_1x + a_2x^2$ ), используемая при низком содержании вещества, но в более широком диапазоне концентрации, чем в случае линейной зависимости [71, 72];

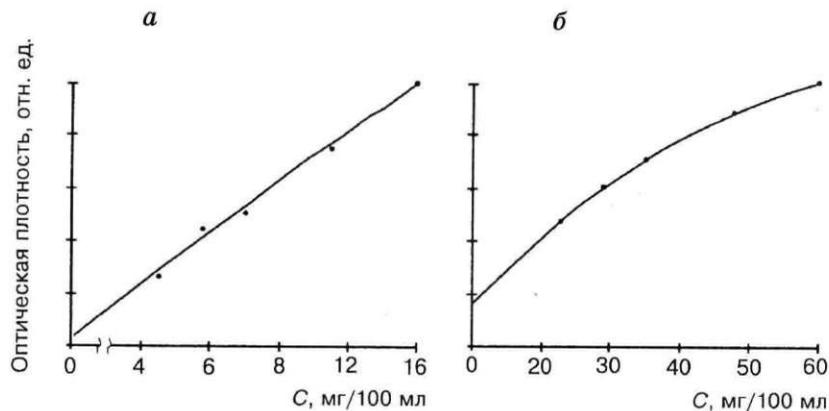


Рис. 2.38. Калибровочные графики:

$a$  – линейная регрессия;  $b$  – полиномиальная регрессия

$b$ ) калибровочная зависимость, выраженная функцией Михаэлиса – Ментен (уравнение  $y = a_0(a_1x/a_2 + x)$  [73], как и полиномиальная функция, позволяет работать не только в более широком диапазоне содержания исследуемых веществ в хроматографической зоне, но и с более высокой концентрацией определяемого вещества, чем в случае полиномиальной функции ( $a$ ).

Как уже отмечалось выше, неоднородность слоя на хроматограмме является одним из источников ошибок при денситометрировании. Для того чтобы минимизировать этот фактор, был предложен метод парного нанесения проб на пластинку (рис. 2.39) [65, 74]. Так, стандартные образцы  $S_1$ – $S_5$  и исследуемые вещества  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  и  $e$  располагаются как на одной, так и на другой половине хроматограммы.

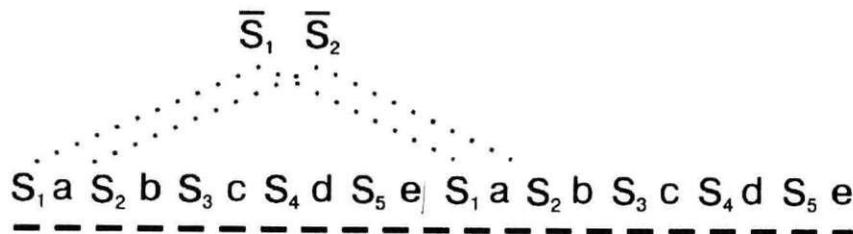


Рис. 2.39. Схема, иллюстрирующая метод парного нанесения [65, 74]

## 2.5. АНАЛИЗ ПОГРЕШНОСТЕЙ В ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ДЕНСИТОМЕТРИЯ И ВИДЕОДЕНСИТОМЕТРИЯ)

Согласно мнению Р. Кайзера погрешность в количественной ВЭТСХ при использовании денситометрии не должна превышать 2,0 % [65]. Основными источниками погрешностей в денситометрии являются:

- $x_v$  – воспроизводимость нанесения пробы;
- $x_c$  – воспроизводимость условий элюирования;
- $x_p$  – воспроизводимость установки щели денситометра в центре измеряемой хроматографической зоны;
- $x_m$  – воспроизводимость результатов измерений;
- $x_{pl}$  – воспроизводимость, связанная с неоднородностью слоя хроматограммы [66].

В соответствии с законом о распределении погрешностей общая ошибка  $x_t$  вычисляется по уравнению:  $x_t^2 = x_v^2 + x_c^2 + x_p^2 + x_m^2 + x_{pl}^2$  [66, 75–77].

Погрешность, возникающую при измерении ( $x_m$ ), можно определить посредством повторного сканирования одной и той же дорожки на хроматограмме без изменения параметров сканирования. Она состоит из погрешностей электронного усиления, оптических измерений и погрешностей регистрирующего устройства. Величина  $x_m$  не является постоянной для данного прибора, так как она изменяется в зависимости от отношения S/N (сигнал/шум) и резко возрастает, когда сканирование осуществляется в режиме с предельной чувствительностью.

Устойчивые результаты измерений получают с такими количествами проб, при которых нет ощутимого влияния уровня шума нулевой линии. В случае правильно настроенного прибора  $x_m$  обычно находится в диапазоне 0,2–0,5 % [66, 78].

Погрешность  $x_p$  при позиционировании пятна в центре измерительного луча определяют также при помощи повторного сканирования одной и той же дорожки. Общая погрешность в этом случае включает  $x_p$  и  $x_m$  и вычисляется по уравнению:  $x_p = (x_t^2 - x_m^2)^{1/2}$ .

Погрешность  $x_v$ , обусловленную нанесением пробы, можно определить посредством сканирования хроматографической зоны, имеющей наименьшую величину  $R_f$ , в случае которого не возникает ошибки за счет условий элюирования. В свою очередь погрешность за счет нанесения пробы можно рассчитать по уравнению:  $x_t = (x_t^2 - x_p^2 - x_m^2)^{1/2}$  [79]. Эту погрешность практически можно исключить посредством использования внутреннего стандарта.

После определения  $x_m$ ,  $x_p$  и  $x_v$  можно вычислить погрешность, связанную с непостоянством условий элюирования:  $x_c = (x_i^2 - x_m^2 - x_v^2 - x_p^2)^{1/2}$  [80]. Эта величина может давать наибольший вклад, и уменьшить ее можно только за счет сведения к минимуму погрешности параметров процесса элюирования. Для того чтобы свети к минимуму погрешности, обусловленные изменениями подвижности из-за краевых эффектов, неоднородности, толщины слоя сорбента и образования  $\beta$ - и  $\gamma$ -фронтов, можно использовать метод парного нанесения проб [65, 74].

В видеоденситометрии по результатам эксплуатации нескольких различных версий видеосистемы “ДенСкан” был проведен анализ причин возникновения составляющих суммарной погрешности на различных этапах обработки пятен.

Причинами возникновения составляющих суммарной погрешности в видеоденситометрии являются:

- неравномерность слоя ТСХ/ВЭТСХ-пластинки;
- неравномерность освещения хроматограммы по полю;
- неодинаковость угла, под которым наблюдаются разные части хроматограммы;
- различие в характеристиках воспринимающих элементов (пикселей) матричного фотоприемника в телекамере (или линейного фотоприемника в сканере);
- погрешности, обусловленные нестабильностью сигнала усилителя и аналогоцифрового преобразователя во времени;
- погрешности, возникающие из-за некорректного определения положения базовой поверхности для каждого пятна;
- погрешности, возникающие из-за некорректного определения положения границ пятна; для неконтрастных, неинтенсивных, “размытых” пятен значительная часть объема пятна может быть сосредоточена в его периферийных частях, их исключение может привести к существенной погрешности оценки “объема”;
- погрешность, возникающая как следствие выбора того или иного вида аппроксимации калибровочной зависимости;
- погрешности определения параметров калибровочной зависимости из-за неточностей нанесения образцов и измерения “объемов” пятен.

Измерение концентраций (содержания) веществ посредством количественного анализа хроматограмм – *типичный пример косвенного измерения\**, когда результат определяется расчетом по

\* Данное определение косвенного измерения соответствует ГОСТ 26.203–81.

заранее известной функции, аргументами которой являются результаты прямых измерений.

В терминах работы [81] растровый видеоденситометр является “измерительно-вычислительным комплексом” (ИВК), в котором осуществление косвенных измерений является типовым способом проведения измерений, а результат измерения определяется автоматически (в результате работы программы, выполняемой на входящем в состав ИВК компьютере).

В случае растрового видеоденситометра результатами прямых измерений являются определения величин в отдельных точках хроматограммы. Алгоритм (формула) для вычисления концентрации (содержания вещества) включает в качестве входных значений (аргументов) многие тысячи определений яркости исследуемых пятен и, таким образом, оказывается достаточно сложным.

Задача определения погрешности косвенного измерения является весьма нетривиальной, так как влияние погрешностей отдельных результатов прямых измерений на результирующую погрешность зависит как от вида формулы для вычисления результата, так и от соотношения между собой результатов первичных измерений [81]. Погрешности результатов косвенных измерений, выполняемых ИВК, не могут быть заранее нормированы, поэтому в ИВК нормируются лишь погрешности их измерительных каналов, выполняющих прямые измерения [81]. В растровом видеоденситометре положение усугубляется тем, что ряд параметров алгоритма вычисления результата должен определяться для каждого конкретного объекта (пятна). Алгоритм (формула расчета результата) определяется лишь предварительным анализом изображения хроматограммы, зафиксированным в памяти компьютера подсистемой ввода изображения. Соответственно и определение погрешности для конкретного результата количественного хроматографического анализа, выполняемого с помощью видеоденситометра, может быть произведено лишь после определения параметров алгоритма для конкретного изображения.

Единственным приемлемым решением этой проблемы была разработка методики индивидуального расчета погрешности результата *каждого* косвенного измерения концентрации (содержания), производимого при обработке конкретной хроматограммы, и реализация этой методики в виде программных компонент, включаемых в программное обеспечение видеоденситометра [81].

Вывод формулы оценки погрешности косвенного измерения содержания вещества растровым видеоденситометром основан на методике, изложенной в работе [81]. Для этого необходимо сначала получить формулу для вычисления экспериментальной кон-

центрации по калибровочным точкам. Рассмотрим наиболее распространенный случай, когда искомую концентрацию  $C_x$  получают по двум калибровочным концентрациям  $C_{k1}$  и  $C_{k2}$ , используя результаты измерения объемов двух калибровочных пятен  $V_{k1}$  и  $V_{k2}$ , экспериментального пятна  $V_x$  и линейную интерполяцию по калибровочным точкам.

Уравнение прямой, проходящей через калибровочные точки, имеет вид:

$$\frac{C_x - C_{k1}}{C_{k2} - C_{k1}} = \frac{V_x - V_1}{V_2 - V_1} \quad (5)$$

откуда можем получить выражение для искомой концентрации  $C_x$ :

$$C_x = C_{k1} + \frac{C_{k2} - C_{k1}}{V_2 - V_1} (V_x - V_1) = \frac{(V_2 - V_x)C_{k1} + (V_x - V_1)C_{k2}}{V_2 - V_1} \quad (6)$$

Эта формула определяет результат косвенного измерения.

Выведем теперь расчетную формулу для погрешности косвенного измерения, используя метод частных производных, описанный в [81]. Для упрощения выкладок сначала несколько преобразуем выражение (6):

$$V_{k2} - V_x = V_{2x}; \quad V_x - V_{k1} = V_{x1}; \quad V_{k2} - V_{k1} = V_{21} \quad (7)$$

Тогда выражение (6) можно преобразовать к виду:

$$C_x = C_{k1} \frac{V_{2x}}{V_{21}} + C_{k2} \frac{V_{x1}}{V_{21}} \quad (8)$$

Полный дифференциал от выражения (8) в предположении, что концентрации  $C_i$  заданы точно, имеет вид:

$$\begin{aligned} dC_k &= C_{k1} \frac{V_{21} dV_{2x} - V_{2x} dV_{21}}{V_{21}^2} + C_{k2} \frac{V_{21} dV_{x1} - V_{x1} dV_{21}}{V_{21}^2} = \\ &= \frac{C_{k1} V_{21} dV_{2x} - C_{k1} V_{2x} dV_{21} + C_{k2} V_{21} dV_{x1} - C_{k2} V_{x1} dV_{21}}{V_{21}^2} \quad (9) \end{aligned}$$

Теперь, заменив дифференциалы на малые приращения, с учетом (7), получим расчетную формулу для оценки абсолютной погрешности косвенного измерения:

$$\begin{aligned} &\frac{C_{k1}(V_{21}\Delta V_{2x} - V_{21}\Delta V_x - V_{2x}\Delta V_2 + V_{2x}\Delta V_1) + C_{k2}(V_{21}\Delta V_x - V_{21}\Delta V_1 - V_{x1}\Delta V_2 + V_{x1}\Delta V_1)}{V_{21}^2} = \\ &= \frac{\Delta V_1(C_{k1}V_{2x} + C_{k2}V_{x1} - C_{k2}V_{21}) + \Delta(C_{k2}V_{21} - C_{k1}V_{21}) + \Delta V_2(C_{k1}V_{21} - C_{k1}V_{2x} - C_{k2}V_{x1})}{V_{21}^2} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &= \frac{\Delta V_1(C_{k1} - C_{k2})(V_2 - V_x) + \Delta V_x(V_2 - V_1)(C_{k2} - C_{k1}) + \Delta V_2(C_{k1} - C_{k2})(V_x - V_1)}{(V_2 - V_1)^2} = \\ &= \Delta V_1 \frac{-(C_{k2} - C_{k1})(V_2 - V_x)}{(V_2 - V_1)^2} + \Delta V_x \frac{C_{k2} - C_{k1}}{(V_2 - V_1)^2} + \Delta V_2 \frac{-(C_{k2} - C_{k1})(V_x - V_1)}{(V_2 - V_1)^2} = \\ &= B_1 \Delta V_1 + B_x \Delta V_x + B_2 \Delta V_2 \quad (10) \end{aligned}$$

где  $B_1, B_x, B_2$  – обозначения для коэффициентов при значениях погрешностей оценок объемов  $\Delta V_1, \Delta V_x, \Delta V_2$ .

Поскольку погрешности объемов оцениваются как случайные величины, то суммирование в формуле (10) следует производить “геометрически”, т. е. суммируя дисперсии.

## 2.6. GLP\* И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЙ ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

### 2.6.1. ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ (ВКЛЮЧАЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ) МЕТОДОВ [82–95]

Согласно требованиям, изложенным в USP 24 (“Validation of compendial methods”), и правилам GLP необходимо, чтобы хроматографические методы анализа, которые используются для оценки соответствия качества исследуемых веществ требованиям нормативной документации, удовлетворяли стандартам точности и достоверности, которые подтверждают валидность данного метода. Терминология, используемая в настоящей работе, максимально приближена к термину, используемому в фармакопеях ведущих стран мира [82–95].

*Валидация* – это подтверждение обоснованности выбора метода для определения показателей и норм качества исследуемого продукта.

Валидации подвергаются хроматографические методики, применяемые для:

- идентификации исследуемых веществ;
- установления пределов содержания примесей, родственных соединений и остаточных количеств органических растворителей;
- количественного определения: а) основного продукта, б) индивидуальных продуктов в составе разделяемых смесей; в) индивидуальных примесей и их суммы.

Валидация любого аналитического метода, включая хроматографический, предполагает его оценку по следующим характеристикам:

\* Good Laboratory Practice.

- специфичность;
- линейная зависимость;
- аналитическая область методики;
- правильность;
- воспроизводимость;
- предел обнаружения;
- предел количественного определения;
- пригодность системы.

**Специфичность** аналитического метода определяется его способностью достоверно определять исследуемое вещество в присутствии примесных веществ. Специфичность оценивается при валидации методов, применяемых для идентификации исследуемых веществ, определения примесей, количественного определения содержания основного вещества в образце. Специфичность достигается использованием стандартных образцов, а также может быть дополнительно подтверждена методом добавок соответствующих количеств исследуемого продукта и(или) примесей. В тех случаях, когда примесные соединения не идентифицированы, специфичность предлагаемого метода должна быть обоснована результатами определений другим независимым валидным методом.

**Линейная зависимость** устанавливается на основании результатов исследований, которые пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах аналитической области методики. В ПХ линейность результатов может быть представлена графически в виде зависимости величин денситометрических сигналов сканера от концентрации исследуемого вещества (не менее 5). Аналитическая методика должна быть охарактеризована следующими параметрами для подтверждения линейности [93]:

- коэффициент регрессии;
- угол наклона линии регрессии;
- остаточная сумма площадей.

**Аналитическая область методики**, в пределах которой соблюдается линейная зависимость, охватывает интервал между верхним и нижним пределами содержания анализируемого вещества (включая эти пределы), в котором данная методика обеспечивает его определение с требуемой воспроизводимостью и правильностью. Аналитическая область обычно выражается в тех же единицах, что и результаты исследований, полученные с помощью данной методики: процентах, миллионных долях.

**Правильность (точность)** аналитического метода характеризует близость результатов исследований, полученных данным методом, к истинному значению. Правильность метода должна устанавливаться в пределах аналитической области. При коли-

чественном определении исследуемого вещества этот параметр может быть установлен путем применения хроматографического метода к анализируемому объекту с использованием стандарта известной степени чистоты или путем сравнения результатов, полученных предлагаемой аналитической методикой, с результатами, которые получены другой независимой методикой, правильность которой известна. Правильность методики количественного определения идентифицированных примесных соединений устанавливается по результатам анализа методом добавок. При отсутствии образцов примесных соединений или в тех случаях, когда структура их не установлена, правильность предлагаемой методики их определения должна быть подтверждена результатами анализа другой аналитической методики с охарактеризованной правильностью. Правильность должна быть оценена на основании не менее шести определений минимум на трех уровнях концентрации в пределах аналитической области (например, три повторности определения для двух концентраций).

**Воспроизводимость** аналитического метода характеризует степень совпадения индивидуальных испытаний при многократном его использовании. Она выражается величиной стандартного отклонения, коэффициентом вариации и доверительным интервалом и устанавливается при количественном анализе не менее 9 образцов, позволяющем статистически рассчитать эти параметры [94–97]. Воспроизводимость определяется в процессе разработки методики и характеризует надежность анализа в выбранных параметрах метода. Если измерения подтверждены вариациями в условиях анализа, в методику должно быть включено соответствующее примечание. Воспроизводимость хроматографических методов должна гарантироваться параметрами пригодности системы.

**Межлабораторная воспроизводимость** метода показывает степень воспроизводимости результатов испытаний, выполненных в различных лабораториях на оборудовании одинакового класса разными аналитиками в разное время. Данная характеристика позволяет оценить воспроизводимость результатов испытаний в условиях, определенных данной методикой и полученных в различных лабораториях разными специалистами.

**Предел обнаружения** выражается минимальным содержанием анализируемого вещества в образце, которое может быть обнаружено с помощью данной методики. Эта величина характеризует способность методики определять концентрацию вещества выше и ниже требуемого уровня. Предел обнаружения обычно выражается как концентрация исследуемого вещества (например, в про-

центах или долях на миллион – ppm) в образце и используется главным образом для испытаний на чистоту.

Для неинструментальных методов предел обнаружения устанавливается визуально. В случае использования инструментальных, например хроматографических, методов, имеющих фоновый сигнал, устанавливается минимальное содержание вещества в хроматографической зоне, при котором анализируемое вещество может быть достоверно обнаружено. В таких случаях соотношение выходного сигнала детектора анализируемой пробы и фона должно составлять 2 : 1 или 3 : 1. Предел обнаружения для инструментальных методов может быть установлен расчетным путем с использованием величины стандартного отклонения и угла наклона калибровочной кривой.

**Предел количественного определения** – это минимальное содержание исследуемого вещества, которое может быть количественно определено с приемлемой правильностью и воспроизводимостью. Предел количественного определения выражается как концентрация исследуемого вещества в пробе (например, в процентах, ppm). Данный параметр характеризует методику количественного определения низких концентраций вещества в образце, например примесей. Установление предела количественного определения может проводиться визуально как для инструментальных, так и для неинструментальных методов, а также расчетным путем на основании величины стандартного отклонения и угла наклона калибровочной кривой.

**Пригодность системы** – это интегральная характеристика многих аналитических методик, которая показывает надежность анализа в заданных условиях его проведения. Параметры пригодности системы обеспечивают соблюдение валидности метода в тех случаях, когда в процессе анализа возникают некоторые внутрилабораторные изменения условий анализа. Например, для метода планарной хроматографии в наибольшей степени могут подвергаться изменениям стабильность анализируемых растворов, pH подвижной фазы, ее состав, различные серии пластинок, относительная влажность воздуха, скорость движения элюента по слою сорбента и т. п.

### 2.6.2. ПРЕДВАЛИДАЦИОННЫЕ ТЕСТЫ

Исследование устойчивости целевого продукта в анализируемом образце должно предшествовать процедуре валидации [94, 95, 98–101]. Целевой продукт может быть нестабильным. Причинами могут быть:

- воздействие растворителя на исследуемое вещество;
- деструкция вещества в растворе, обусловленная действием света или кислорода воздуха [102];
- деструкция вещества, обусловленная разложением на активной поверхности слоя силикагеля [103].

Для доказательства устойчивости целевого продукта необходимо осуществить следующие тесты:

- провести двумерную хроматографию;
- провести хроматографию раствора одной и той же пробы через следующие промежутки времени: 0,1; 0,5; 1,0; 4,0 и 24 ч;
- провести нанесение одной и той же пробы с последующей хроматографией через 0,1; 0,5; 1,0 и 4,0 ч;
- проводить количественную обработку хроматограммы после высушивания, нанесения на ее поверхность обнаруживающего реагента и проведения цветной реакции (если это необходимо) сразу же, а затем через 0,5; 2,0 и 4,0 ч.

Требования, предъявляемые к анализируемому образцу:

- стабильность вещества в растворе не менее 1,0 ч;
- стабильность вещества на слое сорбента не менее 30 мин;
- стабильность вещества на хроматограмме после проявления последней не менее 1,0 ч. Следует отметить, что разложение вещества в растворе можно предотвратить добавлением антиоксиданта, а при нанесении пробы и денситометрировании использовать атмосферу азота или другого инертного газа.

### 2.6.3. GLP В ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Методы и принципы GLP в настоящее время входят в повседневную жизнь аналитических лабораторий. Согласно принципам GLP анализ должен быть выполнен в соответствии с требованиями валидации, и его результаты должны быть полностью задокументированы [65, 104–106].

Документация играет важную роль в ПХ. Так, все стадии хроматографического процесса, находящиеся под контролем компьютера, документируются. В документе отражаются следующие параметры:

- квалификация вещества-стандарта;
- фирма изготовитель и номер партии вещества-стандарта;
- тип используемых пластинок, фирма-изготовитель и номер партии;
- условия промывания и активирования пластинок;
- условия нанесения стандарта и пробы на пластинку;

- условия элюирования (подвижная фаза, тип камеры, насыщение);
- условия сушки хроматограммы;
- квалификация, фирма-изготовитель, номер партии обнаруживающего реагента;
- концентрация раствора обнаруживающего реагента;
- способ нанесения обнаруживающего реагента на хроматограмму;
- условия проведения цветной реакции;
- условия проведения количественной оценки результатов (сканирование, интегрирование, регистрация спектров) [75–78, 107–110].

В рамках методологии GLP требуется использование современных приборов. Все приборное оборудование должно пройти контрольные тесты перед проведением анализа. Так, в случае использования аппликаторов необходим контроль за фиксированием установки шприцев и качеством работы элементов узла, осуществляющего распыление; для денситометра необходим контрольный тест оптических и электронных систем, блока установки длины волны и характеристик источников света [107].

Таким образом, согласно правилам GLP в ПХ необходимо выполнять следующие требования:

- однократное использование подвижной фазы;
- приготовление компонентов подвижной фазы в индивидуальной емкости: *Хроматографическая камера не является коктейль-шейкером!* [105];
- соблюдение точных объемов каждого растворителя, входящего в состав элюента;
- промывка и активирование пластинок перед экспериментом;
- использование только боковых граней пластинок при их ручном переносе;
- недопущение сушки хроматограмм с помощью термовентиляторов или промышленного сжатого воздуха.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1964. 175 с.
2. Kasang G., Goeldner G. Patent No 2012680 (BRD), 1970.
3. AnaLab. Prospect. Boston, USA, 1971. 38 p.
4. Camag. Prospect. Muttenz, Switzerland, 1971. 44 p.
5. Camag. Prospect. Muttenz, Switzerland, 1977. 33 p.

6. De Deyne V. J., Vettters A. F. Techniques to reduce errors in quantitative thin-layer chromatography using elution // J. Chromatogr. 1967. V. 31. P. 261–264.
7. Kalasz H. The History and Perspective of Thin-Layer Chromatography // Proceedings of Chromatographic Conference. Budapest, Hungary, 1983. 145 p.
8. Touchstone J. C. Practice of Thin-Layer Chromatography. N. Y.: J. Wiley and Sons. 1992. 270 p.
9. Gunter K. // Handbook of Thin-Layer chromatography / Ed. J. Sherma. N. Y.: Marcel Dekker, 1991. 1047 p.
10. Grinberg N. Modern Thin-Layer Chromatography. London – N. Y.: Marcel Dekker, 1990. 490 p.
11. Jork H. Quantitative HPTLC in the Field Pharmaceutical Application. Bad Duerkheim. FRG, 1987. 239 p.
12. Feigle F. Spot Tests. Organic Applications. Amsterdam: Elsevier. 165 p.
13. Randerath K. Thin-Layer Chromatography. Weinheim: Verlag-Chemie, 1963. 250 p.
14. Thin-Layer Chromatography. N. Y. – London: Academic Press, 1966. 271 p.
15. Курхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981. Т. 1. 616 с.
16. Nybom N. On the relationship between amount of substance and spot size in thin-layer chromatography // J. Chromatogr. 1967. V. 28. P. 447–451.
17. Нестеров В. В., Беленький Б. Г., Эрастов Д. П. Количественный анализ тонкослойных хроматограмм по размерам хроматографических пятен. Анализ динитрофенильных производных аминокислот // Биохимия. 1968. Т. 33. С. 537–542.
18. Samuels S., Fisher C. Direct quantification of micro thin-layer chromatograms // J. Chromatogr. 1972. V. 71. P. 297–306.
19. Purdy S. I., Truter E. V. Separation of polymyxin B. D. E and M by thin-layer chromatography // Chem. Ind. London. 1962. P. 506–511.
20. Purdy S. I., Truter E. V. The detection of thioram by thin-layer chromatography. The dependence of spots area from amount of substance // Analyst. 1962. V. 87. P. 802–809.
21. Bhushan R. // Handbook on Thin-Layer Chromatography / Ed. J. Sherma. N. Y.: Marcel Dekker, 1991. 1047 p.
22. Jork H. // Dtsch. Apoth. Ztg. 1962. Bd. 102. S. 1263.
23. Jork H. // J. Pharmac. Belg. 1963. P. 213.
24. Camag Bibliogr. Service // 1998. V. 81. P. 8.
25. Treiber L. R. Quantitative TLC and its Industrial Application. N. Y.: Marcel Dekker, 1987. 370 p.
26. Крешков А. П. Основы аналитической химии. М.: Химия, 1965. 420 с.
27. Kubelka P., Munk F. // Z. techn. Phys. 1931. Bd. 12. S. 593.
28. Kortum G. Reflectionsspectroscopie. Berlin: Springer-Verlag, 1969. 414 s.
29. Frey H., Zeeloff K. Quantitative Dunnschicht-Chromatographie. Weinheim: VCH, 1992. 420 s.
30. Proceedings of Second International HPTLC Symposium / Ed. R. E. Kaiser. Institute of Chromatography. Bad Durkheim, 1982. 325 p.

31. *Poole C. F.* Contemporary Practice of Chromatography. Amsterdam: Elsevier, 1984. 251 p.
32. *Нестеров В. В.* Авт. свид. № 224138, 1968.
33. *Нестеров В. В., Беленький Б. Г., Сенютенкова Л. С.* Количественный анализ динитрофенильных и дансильных производных аминокислот на тонкослойных хроматограммах с помощью двухкоординатной денситометрии и флуориметрии точечным световым зондом // Биохимия. 1969. Т. 34. С. 824–830.
34. *Planar Chromatography 2003.* Modern Thin-Layer Chromatography. Camag. Muttentz, 2003. 44 p.
35. Camag. Camag TLC-scanner 3. Muttentz, 2000. 6 p.
36. Camag. <http://www.camag.com>.
37. *Дегтерев Е. В., Тяглов Б. В., Малахова И. И., Красиков В. Д.* Видеоденситометр “ДенсиСкан-1” для количественной тонкослойной хроматографии // Биотехнология. 1993. С. 44–47.
38. *Дегтерев Е. В., Тяглов Б. В., Малахова И. И., Красиков В. Д.* Количественное определение промышленных L-аминокислот с помощью видеоденситометрии // Материалы Всероссийской конференции “Применение жидкостной хроматографии в пищевой, медицинской и микробиологической промышленности”. Геленджик, 1992. 256 с.
39. *Ford T. S., Radin N. S.* Quantitative TLC with apple II computer-based video densitometer // Anal. Biochem. 1985. V. 150. P. 359–366.
40. *Bardecz S., Karsai T.* The new technique for determination of polyamines // Chromatographia. 1985. V. 20. P. 23–28.
41. *Pongor S.* High-speed videodensitometry. principle and applications // J. Liquid Chromatogr. 1982. V. 5. P. 1583–1590.
42. *Lenkeyl B., Csanyi J., Nansi P.* A rapid determination of sucrose and fructose in biological samples by video densitometry // J. Liquid Chromatogr. 1986. V. 9. P. 1869–1880.
43. Proceedings of 8th International Symposium on Instrumental Planar Chromatography. Exhibition Section. Interlaken. Switzerland, 1995. 236 p.
44. *Красиков В. Д., Малахова И. И., Новицкий А. П., Полубенцева М. И.* Видеоденситометр для тонкослойной хроматографии “ДенСкан-04”. Материалы 2-й школы семинара “Количественная ВЭТСХ”. Санкт-Петербург, 2002. 40 с.
45. <http://www.j-m.de>
46. *Малахова И. И., Красиков В. Д., Пащовский А. П., Кулев Д. Х.* Способ разделения пищевых синтетических красителей. Патент № 2177150 РФ, 2001.
47. *Красиков В. Д., Малахова И. И., Герасимов А. В.* Денситометры на основе сканирующих устройств для тонкослойной хроматографии и электрофореза // Материалы Всероссийской конференции “Химический анализ веществ и материалов”. Москва, 16–21 апреля 2000 г. 391 с.
48. *Meyer R. A., Grunding F., Schafer R., Scheider J.* // Die Nachr. 1989. Bd. 33. S. 261–268.

49. *Milovanovic G., Velijkovic G.* // J. Serb. Chem. Soc. 1989. V. 54. P. 155–162.
50. *Герасимов А. В., Малахова И. И., Красиков В. Д.* Идентификация окрашенных веществ в тонкослойной хроматографии с применением компьютерной обработки // Ж. прикл. химии. 2000. Т. 73. С. 1640–1643.
51. *Catch J.* Purity and Analysis of Labeled Compounds. U. K. Atomic Energy Authority. Radiochemistry Center. London, 1978. 424 p.
52. *Березкин В. Г., Бочков А. С.* Количественная хроматография. М.: Наука, 1980. 183 с.
53. *Шеллард Э.* Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. М.: Мир, 192 с.
54. *Spergel P., Rocco J. D.* // Pat. № 1218124 England, 1968.
55. *Fridman H., Talbot C.* // Pat. № 3222560 USA, 1971.
56. Chromalex-Prospect Numalex / Versaillex. Cedex. France, 1978.
57. *Pullan B., Howard R.* // Nucleonics. 1966. V. 24. P. 72–81.
58. *Snyder F.* Thin-Layer Radiochromatography and Related Procedures // Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods / Ed. A. Niederwieser and G. Pataki. Ann. Arbor. Science, 1970. P. 53–72.
59. *Несмеянов Ан. Н.* Радиохимия. М., 1972. 420 с.
60. *Вольнец М. П.* Тонкослойная хроматография в неорганическом анализе. М.: Наука, 1993. 225 с.
61. *Prydz S.* // Anal. Chem. V. 45. P. 2317–2324.
62. *Wilde P. F.* Thin-Layer Chromatography. London: United Trade Press, 1965. 229 p.
63. *Schutte L.* Radioisotope sample measurement technique // J. Chromatogr. 1972. V. 72. P. 303–315.
64. Mini Scan MS 100F. TLC-scanner. Prospect. Bioscan. USA, 2001.
65. *Kaiser R. E.* Simple and instrumentalized high performance planar chromatography. HFC-HyperCard. Course-paper. version. I.F.E.A.R. Bad Durkheim, 1996. 157 p.
66. *Ebel S.* Quantitative thin-layer chromatography // Topics in current chemistry. 1984. V. 126. P. 76–90.
67. *Poole C. F., Poole S. K., Dean T. A.* Sample requirements for quantitation in TLC // J. Planar Chromatogr. 1989. V. 2. P. 180–189.
68. *Ebel S.* Quantitative analysis in TLC and HPTLC // J. Planar Chromatogr. 1996. V. 9. P. 4–15.
69. *Ebel S.* Lineare kalibriefunktionen // GIT Supplement. 1983. V. 3. P. 55–61.
70. *Butler H., Pool C.* Calibration methods applied to fluorescence scanning densitometry // J. Chromatogr. Sci. 1983. V. 21. P. 55–61.
71. *Sarby S., Cobzac S.* Calibration in planar chromatography based on weight regression functions // J. Liquid Chromatogr. 2000. V. 23. P. 273–280.
72. *Sistovaris N.* Nichtlineare Kalibration in der quantitativen HPTLC // GIT Supplement. 1983. Bd. 3. S. 17–24.

73. *Ebel S.* Calibration in TLC/HPTLC using Michaelis-Menten function // *Chromatographia*. 1984. V. 18. P. 23–27.
74. *Bethke H., Santi W., Frei K.* Data pair technique application in TLC // *J. Chromatogr. Sci.* 1974. V. 12. P. 392–398.
75. *Allwonh J., Ebel S.* Testing and validation of TLC scanners // *J. Planar Chromatogr.* 1989. V. 2. P. 71–75.
76. *Densitometry in Thin-Layer Chromatography* / Ed. J. C. Touchstone and J. Sherma. N. Y.: Wiley-Interscience. 1989. 489 p.
77. *Petrovic M., Lazaric K., Babic S.* Validation of TLC determination with CCD-camera and slit-scanning densitometers // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1999. V. 82. P. 25–30.
78. *Руководство по современной тонкослойной хроматографии* / Под ред. О. Г. Ларионова. М., 1993. 180 с.
79. *Ebel S., Glaser E.* // *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.* 1979. V. 2. P. 36–49.
80. *Kasiser R. E.* Instrumental HPTLC // *Proceedings of 1st International Symposium on Instrumental HPTLC*. Bad Durkheim. Huthig. Heidelberg, FRG, 1980. P. 165–184.
81. *Новицкий П. В., Зограф И. А.* Оценка погрешностей результатов измерений. 2-е изд. Л.: Энергоатомиздат, 1991. 121 с.
82. *Szepesi G.* Some aspects of the validation of planar chromatographic methods in pharmaceutical analysis // *J. Planar Chromatogr.* 1993. V. 6. P. 259–268.
83. *Vegh Z.* Validation of HPTLC analysis of drug substances // *J. Planar Chromatogr.* 1995. V. 8. P. 188–193.
84. *Fodor K., Renger B., Zeller M.* Validation and quality assurance of planar chromatographic procedures in pharmaceutical analysis // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 2001. V. 84. P. 2165–2176.
85. *Renger B.* Contemporary HPTLC in pharmaceutical quality control // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* V. 81. 1998. P. 333–339.
86. *Renger B., Fisher M., Funk W.* Validation of analytical procedures in pharmaceutical analytical chemistry // *J. Planar Chromatogr.* 1995. V. 8. P. 269–278.
87. *Vork I., Prosek M.* Validation of quantitative TLC, using digital video camera // *Proceedings of 9th International Symposium on Instrumental Thin-Layer Chromatography*. April 9–11 1997. Switzerland: Interlaken, 1997. P. 251–259.
88. *ICN Guideline: Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology*. Washington, USA (CPMP III 5626), 1994.
89. *ICN Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology*. Washington, USA (CPMP III/282), 1995.
90. *The United States Pharmacopeia XXVI ed.*, 2003.
91. *European Pharmacopeia*. Supplement 2000.
92. *British Pharmacopeia*, 2001. Vol. II. Appendix III.
93. *Validation of Analytical Procedures: Methodology Recommended for Adoption of Step 4 of the ICN Process on 6 November 1996 by ICN Steering Committee*.

94. *Dammertz W., Renger B.* Validation and quality assurance in planar chromatography // *Proceedings of the International Symposium on Planar Chromatography Separations*. "Planar Chromatography 2002". May 11–13. Heviz, Hungary, 2002. P. 11–16.
95. *Ferencz-Fodor K., Vegh Z., Renger B., Zeller M.* Validation and quality assurance of planar chromatographic procedures in pharmaceutical analysis // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 2001. V. 84. P. 1265–1276.
96. *Доерфель К.* Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994. 267 с.
97. *Данцер К., Тан Э., Мольк Д.* Аналитика. М.: Химия, 1981. 278 с.
98. *Fodor K., Renger B.* Validation and monitoring of the planar chromatographic purity tests for drug substances // *J. Planar Chromatogr.* 1995. V. 8. P. 349–356.
99. *Szepesi G.* Some aspects of the validation of planar chromatographic methods. General principles and practical approaches // *J. Planar Chromatogr.* 1993. V. 6. P. 187–197.
100. *Indrayanto G., Sia T.* Densitometric determination of ampicillin in pharmaceutical preparates and its validation // *J. Liquid Chromatogr. and Rel. Technol.* 2001. V. 24. P. 1501–1510.
101. *Vork I., Prosek M.* Validation of quantitative TLC, using digital video camera // *Proceedings of 9th International Symposium on Instrumental Thin-Layer Chromatography*. April 9–11 1997. Switzerland: Interlaken, 1997. P. 365–372.
102. *Sun S. W., Fabry H., Maillols H.* Test procedure validation for the TLC assay of degradation products in pharmaceutical formulation // *J. Liquid Chromatogr.* 1994. V. 17. P. 2495–2509.
103. *Lazaric K., Cucek B., Faus G. R.* HPTLC method for determination of parabens. Stability test // *J. Planar Chromatogr.* 1999. V. 12. P. 86–89.
104. *Zieloff K.* TLC. Automation and GLP. GmbH. Merck. Darmstadt: GIT Verlag, 1998. 115 p.
105. *Jork H., Wimmer H.* *Quantitative Auswertung von Dunnschicht-Chromatogrammen*. Darmstadt: GIT Verlag, 1989. 104 s.
106. *Renger R.* Quantitative planar chromatography as a tool in pharmaceutical analysis // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1993. V. 76. P. 7–15.
107. *Zieloff K.* *Dunnschicht-Chromatographie in der Automatisierung und GLP*. Merck. KGA Ed. Darmstadt: GIT Verlag, 1996. 96 s.
108. *Jork H., Pfaab G.* Validation of an analytical procedure in TLC. Heidelberg: Desaga Offprint, 1994. 53 p.
109. *Werther M.* *Möglichkeiten der modernen dunnschicht-chromatographie* // *GIT Fachz. Lab.* 2003. S. 32–53.
110. *Kalasz J., Bathory M.* Pharmaceutical applications of TLC // *LC-GC (Europe)*. 2002. V. 14. P. 311–321.

В настоящей главе представлены примеры применения ПХ для количественного анализа биологически активных органических соединений различных классов, таких как антибиотики, аминокислоты, витамины, гормоны, синтетические лекарственные средства и т. д.; а также катионов щелочноземельных и некоторых тяжелых металлов. Для разделения этих соединений были использованы стационарные фазы различной природы, а для количественных измерений – разные модели сканеров, включая видеоденситометры.

В приведенных примерах представлены:

- условия разделения;
- условия визуализации пятен на хроматограммах;
- хроматограммы разделяемых смесей или величины  $R_f$  компонентов, входящих в эти смеси;
- условия сканирования хроматограмм и денситограммы;
- пределы обнаружения и детектирования.

В некоторых примерах приведены результаты количественных измерений исследованных соединений и метрологические характеристики методики.

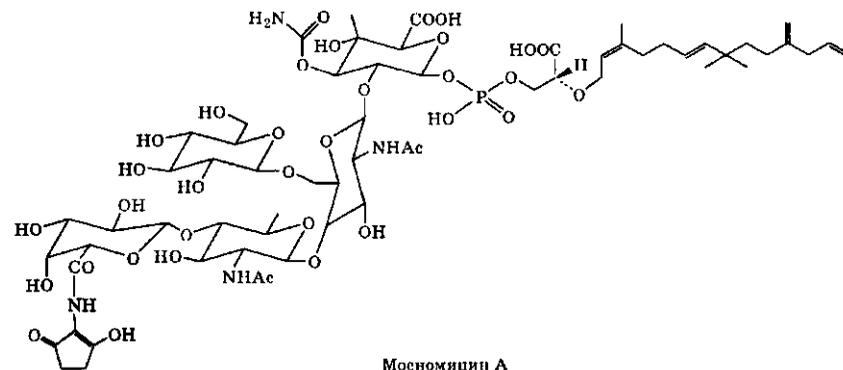
К каждому примеру представлен список использованной литературы и рисунки.

### 3.1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

#### 3.1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЕНОМИЦИНА В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Моеномицин (флавомицин) широко используется в ветеринарной практике для лечения инфекционных заболеваний бактериального происхождения [1, 2]. Моеномицин получают с помощью микробиологического синтеза (штамм продуцент – *Streptomyces bambbergiensis*). Культуральная жидкость (КЖ) содержит три антибиотика – моеномицины А, В и С; молекулярные массы моеномицинов находятся в пределах от 68 до 73 кДа [2, 3].

Наибольшей антимикробной активностью обладает моеномицин А:



ПХ была использована для количественного определения индивидуальных компонентов КЖ. Важнейшая проблема, стоящая при использовании ПХ, как и других хроматографических и физико-химических методов, – получение веществ-стандартов. Вещества-стандарты моеномицины А, В и С (отсутствующие как на внешнем, так и на внутреннем рынке) получали из КЖ с помощью мембранных методов, жидкостной колонной хроматографии низкого давления на силикагеле с последующей очисткой методом обращеннофазовой ( $C_{18}$ ) препаративной ВЭЖХ. Чистота полученных препаратов достигала 98,0 % [4].

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения 1,0 ч при 20 °С.

Неподвижная фаза: пластинки “Сорбфил” ПТСХ-АФ-В, 10×15 см (Россия), промытые непосредственно перед анализом смесью хлороформ – метанол (1 + 1,  $v/v$ ), высушенные при 20 °С в течение 15 мин и активированные при 110 °С в течение 30 мин.

Подвижная фаза: пропанол-2 – 25 %-й водный аммиак (65 + 35,  $v/v$ ); фронт элюента 7,0 см; время разделения 45–50 мин; температура 20 °С.

#### Визуализация пятен моеномицинов на хроматограммах

Высушенную при 20 °С хроматограмму (15 мин) выдерживают при 120 °С в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры и погружают на 10 с в камеру с раствором обнаруживающего реагента (50 мл хлорсульфоновой кислоты + 25 мл лед. уксусной кислоты), высушивают в течение 15 мин при 20 °С, затем выдерживают в течение 10 мин при 110 °С. Наблюдают красные пятна моеномицинов

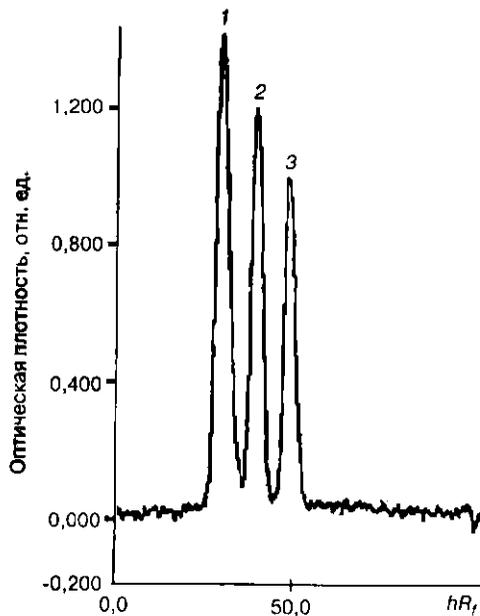


Рис. 3.1. Денситограмма разделения моеномицинов А (1), В (2) и С (3)

на белом фоне. Пределы обнаружения моеномицинов А, В и С составляют 0,1 мкг/пятно.

Величины  $R_f$  моеномицинов А, В и С составляют:

А	0,33±0,03
В	0,42±0,03
С	0,55±0,03

$n = 5; P = 0,95$

#### Количественное определение

Денситометр "TLC Scanner II" фирмы "Camag" (Швейцария); режим работы - отражение; длина

волны 510 нм; параметры щели 0,4×3,0 мм (ширина × высота). Эти обозначения будут использованы в последующих разделах.

Денситограмма разделения моеномицинов приведена на рис. 3.1. Предел детектирования 0,2 мкг/пятно. Область линейного сигнала 0,2-1,0 мкг/пятно.

ТАБЛИЦА 3.1

Результаты количественного определения моеномицина А (мг/мл) в различных пробах КЖ и метрологические характеристики методики

Номер пробы	$x^*$	$\pm\rho x$	$\epsilon, \%$	Номер пробы	$x^*$	$\pm\rho x$	$\epsilon, \%$
1	1,31	0,04	3,2	6	1,56	0,04	2,4
2	1,75	0,07	4,1	7	1,00	0,03	3,00
3	1,86	0,04	2,00	8	1,94	0,09	4,6
4	1,05	0,03	3,1	9	1,73	0,03	1,5
5	1,79	0,03	3,8				

$n = 3; P = 0,95$

\*  $x$  - среднее значение концентрации (содержания) анализируемого вещества, полученное по результатам  $n$  независимых измерений (доверительная вероятность  $P = 0,95$ );  $\pm\rho x$  - стандартное отклонение;  $\epsilon, \%$  - коэффициент вариации. (Эти обозначения будут использованы в последующих разделах.)

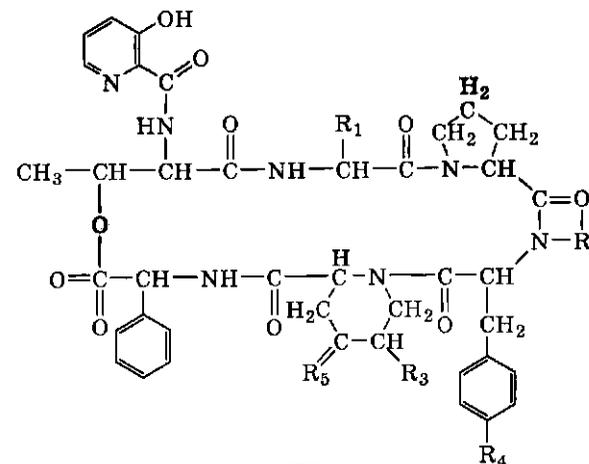
В табл. 3.1 представлены результаты определения содержания моеномицина А в различных образцах КЖ [4].

Данная методика после соответствующей пробоподготовки может быть использована для определения содержания моеномицина в кормах, кормовых добавках и премиксах, а также при ветеринарном контроле мяса домашних животных и птицы.

#### ЛИТЕРАТУРА

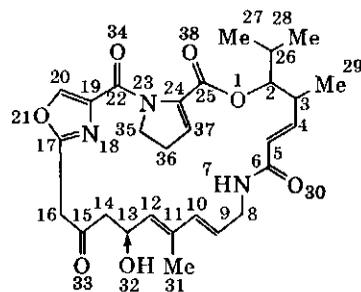
1. Huber G. Antibiotics. Berlin: Springer-Verlag, 1989. 284 p.
2. Van Heienoort J., Derrien M. // FEBS Lett. 1978. V. 89. P. 141-146.
3. Wetzel W. // Angew. Chem. 1981. V. 93. P. 130-141.
4. Tyaglov B. V., Zvenigorodskii V. I., Sizova I. A. // J. Planar Chromatogr. 1997. V. 10. P. 200-203.

#### 3.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКА ВИРДЖИНИАМИЦИНА



Антибиотики V[S] семейства

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
V[S <sub>1</sub> ]	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	O
V[S <sub>2</sub> ]	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	O
V[S <sub>3</sub> ]	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	H	O
V[S <sub>4</sub> ]	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	O
V[S <sub>5</sub> ]	CH <sub>3</sub>	H	OH	H	O

V[M<sub>2</sub>] – 24,37-дегидро-V[M<sub>1</sub>]Антибиотики V[M<sub>1</sub>] семейства

Антибиотик вирджиниамицин, продуцируемый культурой *Streptomyces virginiae*, широко применяется в ветеринарной практике. Этот антибиотик активен по отношению к грамположительным микроорганизмам [1–3]; он состоит из смеси компонентов, объединяемых в два семейства – V[M] и V[S].

Основными компонентами культуральной жидкости (КЖ) *Str. virginiae* являются V[M<sub>1</sub>] и V[S<sub>1</sub>], доля которых составляет в сумме 90%. Вирджиниамицин обладает синергическим действием, проявляя максимум бактерицидной активности при содержании в смеси компонентов V[S] семейства 30–40% [1].

ПХ была использована для количественного определения индивидуальных вирджиниамицинов в КЖ. Коммерческие препараты образцов-стандартов (кроме V[M<sub>1</sub>]) отсутствовали, поэтому их получали из КЖ с помощью мембранных методов, жидкостной колоночной хроматографии низкого давления на силикагеле с последующей очисткой методом обращеннофазовой (C<sub>18</sub>) препаративной ВЭЖХ. Чистота полученных стандартов составляла 98,0% и более [4].

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное хроматографирование в насыщенной камере; время насыщения 30 мин при 20 °С.

Неподвижная фаза: пластинки “Сорбфил” ПТСХ-П-В-УФ, 10×15 см (Россия). Процедура промывания и активирования пластинок описана в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: хлороформ – метанол (92 + 8, v/v); фронт элюента 9,0 см; время разделения 12–15 мин, температура 20 °С.

#### Визуализация пятен вирджиниамицинов на хроматограмме

Высушенную при 20 °С хроматограмму (10 мин) просматривают под ультрамикроскопом при длине волны 254 нм; наблюдают темные пятна на зеленом фоне. На рис. 3.2 представлено разделение

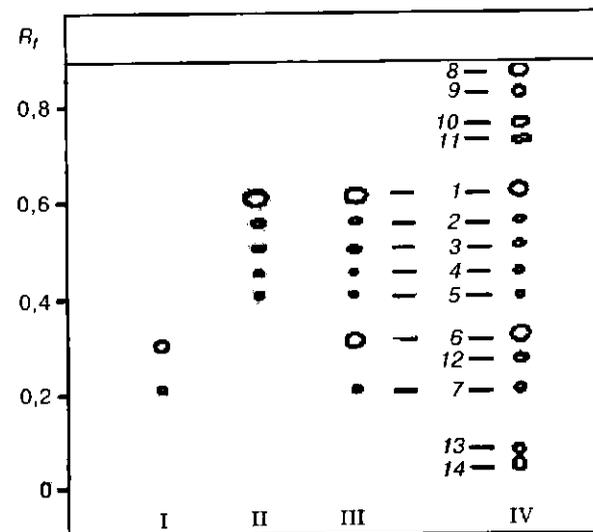


Рис. 3.2. Хроматографическое разделение вирджиниамицинов: I – V[M]; II – V[S]; III – смесь V[M] и V[S]; IV – образец КЖ; 1 – V[S<sub>1</sub>]; 2 – V[S<sub>2</sub>]; 3 – V[S<sub>3</sub>]; 4 – V[S<sub>4</sub>]; 5 – V[S<sub>5</sub>]; 6 – V[M<sub>1</sub>]; 7 – V[M<sub>2</sub>]; 8–14 – неизвестные компоненты, присутствующие в КЖ

вирджиниамицинов-стандартов, принадлежащих к V[M] и V[S] семействам, их смеси и образца КЖ.

Предел обнаружения V[M<sub>1</sub>] и V[S<sub>1</sub>] вирджиниамицинов – 0,02 мкг/пятно.

ТАБЛИЦА 3.2

Результаты количественного определения вирджиниамицинов V[M<sub>1</sub>] и V[S<sub>1</sub>] (мг/мл) в различных пробах КЖ и метрологические характеристики методики

Номер пробы	x	±рх	ε, %	Номер пробы	x	±рх	ε, %		
1	V[M <sub>1</sub> ]	3,4	0,085	2,5	6	V[M <sub>1</sub> ]	3,9	0,156	4,0
	V[S <sub>1</sub> ]	1,3	0,05	3,9		V[S <sub>1</sub> ]	1,1	0,044	4,0
2	V[M <sub>1</sub> ]	2,8	0,05	1,9	7	V[M <sub>1</sub> ]	2,6	0,091	3,5
	V[S <sub>1</sub> ]	1,0	0,036	3,6		V[S <sub>1</sub> ]	1,0	0,031	3,1
3	V[M <sub>1</sub> ]	4,4	0,097	2,2	8	V[M <sub>1</sub> ]	2,5	0,052	2,1
	V[S <sub>1</sub> ]	1,3	0,034	2,6		V[S <sub>1</sub> ]	0,8	0,024	3,0
4	V[M <sub>1</sub> ]	4,0	0,144	3,6	9	V[M <sub>1</sub> ]	4,3	0,12	2,8
	V[S <sub>1</sub> ]	1,4	0,039	2,8		V[S <sub>1</sub> ]	1,4	0,036	2,6
5	V[M <sub>1</sub> ]	3,7	0,074	2,0	10	V[M <sub>1</sub> ]	3,8	0,144	3,8
	V[S <sub>1</sub> ]	1,2	0,04	3,3		V[S <sub>1</sub> ]	1,2	0,025	2,1

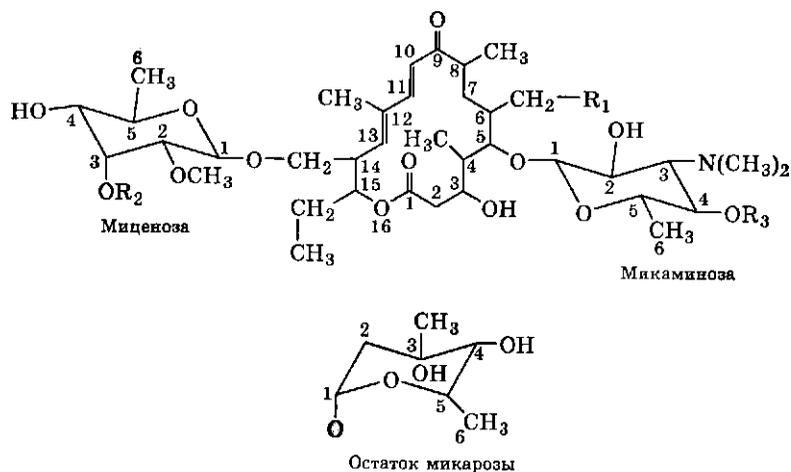
n = 3; P = 0,95

## Количественное определение

Денситометр "Шимадзу", модель CS-920 фирмы "Shimadzu" (Япония); режим работы – отражение; длина волны для  $V[M_1]$  и  $V[S_1]$  – 235 нм; параметры щели 0,4×0,4 мм. Предел детектирования 0,05 мкг/пятно. Область линейного сигнала 0,05–2,0 мкг/пятно. Результаты количественного определения вирджиниамицинов  $V[M_1]$  и  $V[S_1]$  в образцах КЖ представлены в табл. 3.2.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Biot A. // *Biotechnology of Industrial Antibiotics* / Ed. E. J. Van Damme. N. Y.: Marcel Dekker, 1984. P. 695–720.
2. Crooy P., De-Keys R. // *J. Antibiot.* 1972. V. 25. P. 371–376.
3. Bron B., Devard R. // *Analyst.* 1974. V. 99. P. 19–27.
4. Tyaglov B. V., Zvenigorodskii V. I., Sizova I. A., Zhdanov V. G. // *J. Planar Chromatogr.* 1995. V. 8. P. 374–378.

3.1.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИЛОЗИНА  
В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Тилозин	–CHO	–CH <sub>3</sub>	– остаток микарозы
Дезмикозин	–CHO	–CH <sub>3</sub>	– H
Реломицин	–CH <sub>2</sub> OH	–CH <sub>3</sub>	– остаток микарозы
Макроцин	–CH <sub>0</sub>	– H	– остаток микарозы

Тилозин – макролидный антибиотик ветеринарного назначения – продуцируется культурой *Streptomyces fradie*. Культуральная жидкость (КЖ) *Str. fradie* помимо тилозина содержит макролидные антибиотики дезмикозин, реломицин и макроцин, которые являются предшественниками тилозина [1, 2]. Бактерицидная активность этих антибиотиков составляет 20–40 % по отношению к активности тилозина, при этом они не токсичны.

ПХ была использована для количественного определения тилозина и сопутствующих ему в КЖ антибиотиков. Использовали стандартный образец тилозина фирмы "Sigma" (США), Cat. No. T6134. Образцы-стандарты дезмикозина и реломицина получали из тилозина согласно методикам, описанным ранее [3], с последующим выделением с помощью колоночной хроматографии низкого давления на силикагеле. Образец-стандарт макроцина был выделен из КЖ *Str. fradie* с помощью препаративной ТСХ на силикагеле [4]. Чистота полученных стандартов 93–95 %.

## Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения 30–40 мин при 20 °С.

Неподвижная фаза: пластинки "Сорбфил" ПТСХ-П-В-УФ, 10×15 см (Россия). Процедура промывания и активирования пластинок описана в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: этилацетат – диэтиламин (95 + 5, v/v); фронт элюента 9,0 см; время разделения 20 мин; температура 20 °С.

Визуализация пятен тилозина и сопутствующих ему в КЖ  
антибиотиков на хроматограмме

Высушенную при 20 °С хроматограмму (10 мин) просматривают под ультрахемископом при длине волны 254 нм; наблюдают темные пятна на зеленом фоне. На рис. 3.3 представлено разделение тилозина, дезмикозина,

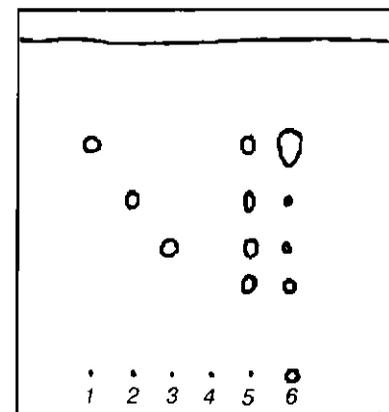


Рис. 3.3. Хроматографическое разделение образцов-стандартов и пробы КЖ *Str. fradie*:

1 – тилозин; 2 – дезмикозин; 3 – реломицин; 4 – макроцин; 5 – смесь веществ-стандартов; 6 – проба КЖ

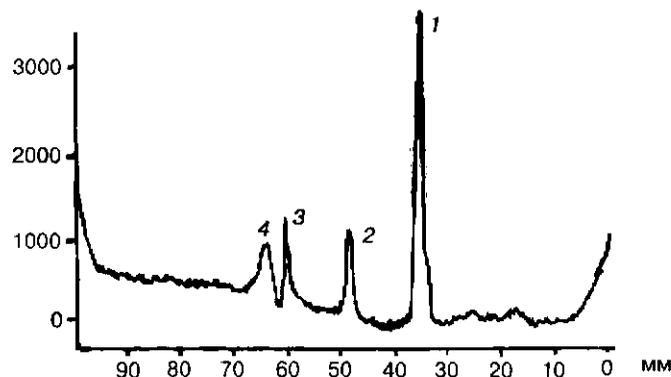


Рис. 3.4. Денситограмма КЖ *Str. fradie*

По оси абсцисс отложено расстояние от верхнего края хроматограммы; по оси ординат – величина денситометрического сигнала;

1 – тилозин; 2 – дезмикозин; 3 – реломицин; 4 – макроцин

реломицина и макроцина – образцов-стандартов и пробы КЖ. Предел обнаружения антибиотиков – 0,25 мкг/пятно.

#### Количественное определение

Денситометр “Шимадзу”, модель CS-920 (Япония); режим работы – отражение; длина волны 248 нм; параметры щели 0,4×0,4 мм. Предел детектирования 0,5 мкг/пятно. Область линейного сигнала 0,5–3,0 мкг/пятно. На рис. 3.4 представлена денситограмма образца КЖ штамма продуцента тилозина.

Результаты количественного определения тилозина в КЖ представлены в табл. 3.3.

ТАБЛИЦА 3.3

Результаты количественного определения тилозина (мкг/мл) в различных пробах КЖ *Str. fradie* и метрологические характеристики методики

Номер пробы	$\bar{x}$	$\pm px$	$\epsilon, \%$	Номер пробы	$\bar{x}$	$\pm px$	$\epsilon, \%$
1	5500	200	3,5	5	4100	160	4,4
2	5200	210	4,1	6	4800	190	3,9
3	4800	130	2,8	7	4200	80	1,8
4	6000	190	2,1				

$n = 5; P = 0,95$

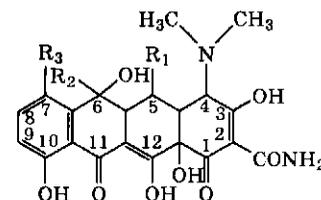
Данная методика после соответствующей пробоподготовки может быть использована для определения тилозина в кормах, кормовых добавках и премиксах, а также при ветеринарном контроле мяса домашних животных и птицы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hamilt R. L. // Antibiot. Chemotherapy. 1961. V. 11. № 5. P. 328–340.
2. McGuier I. M., Higgins M. M., Hoehn W. S. // Antibiot. Chemotherapy. 1961. V. 11. № 5. P. 320–327.
3. Либ Г., Шенигер В. Синтез органических препаратов в малых количествах. М.: Госхимиздат, 1957. 267 с.
4. Тяглов Б. В., Жданов В. Г., Юстратова Л. С., Шолин А. Ф. // Биотехнология. 1988. № 4. С. 548–550.

#### 3.1.4. РАЗДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Хлортетрациклин, тетрациклин и окситетрациклин – антибиотики из группы тетрациклинов, которые синтезируются различными штаммами актиномицетов рода *Streptomyces* и обладают широким спектром антимикробного действия [1]. Смесь этих антибиотиков используется в некоторых лекарственных препаратах [2].



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Тетрациклин	H	CH <sub>3</sub>	H
Окситетрациклин	OH	CH <sub>3</sub>	H
Хлортетрациклин	H	CH <sub>3</sub>	Cl

ПХ была использована для количественного определения индивидуальных тетрациклинов. В качестве стандартных образцов использовали препараты фирмы “Sigma” (США), Cat. No. T3383.

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в ненасыщенной камере.

Неподвижная фаза: пластинки "RP-18W 254" на стеклянной подложке, 10×10 см, фирмы "Merck", Art. 13124 (Германия).

Подвижная фаза: 0,5 М водный раствор щавелевой кислоты – метанол – ацетонитрил (6 + 2 + 2, v/v); фронт элюента 8,5 см; время разделения 25–30 мин; температура 22 °С.

### Визуализация пятен тетрациклинов на хроматограммах

Пятна тетрациклинов на хроматограммах имеют желтый цвет на белом фоне.

Пределы обнаружения тетрациклинов 0,2 мкг/пятно.

Величины  $R_f$  тетрациклинов:

Хлортетрациклин	0,33±0,03
Тетрациклин	0,42±0,03
Окситетрациклин	0,55±0,03

$$n = 3; P = 0,95$$

### Количественное определение

Денситометр "Шимадзу", модель CS-9000 (Япония); режим работы – отражение; двуволновая схема сканирования,  $\lambda_1 = 450$  нм,  $\lambda_2 = 600$  нм; параметры щели 0,4 × 0,4 мм. Предел детектирования тетрациклинов 0,45 мкг/пятно. Область линейного сигнала от 0,45 до 3,0 мкг/пятно.

На рис. 3.5 представлена денситограмма смеси тетрациклинов.

Данная методика после соответствующей пробоподготовки может быть использована для количественного определения тетрациклинов в КЖ в процессе биосинтеза, а также в комбинированных фармпрепаратах.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. М.: Мир, 1985. 269 с.
2. Навашин С. М., Фомина И. П. Рациональная антибиотикотерапия. М.: Медицина, 1982. 374 с.

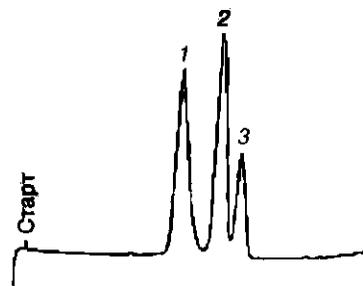


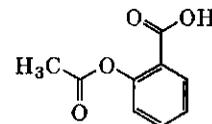
Рис. 3.5. Денситограмма модельной смеси тетрациклинов:

1 – хлортетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – окситетрациклин

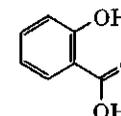
## 3.2. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИНТЕТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

### 3.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРЕПАРАТАХ, СОДЕРЖАЩИХ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЮ КИСЛОТУ

Ацетилсалициловая кислота (АСК) оказывает противовоспалительное, жаропонижающее, а также анальгезирующее действие. Противовоспалительное и анальгезирующее действие АСК взаимосвязаны, поскольку анальгезирующий компонент способствует облегчению течения воспалительного процесса, а уменьшение явлений воспаления служит причиной болеутоляющего эффекта [1]. Салициловая кислота (СК) является продуктом гидролиза АСК, и поэтому она практически всегда присутствует в препаратах-анальгетиках, содержащих АСК.



Ацетилсалициловая кислота



Салициловая кислота

Согласно данным Британской и Американской фармакопеи содержание СК в препаратах, содержащих АСК, может варьировать в пределах от 0,3 до 3,0 % [2, 3]. Для контроля чистоты препаратов-анальгетиков, содержащих АСК, использовали ТСХ и ВЭЖХ [4, 5].

ПХ была использована для аналитического контроля содержания СК в таблетках аспирина, выпускаемого различными фирмами. В качестве стандартных образцов использовали АСК и СК фирмы "Merck" (Германия), Cat. No. 85.1000 и 821064.025 соответственно.

Для контроля чистоты использовали АСК следующих фирм: 1) "Acetigal" ("Panfarma", Belgrade); 2) "Aspirin" ("Bayer Pharm", Lubliana); 3) "Aspirin" ("Sterling Drugs Inc.", Mexico) – 500 мг АСК каждая; а также 4) "Aspirin" ("3M Laboratories", Malakoff, Cedex) и 5) "Acetisal" ("ICN Galenika", Belgrade) – 300 мг каждая. Таблетки растворяли в этаноле, содержащем 5 % лимонной кислоты, и этот раствор использовали для определения содержания АСК и СК.

### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное хроматографирование в насыщенной камере; время насыщения 1,0 ч при 20 °С.

Неподвижная фаза: высокоэффективные пластинки "Kiesel-gel 60, F<sub>254</sub>", на стеклянной подложке, 10 × 10 см, фирмы "Merck"

(Германия), Art. 5631. Перед экспериментом пластинки промывали метанолом и активировали при 120 °С в течение 30 мин.

Подвижная фаза: циклогексан – пропанол-2 – хлороформ – лед. уксусная кислота (6 + 0,5 + 0,5 + 1, v/v); фронт элюента 7,0 см; время разделения 20 мин; температура 20 °С.

### Визуализация пятен АСК и СК на хроматограммах

Высушенную при 20 °С хроматограмму (15 мин) просматривают под ультрамикроскопом фирмы “UVP” (США) при длине волны 302 нм; наблюдают темные пятна на светло-зеленом фоне.

Величины  $R_f$  АСК и СК составляют 0,59 и 0,61 соответственно.

Пределы обнаружения для АСК и СК составляют 40 и 100 нг в хроматографической зоне соответственно.

### Количественное определение

Денситометр “TLC Scanner 3” фирмы “Camag” (Швейцария); режим работы – отражение; параметры щели 0,4×3,0 мм; длина волны 300 нм. Область линейного сигнала денситометра для АСК – 100–500 нг/пятно и для СК – 200–1400 нг/пятно. На рис. 3.6 представлена денситограмма препарата “Аспирин” (2).

В табл. 3.4 приведены результаты определения содержания АСК и СК в таблетках препаратов-анальгетиков, выпускаемых различными фирмами.

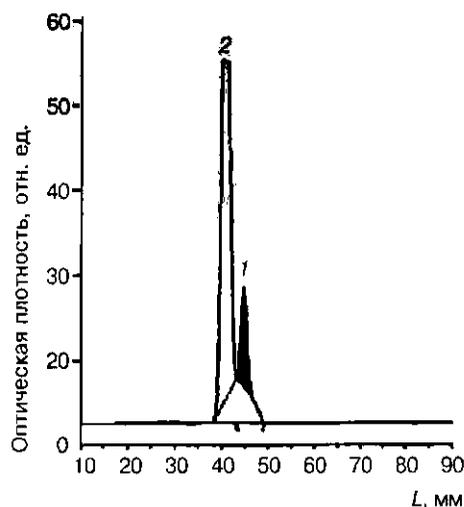


Рис. 3.6. Денситограмма препарата “Аспирин” (2)

Длина волны – 300 нм. По оси абсцисс отложено расстояние от нижнего края хроматограммы, по оси ординат – величина денситометрического сигнала  
1 – салициловая кислота; 2 – ацетилсалициловая кислота

ТАБЛИЦА 3.4

Результаты количественного определения ацетилсалициловой и салициловой кислоты (мг) в таблетках препаратов-анальгетиков [6]

Номер пробы	Ацетилсалициловая кислота		Салициловая кислота	
	масса таблетки, мг	содержание АСК, мг	содержание СК, мг	%*
1	500	485,6±1,5	2,73	0,55
2	500	499,2±0,79	1,17	0,23
3	500	490,7±0,52	1,59	0,32
4	300	305,1±0,90	7,55	2,51
5	300	295,0±1,20	7,25	2,41

$n = 10; P = 0,95$

\* Содержание СК в процентах по отношению к АСК.

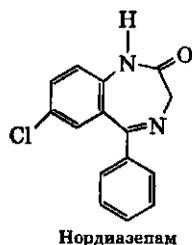
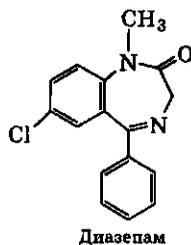
### ЛИТЕРАТУРА

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 1. С. 164–166.
2. *British Pharmacopeia.* HMSO. London, 1993. 366 p.
3. *United States Pharmacopeia.* 22nd Rev. Mack Publishing Co. Easton PA, 1991. 740 p.
4. *Ebel S., Herold G.* // Arch. Pharm. 1975. V. 308. P. 839–843.
5. *Tomankova H., Vasatova M.* // Pharmazie. 1989. V. 44. P. 197–206.
6. *Agbaba D., Zivanov D., Vladimirov S.* // J. Planar Chromatogr. 1995. V. 8. P. 393–395.

### 3.2.2. АНАЛИЗ ДИАЗЕПАМА И НОРДИАЗЕПАМА

Диазепам и нордiazепам являются транквилизаторами бензодиазепинового ряда, нашедшими широкое применение в медицинской практике. Эти препараты снимают эмоциональное напряжение, уменьшают чувство страха, тревоги, беспокойства; оказывают миорелаксантное, противосудорожное и умеренное снотворное действие; усиливают действие снотворных, наркотических, нейролептических и анальгезирующих препаратов [1, 2].

ПХ была использована для количественного определения diaзепам и нордiazепам. В качестве стандартных образцов использовали diaзепам и нордiazепам фирмы “Hoffman – La-Roche” (США). Стандартные растворы были приготовлены в метаноле.



### Условия хроматографирования [3]

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: пластинки "Kieselgel 60, F<sub>254</sub>", 10 × 20 см, Art. 5729, фирмы "Merck" (Германия). Перед экспериментом пластинки промывали смесью этилацетат – хлороформ (25 + 75, v/v), высушивали при комнатной температуре и активировали при 120 °С в течение 15 мин.

Подвижная фаза: этилацетат – хлороформ (25 + 75, v/v), фронт элюента 6,0 см, время разделения 10 мин, температура 22 °С.

### Визуализация пятен диазепама и нордiazепама на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (5 мин, 20 °С) просматривают под ультрафиолетом при длине волны 254 нм и наблюдают темные пятна на светло-зеленом фоне.

Величины  $R_f$  диазепама и нордiazепама составляют 0,79 и 0,62 соответственно.

Предел обнаружения диазепама и нордiazепама составляет 3 нг в хроматографической зоне.

### Количественное определение

Денситометр "TLC Scanner II" фирмы "Camag" (Швейцария); режим работы – отражение; длина волны 265 нм; параметры щели 0,3 × 3,0 мм. Предел количественного определения 10 нг в хроматографической зоне.

На рис. 3.7 представлена денситограмма диазепама и нордiazепама (модельная смесь).

Данная методика после соответствующей пробоподготовки может быть использована для определения содержания диазепама и нордiazепама в лекарственных препаратах, в состав которых входят эти соединения.

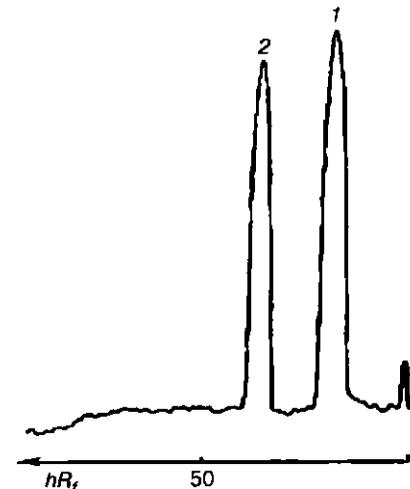


Рис. 3.7. Денситограмма диазепама (1) и нордiazепама (2)

По оси абсцисс отложены значения  $hR_f$ , по оси ординат – величина денситометрического сигнала

### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 1. С. 77–83.
2. Diazepam monograph. The United States Pharmacopoeia. 22nd Rev. The United States Pharmacopoeial Convention. Rockville. MD. USA, 1990. 414 p.
3. Emery M., Kowitko J. // J. Pharm. Sci. 1979. V. 68. P. 1185–1187.

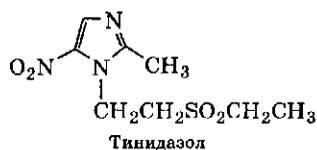
### 3.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИНИДАЗОЛА В КОМБИНИРОВАННОМ ПРЕПАРАТЕ "TINIGYN"

Тинидазол [1-(2-этилсульфонилэтил)-2-метил-5-нитроимидазол] и метронидазол [1-(2-оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол] обладают широким спектром действия в отношении простейших. Эти препараты применяют при трихомонозе у женщин и мужчин, а также при лямблиозе и амебной дизентерии [1, 2]. В состав препарата "Tinigygn" фирмы "Famos Group" (Финляндия) включены как тинидазол, так и метронидазол [3].

ПХ была использована для количественного определения тинидазола в таблетках "Tinigygn".

Для приготовления растворов стандартных образцов использовали субстанции тинидазола и метронидазола фирмы "Famos Group" (Финляндия). Для приготовления испытуемого раствора одну таблетку препарата "Tinigygn" помещали в мерную колбу

вместимостью 100 мл, добавляли 20 мл смеси метанол – вода (1 + 1, v/v) и выдерживали в течение 10 мин в ультразвуковой ванне, затем объем колбы доводили до метки метанолом и тщательно перемешивали.



### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения 1,0 ч при 20 °С.

Неподвижная фаза: пластинки “Kieselgel 60, F<sub>254</sub>”, 10 × 20 см, Art. 5729, фирмы “Merck” (Германия). Пластинки перед анализом были промыты смесью: 5 мл 12,5 %-го водного аммиака + 100 мл метанола, высушены при комнатной температуре и активированы при 120 °С в течение 30 мин.

Подвижная фаза: бутанол-1 – этанол – 12,5 %-й водный аммиак (4 + 1 + 2,2, v/v); фронт элюента 7,0 см; время разделения 1,0 ч; температура 20 °С.

### Визуализация пятен тинидазола и метронидазола на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (30 мин, 20 °С) просматривают под ультрамикроскопом при длине волны 254 нм; наблюдают темные пятна на светло-зеленом фоне. Величины  $R_f$  тинидазола и метронидазола составляют 0,83 и 0,38 соответственно. Предел обнаружения каждого препарата – 0,5 мкг на хроматографическую зону.

### Количественное определение

Денситометр “TLC Scanner II” фирмы “Camag” (Швейцария); режим работы – отражение; длина волны 293 нм; предел детектирования 1,0 мкг на хроматографическую зону; параметры щели 0,3 × 3,0 мм. Область линейного сигнала денситометра 1,0–10,0 мкг на хроматографическую зону для каждого препарата.

На рис. 3.8 представлена денситограмма модельной смеси стандартов тинидазола и метронидазола.

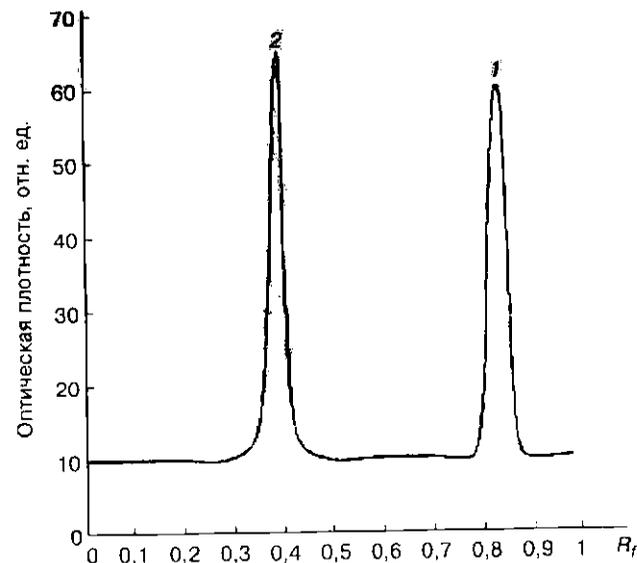


Рис. 3.8. Денситограмма тинидазола (1) и метронидазола (2). Модельная смесь

По оси абсцисс отложены значения  $R_f$ , по оси ординат – величина денситометрического сигнала

Ниже приведены результаты определения содержания тинидазола в препарате “Tinigy”:

Тинидазол, мг	Денситометрический сигнал, отн. ед.	Тинидазол, мг	Денситометрический сигнал, отн. ед.
1,00	26,96	2,00	48,20
1,00	27,20	2,25	51,89
1,25	31,03	2,25	52,30
1,25	31,09	2,50	56,63
1,50	35,63	2,50	58,91
1,50	36,67	2,75	62,90
1,75	40,61	2,75	63,20
1,75	41,38	3,00	64,98
2,00	47,73	3,00	65,45

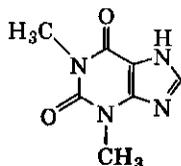
Коэффициент корреляции $r$	0,9979
Коэффициент вариации, %	±2,4
Испытуемый раствор (препарат “Tinigy”, по результатам пяти измерений), денситометрический сигнал, отн. ед.	58,22
Коэффициент вариации, %	±2,7
Содержание тинидазола в препарате “Tinigy”, мг/таблетка	250

## ЛИТЕРАТУРА

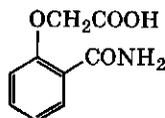
1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 2. С. 347.
2. The United State Pharmacopeia. USP 23, 1995.
3. *De Silva J. A., Munno N.* // J. Pharm Sci. 1980. V. 69. P. 201–210.

## 3.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕОФИЛЛИНА В АНТИАСТМАТИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ "SOLOSIN"

Теofilлин – алкалоид, содержится в листьях чая и кофе; в настоящее время получают синтетическим путем. Теофиллин влияет на различные функции организма. Он оказывает стимулирующее действие на ЦНС, усиливает сократительную деятельность миокарда, расширяет периферические, коронарные и почечные сосуды. Особенно важной функцией является способность теофиллина оказывать бронхорасширяющий эффект. Теофиллин в чистом виде применяют как бронхолитическое средство, снимающее бронхоспазм [1]. Теофиллин мало растворим в воде (1 : 180), поэтому для увеличения растворимости используют *o*-карбамилфеноксисукусную кислоту, которую вводят в раствор лекарственных препаратов в качестве солюбилизатора [2]:



Теофиллин

*o*-Карбамилфеноксисукусная кислота

ПХ была использована для аналитического контроля содержания теофиллина в препарате "Solosin" (капли) фирмы "Hoffman – La Roche" (США). В качестве стандартных образцов использовали: теофиллин фирмы "Aldrich", No. 26, 140-8 (США), *o*-карбамилфеноксисукусную кислоту и "Solosin" фирмы "Casella-Riedel Pharma" (Италия).

Для приготовления испытуемого раствора образца 50 мкл препарата "Solosin" помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в смеси этанол – вода (90 + 10, *v/v*), доводили объем до метки, тщательно перемешивали.

## Условия хроматографирования [3]

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: высокоэффективные ТСХ-пластинки НРТLC NH<sub>2</sub> F<sub>254</sub>, фирмы "Merck", Art. 5647 (Германия), 10×10 см.

Подвижная фаза: этиловый спирт – 5 %-й водный раствор диэтиламина (95 + 5, *v/v*); фронт элюента 6,0 см; время разделения 15 мин; температура 22 °С.

Визуализация пятен теофиллина и *o*-карбамилфеноксисукусной кислоты на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (10 мин, 20 °С) просматривают под ультрафиолетом, длина волны 254 нм, и наблюдают темные пятна на белом фоне.

Величины *R<sub>f</sub>* теофиллина и *o*-карбамилфеноксисукусной кислоты составляют 0,46 и 0,38 соответственно.

Предел обнаружения теофиллина и *o*-карбамилфеноксисукусной кислоты составляет 4,0 нг в хроматографической зоне.

## Количественное определение

Денситометр "Desaga", модель 60 фирмы "Desaga" (Германия); режим работы – отражение; длина волны 275 нм; параметры щели 0,1×2,1 мм. Предел детектирования теофиллина 10 нг

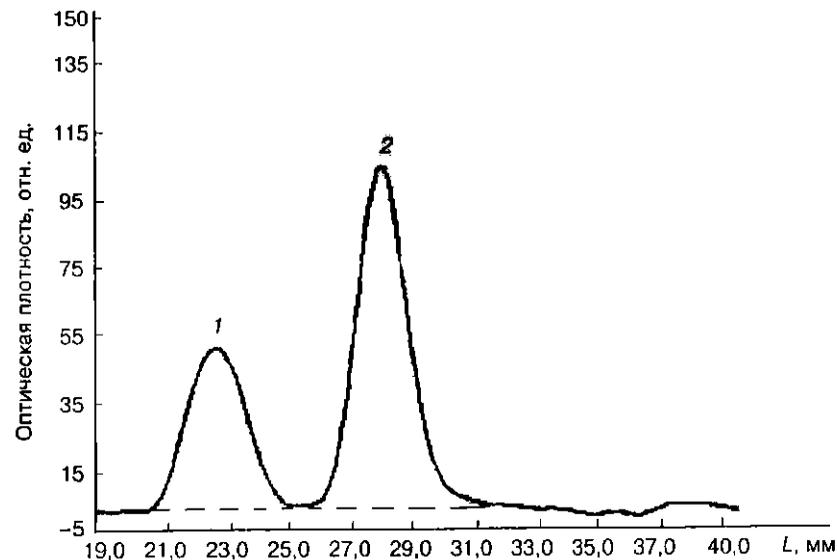


Рис. 3.9. Денситограмма препарата "Solosin":

1 – *o*-карбамилфеноксисукусная кислота; 2 – теофиллин  
По оси абсцисс отложено расстояние от нижнего края хроматограммы, по оси ординат – величина денситометрического сигнала

в хроматографической зоне. На рис. 3.9 представлена денситограмма препарата "Solosin".

Ниже приведены результаты определения содержания теофиллина в каплях "Solosin".

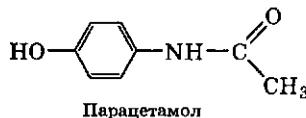
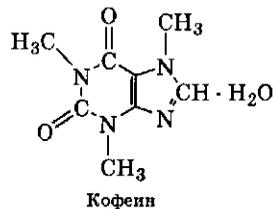
Теофиллин, нг	Денситометрический сигнал, отн. ед.		
20	44,44	Коэффициент корреляции $r$	0,9991
20	46,98	Относительное стандартное отклонение	$\pm 1,73$
30	66,77		
30	66,72	Испытуемый раствор (капли "Solosin", по результатам трех измерений), денситометрический сигнал, отн. ед.	103,99
40	84,08		
40	82,58		
50	104,34	Коэффициент вариации, %	$\pm 3,2$
50	103,79	Содержание теофиллина в испытуемом растворе, нг/мкл	50,99
60	119,60		
60	121,93		
70	140,21		
70	138,40		

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 1. С. 401–407.
2. *Wagner J.* Dunnschicht-Chromatographische Bestimmung von Theophyllin. Saarbrücken: Universität des Saarlandes, 1994. 155 s.
3. *Weins C., Jork H.* Thin-Layer Chromatography. Heidelberg: Desaga Offprint, 1994. 40 p.

#### 3.2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА В КОМБИНИРОВАННОМ ПРЕПАРАТЕ "TYLEMIN" С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАСТИНОК С УЛЬТРАТОНКИМ МОНОЛИТНЫМ СЛОЕМ СИЛИКАГЕЛЯ

Кофеин (1,3,7-метилксантин) и парацетамол (4-ацетиламинофенол) входят в состав комбинированного препарата "Tylemin".



Кофеин оказывает стимулирующее влияние на функции головного мозга и активирует психическую и физическую дея-

тельность организма, повышает выносливость к физической работе. Парацетамол обладает жаропонижающим и болеутоляющим действием [1]. Содержание кофеина в комбинированном препарате "Tylemin" фирмы "ICN Biomedical" (Великобритания) составляет 22 мг/таблетка [2].

ПХ на ультратонких слоях силикагеля (УТСХ), имеющих монокристаллическую структуру, была использована для количественного определения кофеина в препарате "Tylemin".

Хроматографические пластинки на основе ультратонкого слоя силикагеля с монокристаллической структурой были выпущены в 2001 г. фирмой "Merck" (Германия) [3].

Эти пластинки также были использованы для разделения и количественного определения некоторых красителей, стероидов, аминокислот и пестицидов [4, 5].

Физические характеристики пластинок на основе ультратонких слоев силикагеля, имеющего монокристаллическую структуру, и сравнение этих пластинок с выпускаемыми в настоящее время пластинками для планарной хроматографии представлены в главе 1, с. 15–16.

Для приготовления стандартных растворов кофеина и парацетамола использовали субстанции этих препаратов фирмы "ICN Biochemical" (Великобритания). Для приготовления раствора одну таблетку препарата "Tylemin" помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, добавляли 200 мл метанола и выдерживали в течение 20 мин на ультразвуковой бане, затем объем колбы доводили до метки метанолом и тщательно перемешивали. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводили до метки и тщательно перемешивали.

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения 10 мин при 25 °С.

Неподвижная фаза: ультратонкие ТСХ-пластинки на основе силикагеля с монокристаллической структурой фирмы "Merck" (Германия) на стеклянной подложке, 60 × 36 мм, Art. 1.05007.

Подвижная фаза: этилацетат – метанол (9,9 + 0,1, v/v); фронт элюента 15 мм; время разделения 2 мин 30 с; температура 25 °С.

#### Количественное определение

Денситометр "TLC Scanner II" фирмы "Camag" (Швейцария); режим работы – отражение; длина волны – 215 нм; предел детектирования 10 нг на хроматографическую зону; параметры щели



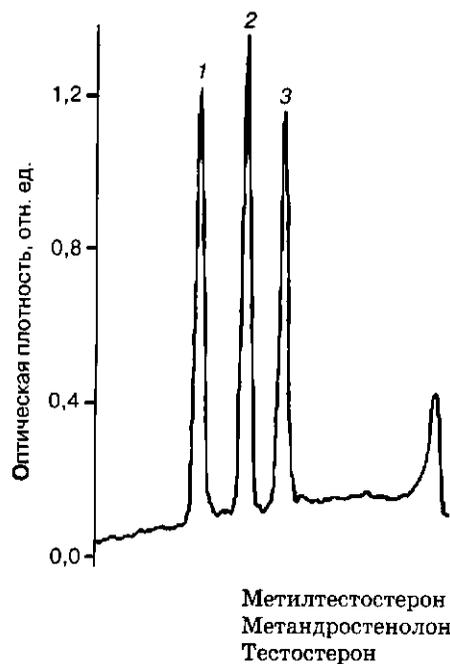


Рис. 3.11. Денситограмма андрогенов:

1 – метилтестостерон; 2 – метандростенолон; 3 – тестостерон

По оси абсцисс отложено расстояние от нижнего края хроматограммы, по оси ординат – величина денситометрического сигнала

### Визуализация андрогенов на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (20 мин, 20 °С) просматривают под ультрафиолетом, длина волны 254 нм; наблюдают темно-синие пятна на светло-голубом фоне.

Предел детектирования 0,3 мкг/ пятно.

Величины  $R_f$  андрогенов:

Метилтестостерон	0,31
Метандростенолон	0,44
Тестостерон	0,55

### Количественное определение

Денситометр “Шимадзу”, модель CS-9000, фирма “Shimadzu” (Япония); режим работы – отражение; двуволновая схема сканирования,  $\lambda_1 = 254$  нм,  $\lambda_2 = 370$  нм; параметры щели 0,4×0,4 мм. Предел детектирования 0,55 мкг/пятно. Область линейного сигнала денситометра 0,55–3,5 мкг/пятно.

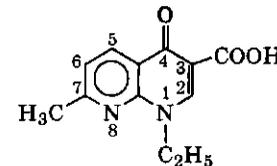
На рис. 3.11 представлена денситограмма метилтестостерона, метандростенолона и тестостерона.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Штрауб Ф. В. Биохимия. Будапешт: Изд. АН Венгрии, 1965. 772 с.
2. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 2. С. 54–58.
3. Кочетков Н. К., Торгов И. В., Ботвинник М. М. Химия природных соединений. М.: Изд. АН СССР, 1961. 559 с.
4. Hartmann F., Liner W. R. // Res. Exp. Med. 1973. V. 161. P. 165–171.
5. Hartman F., Jenzen F. // Mol. Klin. 1974. V. 69. P. 102–109.
6. Hoebus J., Daneels E., Roets E. // J. Planar Chromatogr. 1993. V. 6. P. 269–273.

### 3.2.7. ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ НАЛИДИКСОВОЙ КИСЛОТЫ

Налидиксовая кислота (1-этил-7-метил-1,8-нафтиридин-3-карбоновая кислота) является синтетическим антибактериальным препаратом [1–3].



Налидиксовая кислота

Этот препарат эффективен при инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями. Действует бактериостатически и бактерицидно, эффективен в отношении микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам и сульфаниламидам.

Применяют главным образом при инфекционных заболеваниях почек и мочевыводящих путей, вызванных чувствительными к препарату микроорганизмами; препарат наиболее эффективен при острых инфекциях [1]. Налидиксовая кислота разлагается при воздействии света, механизм и конечные продукты распада в настоящее время неизвестны [4].

ПХ была использована для изучения фотохимического разложения налидиксовой кислоты.

В качестве стандартного образца использовали налидиксовую кислоту фирмы “Sigma”, Cat. № 4382 (США), а в качестве исследуемого образца – таблетки “Negram”, содержащие 1,0 г налидиксовой кислоты фирмы “Winthrop Laboratores” (Франция). Таблетки измельчали, суспендировали в хлороформе, суспензию выдерживали в ультразвуковой бане и фильтровали. Аликвоты фильтрата выдерживали над ртутной лампой высокого давления в течение 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 10 и 15 ч при температуре 40 °С, затем использовали для работы [5].

### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: пластинки “Kieselgel 60, F<sub>254</sub>”, 10 × 20 см, Art. 5729, фирмы “Merck” (Германия). Перед анализом пластинки дважды промывали метанолом и высушивали при комнатной температуре.

Подвижная фаза: 10 %-й водный аммиак – хлороформ – этанол (1,5 + 3,0 + 5,3, v/v); фронт элюента 7,0 см; время разделения 20 мин; температура 20 °С.

### Визуализация пятен налидиксовой кислоты на хроматограммах

Высушенную хроматограмму просматривают под ультрафиолетом при длине волны 254 нм, наблюдают темные пятна на светло-зеленом фоне. Предел обнаружения 10 нг в хроматографической зоне. На рис. 3.12 представлена хроматограмма налидиксовой кислоты, растворы которой были подвергнуты облучению. Из рисунка видно, что облучение раствора налидиксовой кислоты в течение 6 ч и более приводит к ее распаду.

### Количественное определение

Денситометр "TLC Scanner II" фирмы "Camag" (Швейцария); режим работы – отражение; длина волны 257 нм; параметры щели 0,4×4,0 мм. Предел детектирования 15 нг в хроматографической зоне.

В табл. 3.5 представлены результаты фотохимического разложения раствора налидиксовой кислоты в зависимости от времени при 40 °С.

ТАБЛИЦА 3.5

Зависимость содержания налидиксовой кислоты (%) от времени при облучении раствора ртутной лампой высокого давления при температуре 40 °С

Номер пробы	Время облучения, ч	Содержание налидиксовой кислоты, %	Номер пробы	Время облучения, ч	Содержание налидиксовой кислоты, %
1	0	100,00	5	4	24,00
2	1	84,00	6	5	17,00
3	2	69,00	7	6	Менее 1,0
4	3	49,00			

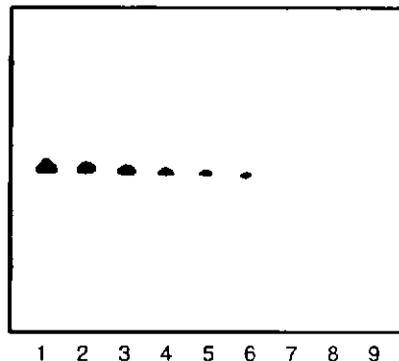


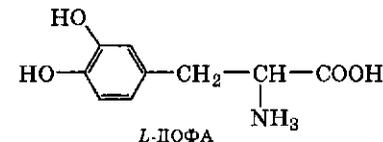
Рис. 3.12. Хроматограмма фотохимического разложения раствора налидиксовой кислоты; 70 нг в начальной хроматографической зоне  
Время облучения, ч: 1 – 0; 2 – 1,0; 3 – 2,0; 4 – 3,0; 5 – 4,0; 6 – 5,0; 7 – 6,0; 8 – 10; 9 – 15

### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 2. С. 293.
2. Leshner G. Y., Froelich E. J., Gruett M. D. // J. Med. Pharm. Chem. 1962. V. 5. P. 1063–1065.
3. Leshner G. Y., Froelich E. J., Crain V. R. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1964. V. 6. P. 292–309.
4. Fernandez E., Cardanas A. M. // J. Photochem. Photobiol. 1990. V. 4. P. 329–333.
5. Haundt H. K., Barlow E. C. // J. Chromatogr. 1981. V. 223. P. 165–172.

### 3.2.8. КОНТРОЛЬ ЧИСТОТЫ L-ДОФА

L-ДОФА (L-3,4-дигидроксифенилаланин), а также его производные используются для лечения болезни Паркинсона [1].



Согласно требованиям Европейской фармакопеи 2000 г. препарат как стереоизомер может содержать примесь оптических изомеров L и D. D-ДОФА может находиться в количествах, не превышающих 0,25 %, поскольку D-ДОФА токсичен [2].

ПХ была использована для аналитического контроля оптической чистоты препарата L-ДОФА с помощью модельных смесей.

Образцы L-ДОФА, D-ДОФА и DL-ДОФА – фирмы "Sigma", Cat. No. 9040 (США).

### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: ТСХ-пластинки "Chiralplate", Cat. No. 809047, фирмы "Macherey-Nagel" (Германия).

Подвижная фаза: метанол – вода – ацетонитрил (50 + 50 + 30, v/v); фронт элюента 9,0 см; время разделения 50 мин; температура 22 °С [3].

### Визуализация пятен L-ДОФА и D-ДОФА на хроматограммах

Хроматограмму высушивают при комнатной температуре в течение 30 мин и опрыскивают раствором нингидринового реагента (100 мг нингидрина + 100 мл бутанола-1), высушивают

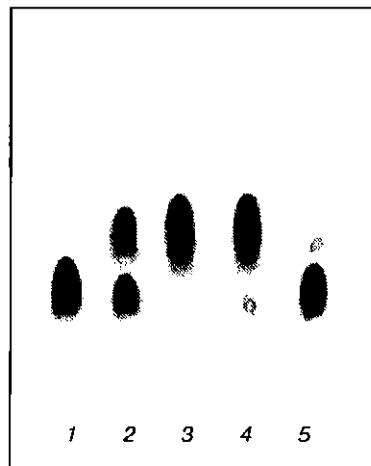


Рис. 3.13. Хроматограмма разделения энантиомерных форм ДОФА:  
1 - *L*-ДОФА; 2 - *D*, *L*-ДОФА; 3 - *D*-ДОФА; 4 - примесь *L*-ДОФА (3 %) в *D*-ДОФА;  
5 - примесь *D*-ДОФА (3 %) в *L*-ДОФА

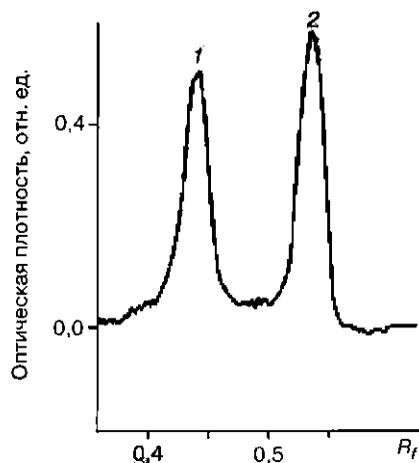


Рис. 3.14. Денситограмма *L*-ДОФА (1) и *D*-ДОФА (2). Модельная смесь  
По оси абсцисс отложены значения  $R_f$ , по оси ординат – величина денситометрического сигнала

при комнатной температуре (30 мин), затем выдерживают 10 мин при 85 °С, после чего наблюдают малиновые пятна *L*-ДОФА, *D*-ДОФА на белом фоне (рис. 3.13). Предел обнаружения *L*-ДОФА – 0,05 мкг/пятно.

### Количественное определение

Денситометр “TLC Scanner II” фирмы “Camag” (Швейцария); режим работы – отражение; параметры щели 0,4×5,0 мм; длина волны 535 нм. Область линейного сигнала денситометра 0,1–2,0 мкг/пятно.

На рис. 3.14 представлена денситограмма *L*-ДОФА и *D*-ДОФА [3].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 1. С. 140–142.
2. European Pharmacopoea. Supplement, 2000.
3. Gunther K., Martens J., Shickendanz M. // Z. anal. Chem. 1985. Bd. 322. S. 513–524.

### 3.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

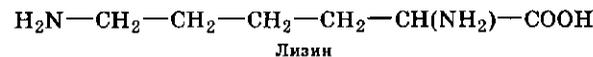
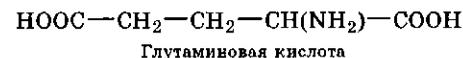
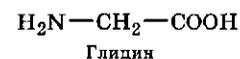
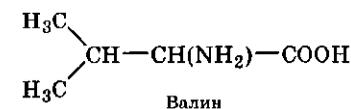
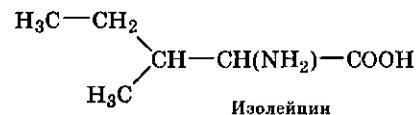
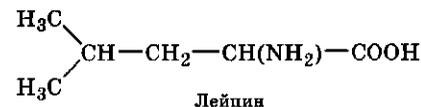
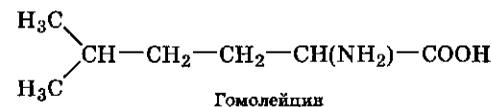
#### 3.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ *L*-ГОМОЛЕЙЦИНА – АМИНОКИСЛОТЫ НЕБЕЛКОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА *L*-ЛЕЙЦИНА

В настоящее время микробиологический синтез является единственным методом получения незаменимых аминокислот, антибиотиков, некоторых витаминов и ряда других физиологически активных соединений [1, 2].

*L*-Аминокислоты используются в качестве лекарственных средств, сырья для получения лекарственных препаратов, их смеси применяются для обеспечения белкового питания организма (парентеральное питание) [3], а также входят в состав пищевых и кормовых добавок.

Незаменимая аминокислота *L*-лейцин входит в состав ряда препаратов для парентерального питания [3].

Согласно данным, полученным на аминокислотном анализаторе, используемые в настоящее время промышленные штаммы-продуценты лейцина помимо целевого продукта способны синтезировать *L*-лизин, глицин, *L*-аланин, *L*-глутаминовую кислоту, *L*-валин, *L*-изолейцин и *L*-гомолейцин:



*L*-Гомолейцин – аминокислота небелкового происхождения, она синтезируется рекомбинантными штаммами-продуцентами лейцина и валина из-за возникающего дисбаланса в работе ферментных систем (синтазы и трансминазы) клетки [2, 4].

Примесь *L*-гомолейцина при биосинтезе *L*-лейцина крайне нежелательна, поскольку в процессе выделения *L*-гомолейцин сокристаллизуется с целевым продуктом, что существенно осложняет его очистку. В этой связи НТД на препарат “*L*-лейцин кристаллический” (квалификации “х. ч.”) допускает содержание *L*-гомолейцина менее 0,1 % по отношению к целевому продукту [5]. При столь малом содержании примеси, причем близкой по свойствам к целевому продукту, методы анализа, включающие предварительную пробоподготовку, как правило, приводят к занижению результатов анализа.

ПХ была использована для количественного определения *L*-лейцина, *L*-гомолейцина и других аминокислот-примесей в культуральных жидкостях (КЖ) промышленного штамма-продуцента *L*-лейцина.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) был использован в качестве референсного [6].

Для приготовления стандартных образцов аминокислот использовали набор аминокислот фирмы “Sigma” Cat. No. L-AA-21 (США). *L*-Гомолейцин – лабораторный препарат; чистота препарата 98 %. Пробы КЖ разбавляли 30 %-м водным этанолом, центрифугировали, и полученный супернатант использовали для работы.

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное, бинарное элюирование ( $l_1 = 7,5$  см,  $l_2 = 8,5$  см) в насыщенной камере; время насыщения 1,0 ч при 20 °С.

Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки “Сорбфил” ПТСХ-П-В, 10×15 см (Россия). Процедура промывания и активирования пластинок описана в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: пропанол-2 – этилацетат – 25 %-й-водный аммиак – вода (30 + 10 + 3,5 + 10,  $v/v$ ); фронт элюента  $l_1 = 7,5$  см; время разделения 35 мин. Далее хроматограмму высушивают в течение 15 мин при 20 °С, выдерживают при 110 °С (30 мин), охлаждают до комнатной температуры и повторно элюируют в этой же подвижной фазе; фронт элюента  $l_2 = 8,5$  см, время разделения 45–50 мин.

#### Визуализация пятен аминокислот на хроматограммах

Высушенную при 20 °С хроматограмму (~20 мин) выдерживают при 110 °С в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры и погружают в кювету с раствором нингидринового реактива

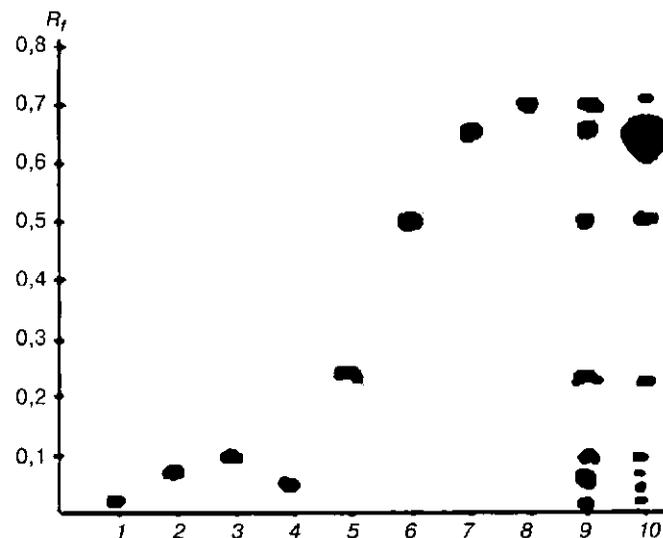


Рис. 3.15. Хроматографическое разделение аминокислот:

1 – лизин; 2 – глицин; 3 – аланин; 4 – глутаминовая кислота; 5 – треонин; 6 – валин; 7 – лейцин и изолейцин; 8 – гомолейцин; 9 – смесь аминокислот 1–8; 10 – КЖ штамма-продуцента лейцина

(0,3 г нингидрина + 97 мл ацетона + 3,0 мл лед. уксусной кислоты) на 20 с, высушивают при 20 °С в течение 5 мин, затем выдерживают 30 мин при 65 °С. Наблюдают малиновые пятна аминокислот *L*-лейцина и *L*-гомолейцина на белом фоне (рис. 3.15). Предел обнаружения 0,02 мкг/пятно.

#### Определение аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [6]

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии был использован в качестве метода сравнения [6].

Для анализа использовали жидкостной хроматограф “Delta Prep 3000”, снабженный спектрофотометрическим детектором “Lambda Max 481”, с колонкой из нержавеющей стали 4,6×250 мм, заполненной сорбентом “ $\mu$ -Bondapak C18” (5,0 мкм) и инжектором “Rheodyne-7125” с дозирующей петлей объемом 10,0 мкл, фирма “Waters” (США). Пробы вводили микрошприцем объемом 50,0 мкл, фирма “Hamilton” (США).

В качестве подвижной фазы использовали раствор 20 %-го водного ацетонитрила, содержащего  $10^{-3}$  М сульфата меди(II).

Скорость потока элюента – 0,5 мл/мин. Детектирование осуществляли по поглощению при длине волны 240 нм. Время разделения одной пробы составляло 10–15 мин. Время промывания колонки элюентом – 15 мин.

Обработку данных проводили с помощью системы на базе персонального IBM-совместимого компьютера с интерфейсной платой и программным обеспечением НТК “Амперсид” (Москва).

### Количественное определение [7–10]

Видеоденситометр “ДенСкан-04” (НТЦ “Ленхром”, Россия). Область линейного сигнала денситометра – 0,04–0,3 мкг *L*-лейцина и *L*-гомолейцина в пятне. Результаты количественного определения *L*-лейцина и *L*-гомолейцина в образцах КЖ и метрологические характеристики методики представлены в табл. 3.6. В этой же таблице приведены данные, полученные методом ВЭЖХ.

ТАБЛИЦА 3.6

Определение содержания *L*-лейцина и *L*-гомолейцина в различных партиях КЖ методами хроматоденситометрии (ДенСкан-04) и ВЭЖХ (только гоомолейцина)

Анализируемая проба КЖ	Содержание лейцина, г/л			Содержание гоомолейцина, мг/л			
	Хроматоденситометрический метод			Хроматоденситометрический метод			Метод ВЭЖХ
	<i>x</i>	$\pm \rho x$	$\epsilon, \%$	<i>x</i>	$\pm \rho x$	$\epsilon, \%$	
1	12,6	0,31	2,5	2,7	0,11	3,9	2,6
2	15,2	0,29	1,9	2,0	0,09	4,6	2,4
3	11,4	0,35	3,1	1,0	0,03	2,9	1,1
4	20,3	0,37	1,8	1,3	0,025	1,9	1,5
5	13,4	0,31	1,6	2,2	0,06	2,7	2,0
6	18,1	0,43	2,4	2,9	0,07	2,3	3,1
7	13,2	0,26	2,0	3,3	0,1	2,9	3,3
	$n = 5; P = 0,95$			$n = 9; P = 0,95$ $r = 0,9854$ $y = 0,79x + 0,09$			

Из таблицы видно, что результаты характеризуются коэффициентом вариации меньше 5 %, а данные по содержанию гоомолейцина в КЖ, полученные методами ПХ и ВЭЖХ, хорошо коррелируют друг с другом,  $r = 0,9854$ .

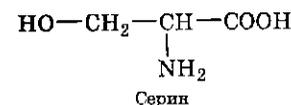
На данном примере с помощью метода ПХ показана возможность определения примесей в сложных смесях, когда содержание примесь/целевой продукт составляет 1/1000 и менее, достоверно, быстро и с приемлемой точностью.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Дебабов В. Г. Биотехнология. М.: Наука, 1994. 425 с.
2. Попова Т. Е. Развитие биотехнологии в СССР. М.: Наука, 1989. 219 с.
3. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 2. С. 124–129.
4. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974. 941 с.
5. ГОСТ 14–7290. Лейцин кристаллический “х. ч.”
6. Буриков Э. А., Гусятинер М. М., Кузнецов Э. В., Тарасов А. П., Тяглов Б. В., Дегтерев Е. В., Малахова И. И., Красиков В. Д. // Биотехнология. 1996. № 9. С. 50–56.
7. Красиков В. Д., Дегтерев Е. В., Малахова И. И., Тяглов Б. В. // Материалы Всероссийского симпозиума “Хроматография и хроматографические приборы”. Москва, 2004. 296 с.
8. Малахова И. И. Количественная высокоэффективная тонкослойная хроматография аминокислот: Дисс. ... канд. хим. наук. СПб, 2003. 165 с.
9. Krasikov V. D., Malakhova I. I., Degterev E. V., Tyaglov B. V. // J. Planar Chromatogr. 2004. V. 17. P. 113–121.
10. 100 лет хроматографии / Под ред. Б. А. Руденко. М.: Наука, 2003. С. 233–268.

### 3.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ *L*-СЕРИНА В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ

Известно, что аминокислота *L*-серин (SER) входит в состав препаратов для парентерального питания, компонентами которых являются незаменимые *L*-аминокислоты, полученные с помощью микробиологического синтеза [1]. Культуральная жидкость (КЖ) штамма-продуцента SER содержит также глицин, *L*-пролин, *L*-лизин, *L*-аланин, *L*-треонин, *L*-глутаминовую и  $\gamma$ -аминомасляную кислоту (редко), поэтому основная проблема количественного анализа SER при контроле производства – его отделение от перечисленных аминокислот-примесей. Была использована ПХ для количественного определения SER и сопутствующих ему в КЖ аминокислот.

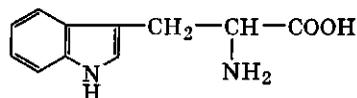




3. Degterev E. V., Tyaglov B. V., Malakhova I. I., Krasikov V. D. // Proceedings of International Symposium on Planar Separations "Planar Chromatography 2002". May 11–13 2002. Heviz, Hungary, 2002. P. 157–204.
4. Малахова И. И. Количественная высокоэффективная тонкослойная хроматография аминокислот: Дисс. ... канд. хим. наук. СПб, 2003. 165 с.
5. Krasikov V. D., Malakhova I. I., Degterev E. V., Tyaglov B. V. // J. Planar Chromatogr. 2004. V. 17. P. 113–121.
6. 100 лет хроматографии / Под ред. Б. А. Руденко. М.: Наука, 2003. С. 233–268.

### 3.3.3. АНАЛИЗ L-ТРИПТОФАНА, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

Незаменимая аминокислота L-триптофан (TRP) используется в медицинской практике в составе ряда лекарственных препаратов [1]. Культуральная жидкость (КЖ) штамма-продуцента триптофана содержит также L-фенилаланин, L-тирозин, L-лейцин, L-изолейцин, L-треонин, L-валин, L-гистидин, L-серин, L-лизин, L-глутаминовую кислоту и L-аспарагин.



L-Триптофан

Для количественного определения TRP была использована ПХ с применением модифицированного реактива Эрлиха для визуализации пятен целевого продукта [2–4]. Реактив Эрлиха имеет высокую избирательность по отношению к соединениям, содержащим индольный цикл [5].

Стандартные растворы TRP приготавливали из L-триптофана; набор L-аминокислот фирмы "Sigma" Cat. No. L-AA-21 (США). Пробы КЖ разбавляли 30 %-м водным этанолом, центрифугировали, и полученный супернатант использовали для работы.

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения 1,0 ч при 20 °С.

Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки "Сорбфил", ПТСХ-П-В, 10×15 см (Россия). Процедура промывания и активирования пластинок описана в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: пропанол-2 – 25 %-й водный аммиак (7 + 3, v/v); фронт элюента 7,5 см; время разделения 55–60 мин; температура 20 °С.

#### Визуализация пятен триптофана на хроматограммах

Высушенную при 20 °С хроматограмму (~20–25 мин) выдерживают при 110 °С в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры и погружают в кювету с бутанолом-1 на 5 с для предотвращения размывания пятен при проведении следующей операции [6]. Хроматограмму 20 мин высушивают при комнатной температуре, затем 10 мин при температуре 120 °С, охлаждают до комнатной температуры и погружают в кювету с раствором модифицированного реактива Эрлиха (0,5 г 4-диметиламинобензальдегида + 95 мл 95 %-го этанола + 5 мл конц. серной кислоты) на 45–50 с, высушивают при комнатной температуре (15 мин) и выдерживают в течение 10 мин при температуре 110 °С. Наблюдают темно-синие пятна на сером фоне. Предел обнаружения 0,05 мкг.

#### Количественное определение

Видеоденситометр "ДенСкан-1" (НТЦ "Ленхром", Россия), область линейного сигнала денситометра находится в пределах 0,1–1,0 мкг. Результаты количественного определения TRP в образцах КЖ и метрологические характеристики методики представлены в табл. 3.8.

ТАБЛИЦА 3.8

Результаты количественного определения L-триптофана (мг/мл) в образцах КЖ и метрологические характеристики методики [7–9]

Номер пробы	x	±рх	ε, %	Номер пробы	x	±рх	ε, %
1	9,8	0,34	3,5	3	13,6	0,37	2,7
2	11,4	0,38	3,3	4	5,6	0,17	3,0

n = 3; P = 0,95

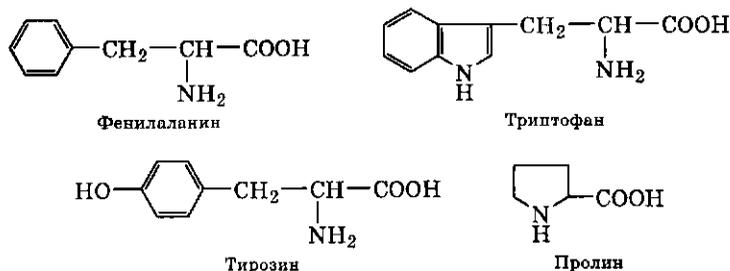
#### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 2. С. 124–129.
2. Дегтерев Е. В., Дегтярь В. Г., Вайсбург А. Ф., Тарасов А. П., Тяглов В. В., Малахова И. И., Красиков В. Д. // Хим-фарм. журн. 1994. № 8–9. С. 52–55.

3. Malakhova I. I., Tyaglov B. V., Degterev E. V., Krasikov V. D., Degtiar W. G. // J. Planar Chromatogr. 1996. V. 9. P. 375–378.
4. Degterev E. V., Degtiar W. G., Tyaglov B. V., Tarasov A. P., Krylov V. M., Malakhova I. I., Krasikov V. D. // J. Planar Chromatogr. 2000. V. 13. P. 191–194.
5. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Штала. М.: Мир, 1965. 508 с.
6. Karischaka M. Mikrochim. Acta. 1963. P. 157–169.
7. Малахова И. И. Количественная высокоэффективная тонкослойная хроматография аминокислот: Дисс. ... канд. хим. наук. СПб, 2003. 165 с.
8. Krasikov V. D., Malakhova I. I., Degterev E. V., Tyaglov B. V. // J. Planar Chromatogr. 2004. V. 17. P. 113–121.
9. 100 лет хроматографии / Под ред. Б. А. Руденко. М.: Наука, 2003. С. 233–268.

### 3.3.4. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Одной из проблем современной медицины является экспресс-диагностика наследственных дефектов обмена у человека. Так, ряд аминокислот может быть диагностирован по наличию в плазме крови избыточного содержания некоторых аминокислот.



Ранее диагностику фенилкетонурии и других аминокислотных нарушений осуществляли методом двумерной хроматографии на пластинках фирмы “Merck” (Германия) на основе целлюлозы; продолжительность таких анализов составляла более 6 ч, а их стоимость была крайне высокой [1]. Разработана методика разделения 20 аминокислот на отечественных ВЭТСХ-пластинках “Сорбфил” [2, 3].

Для приготовления стандартных растворов *L*-аминокислот использовали *L*-аминокислоты из набора фирмы “Sigma”, Cat. No. LAA-21 (США). В качестве объектов анализа использовали пробы плазмы крови и мочи пациента.

### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное, бинарное элюирование ( $l_1 = 7,5$  см,  $l_2 = 8,5$  см) в насыщенной камере; время насыщения 30 мин при 20 °С.

Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки “Сорбфил”, ПТСХ-П-В, 10×15 см (Россия). Процедура промывания и активирования пластинок описана в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: хлороформ – 95 %-й этанол – лед. уксусная кислота – вода [(23,0–27,0) + (13,5–16,0) + (4,0–6,5) + (1,3–1,5),  $v/v$ ]; фронт элюента  $l_1 = 7,5$  см; время разделения 25 мин. Далее хроматограмму высушивают в течение 10 мин при 20 °С и выдерживают при 120 °С (30 мин), охлаждают до комнатной температуры, затем повторно элюируют в этой же подвижной фазе; фронт элюента  $l_2 = 8,5$  см; время разделения 35 мин; температура 20–22 °С [4–7].

### Визуализация пятен аминокислот на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (10 мин, 20 °С) погружают в кювету с раствором нингидринового реактива (0,3 г нингидрина + 97 мл ацетона + 3,0 мл лед. уксусной кислоты) на 20 с, высушивают в течение 5 мин, затем выдерживают 30 мин при 65 °С, после чего наблюдают малиновые пятна аминокислот (кроме пролина) на белом фоне.

### Интерпретация результатов

При диагностике фенилкетонурии предел обнаружения *L*-фенилаланина 0,05 мкг/пятно.

Интерпретацию результатов разделения аминокислот биологических жидкостей пациентов проводили сравнением либо с хроматограммами стандартной смеси аминокислот, либо с хроматограммой, полученной анализом биожидкостей здорового человека (рис. 3.17).

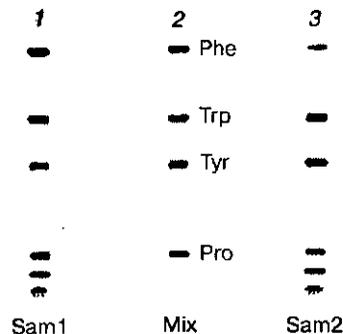


Рис. 3.17. Хроматограмма образцов плазмы крови человека, больного фенилкетонурией, и здорового человека:

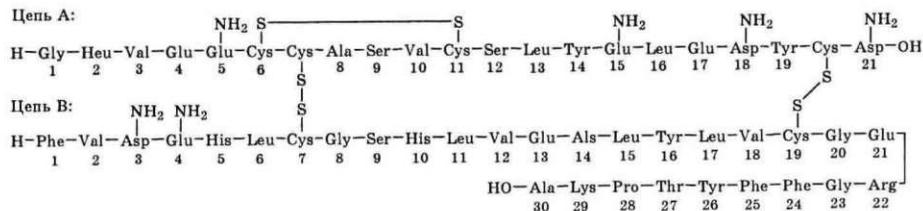
1 – образец плазмы крови человека, больного фенилкетонурией (Sam 1); 2 – смесь аминокислот (Mix): *L*-фенилаланина (Phe), *L*-триптофана (Trp), *L*-тирозина (Tyr) и *L*-пролина (Pro); 3 – образец плазмы крови здорового человека (Sam 2)

## ЛИТЕРАТУРА

1. Краснопольская К. Д., Цукерман Г. Л. Методические рекомендации по выявлению наследственных дефектов обмена. М.: Медицина, 1990. С. 14–21.
2. Малахова И. И., Красиков В. Д., Тяглов В. В., Дегтерев Е. В., Помозанов В. В. Способ разделения аминокислот в биологических жидкостях. Патент № 2095808 РФ с приоритетом от 27.07.1994.
3. Malakhova I. I., Tyaglov V. V., Degterev E. V., Krasikov V. D. // Proceedings of 8th International Planar Chromatography, 5–7 April 1995. Interlaken, Switzerland, Q-9.
4. Малахова И. И., Тяглов В. В., Дегтерев Е. В., Красиков В. Д. Тезисы докладов Российского научно-производственного семинара “Применение ТСХ в экологии”, 19–20 января 1995, Москва. С. 27–30.
5. Малахова И. И. Количественная высокоэффективная тонкослойная хроматография аминокислот. Дисс. ... канд. хим. наук. СПб, 2003. 165 с.
6. Krasikov V. D., Malakhova I. I., Degterev E. V., Tyaglov V. V. // J. Planar Chromatogr. 2004. V. 17. P. 113–121.
7. 100 лет хроматографии / Под ред. Б. А. Руденко. М.: Наука, 2003. С. 233–268.

## 3.3.5. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНОВ

Инсулин является пептидом и относится к гормонам, вырабатываемым  $\beta$ -клетками поджелудочной железы человека и животных. Инсулин – основное специфическое средство терапии сахарного диабета [1]. Он не только понижает уровень сахара в крови и содержание гликогена в печени, но и одновременно повышает содержание последнего в мышцах [2]. Ниже представлена первичная последовательность инсулина I [3].



ПХ была использована для определения содержания инсулина I и II в поджелудочной железе крысы. Стандарты были приготовлены из препаратов инсулина I и II фирмы “Novo” (США). В качестве исследуемого образца использовали очищенный экстракт из поджелудочной железы крысы [4].

## Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения 1,0 ч при 20 °С.

Неподвижная фаза: ТСХ-пластинки на стеклянной подложке на основе целлюлозы, Art. 5718, фирма “Merck” (Германия).

Подвижная фаза: пиридин – бутанол-1 – амилвый спирт – бутанол-2 – муравьиная кислота – лед. уксусная кислота – вода (25 + 20 + 15 + 10 + 3 + 3 + 25, v/v); фронт элюента 15 см; время разделения 1,5 ч.

## Визуализация пятен инсулинов на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (20 °С, 30 мин) опрыскивают 0,5 %-м раствором красителя Кислотный фиолетовый 6В (Acid Violet 6В) в 95 %-м этаноле и выдерживают в течение 30 мин при 65 °С. Наблюдают темно-красные пятна на желтом фоне.

На рис. 3.18 представлено хроматографическое разделение экстракта из поджелудочной железы крысы и стандартов: инсулина I и II.

## Количественное определение

Денситометр “TLC Scanner II” фирмы “Camag” (Швейцария); режим работы – отражение; длина волны 530 нм; параметры щели 0,3×8,0 мм. Предел детектирования 5 мкг в пятне.

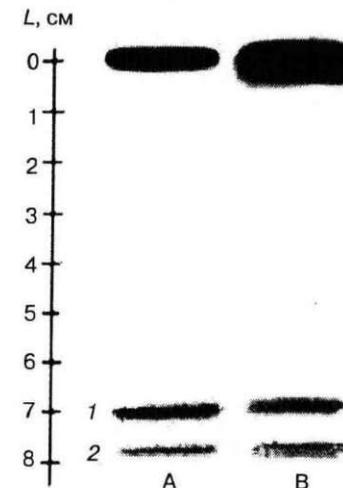
Использование денситометра в конкретном случае показало, что отношение содержания инсулина I к инсулину II в экстракте поджелудочной железы крысы составляет 1,5 : 1 [3].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 2. С. 13–17.
2. Штрауб Ф. Б. Биохимия. Будапешт: Изд. АН Венгрии, 1965. 772 с.
3. Шредер Э., Любке К. Пептиды. М.: Мир, 1969. Т. 2. С. 468–480.
4. De Gasparo M., Faupel M. // J. Chromatogr. 1986. V. 357. P. 139–146.

Рис. 3.18. Хроматографическое разделение стандартов (А) (1 – инсулин I; 2 – инсулин II) и экстракта из поджелудочной железы крысы (В)

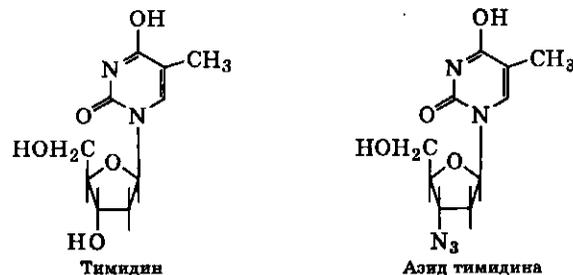
По оси ординат отложено расстояние от линии старта



### 3.4. АНАЛИЗ НУКЛЕОЗИДОВ, НУКЛЕОТИДОВ И ФРАГМЕНТОВ ДНК

#### 3.4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИМИДИНА В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ

Нуклеозид тимидин является сырьем для синтеза лекарственного препарата азид тимидина [1-(3'-азидо-2'-дезоксирибозил)тимидин], который используется для ингибирования роста вируса иммунодефицита человека (СПИДа) [1, 2].



Микробиологический способ получения тимидина представляется более выгодным, чем прямой химический синтез, с экономической и экологической точек зрения.

Культуральная жидкость (КЖ) штамма продуцента тимидина также содержит: тимин, аденозин, 2'-дезоксисуридин, цитозин, 2'-дезоксцитидин, уридин, цитидин и инозин. Поэтому основная проблема количественного анализа тимидина при контроле производства – его отделение от перечисленных выше нуклеиновых оснований и нуклеозидов.

ПХ была использована для аналитического контроля процесса биосинтеза тимидина [3]. Для приготовления стандартных растворов использовали препараты фирмы "Sigma", Cat. No. B100.

Пробы КЖ разбавляли 30 %-м водным этанолом, центрифугировали (12 000 об/мин) в течение 10 мин, супернатант использовали для работы.

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное, бинарное элюирование ( $l_1 = 7,0$  см,  $l_2 = 8,0$  см) в насыщенной камере; время насыщения 1,0 ч при 20 °С.

Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки "Сорбфил", ПТСХ-П-В-УФ, 10×15 см (Россия). Процедура промывания и активирования пластинок описана в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: хлороформ – метанол – вода (30 + 15 + 3, v/v); фронт элюента  $l_1 = 7,0$  см; время разделения 25 мин. Далее хроматограмму высушивают в течение 15 мин при 20 °С, выдерживают 30 мин при температуре 70 °С, охлаждают до комнатной температуры и повторно элюируют в этой же подвижной фазе; фронт элюента  $l_2 = 8,0$  см; время разделения 30 мин при температуре 20 °С.

#### Визуализация пятен нуклеозидов на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (15 мин, 20 °С) просматривают под ультрафиолетом при длине волны 254 нм, наблюдают темные пятна на зеленом фоне. Предел обнаружения тимидина 0,2 мкг/пятно.

Величины  $R_f$  тимидина и сопутствующих ему в КЖ примесей:

Тимидин	0,67±0,03
Тимин	0,75±0,04
2'-Дезоксиуридин	0,56±0,03
Аденозин	0,62±0,03
Цитозин	0,51±0,03
2'-Дезоксцитидин	0,42±0,04
Уридин	0,36±0,03
Цитидин	0,26±0,04
Инозин	0,18±0,03

$$n = 5; P = 0,95$$

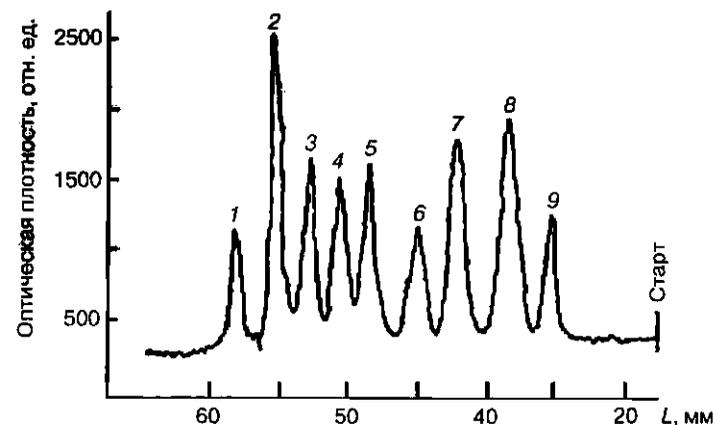


Рис. 3.19. Разделение смеси оснований и нуклеозидов, содержащихся в КЖ штамма-продуцента тимидина:

1 – тимин; 2 – тимидин; 3 – аденозин; 4 – 2'-дезоксисуридин; 5 – цитозин; 6 – 2'-дезоксцитидин; 7 – уридин; 8 – цитидин 9 – инозин  
По оси абсцисс отложено расстояние от верхнего края хроматограммы, по оси ординат – величина денситометрического сигнала

## Количественное определение

Денситометр “Шимадзу”, модель CS-920 (Япония); режим работы – отражение; длина волны 267 нм; параметры щели 0,4×0,4 мм. На рис. 3.19 представлена денситограмма тимидина и сопутствующих ему в КЖ нуклеиновых оснований и нуклеозидов. Предел детектирования тимидина 0,4 мкг/пятно. Область линейного сигнала денситометра 0,4–3,5 мкг/пятно.

Результаты количественного определения тимидина в пробах КЖ и метрологические характеристики методики представлены в табл. 3.8.

ТАБЛИЦА 3.8

Результаты количественного определения тимидина (мг/мл) в образцах КЖ и метрологические характеристики методики

Номер пробы	x	±рх	ε, %	Номер пробы	x	±рх	ε, %
1	2,86	0,06	2,1	6	1,51	0,04	2,4
2	3,31	0,1	3,0	7	2,13	0,09	4,2
3	1,20	0,03	2,8	8	1,95	0,04	1,9
4	1,41	0,03	1,9	9	3,15	0,10	3,2
5	1,0	0,03	3,2	10	4,20	0,11	2,7

n = 3; P = 0,95

## ЛИТЕРАТУРА

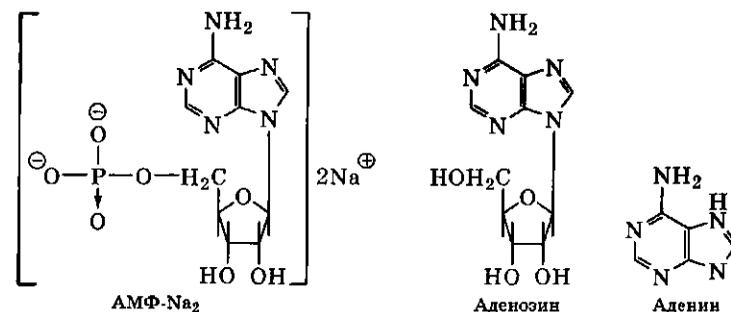
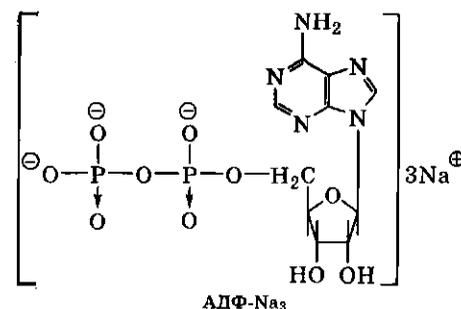
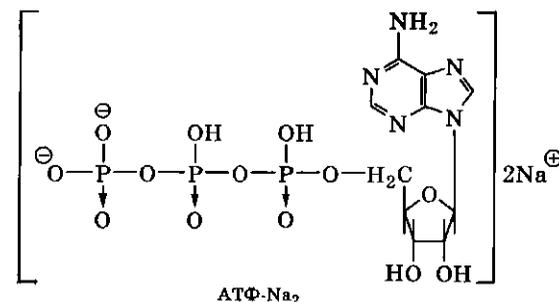
1. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. 582 с.
2. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 1. С. 330–331.
3. Кузнецов Э. В., Королькова Н. В., Мионов А. С., Тяглов Б. В., Заика А. И. и др. // Биотехнология. 1995. № 9–10. С. 60–63.

## 3.4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТА

Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) является естественной составной частью тканей организма человека и животных. Он образуется при реакциях окисления и в процессе гликолитического распада углеводов. АТФ участвует во многих процессах обмена веществ. При взаимодействии с актомиозином он распадается до аденозин-5'-дифосфата (АДФ) и неорганического фосфата, при этом освобождается энергия, значительная часть которой используется мышцами для осуществления механической работы, а

также ряда синтетических процессов (синтез белка, мочевины и промежуточных продуктов обмена веществ) [1, 2]. Для медицинских целей АТФ получают либо гидролизом мышечных тканей крупного рогатого скота, либо ферментативным синтезом из аденозин-5'-фосфата (АМФ), полученного гидролизом РНК [2, 3].

Ниже приведены структурные формулы соединений, которые могут присутствовать в реакционной массе при ферментативном синтезе АТФ из АМФ:



ПХ была использована для количественного определения АТФ, полученного ферментативным синтезом.

В качестве стандартов использовали нуклеотиды из набора фирмы "Sigma", Cat. No. K100-25A (США).

### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: высокоэффективные ТСХ-пластинки "Nano-Sil NH<sub>2</sub>/UV", 10×10 см, Cat. No. 811111, фирмы "Macherey-Nagel" (Германия).

Подвижная фаза: ацетон – 0,2 М водный раствор сульфата аммония (3 + 7, v/v); фронт элюента 6,0 см; время разделения 25 мин; температура 22 °С [4, 5].

### Визуализация пятен на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (25 мин, 20 °С) просматривают под ультрахемископом; длина волны 254 нм; наблюдают темные пятна на зеленом фоне. Предел обнаружения АТФ 0,2 мкг/пятно.

Величины R<sub>f</sub> нуклеотидов составляют:

АТФ	0,28
АДФ	0,40
АМФ	0,60
Аденозин и аденин	0,92

### Количественное определение

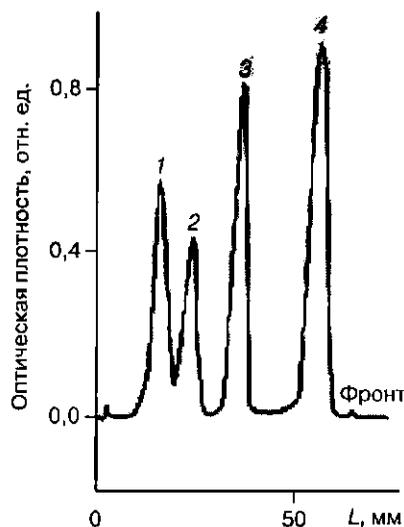
Денситометр "TLC Scanner II" фирма "Camag" (Швейцария); длина волны 260 нм; параметры щели 0,3×4,0 мм. Предел детектирования АТФ 0,4 мкг/пятно.

На рис. 3.20 представлена денситограмма АТФ, АДФ, АМФ и аденозина + аденина. Область линейного сигнала денситометра от 0,4 до 5,0 мкг/пятно.

**Рис. 3.20.** Денситограмма компонентов реакционной смеси при ферментативном синтезе АТФ:

1 – АТФ; 2 – АДФ; 3 – АМФ; 4 – аденозин + аденин

По оси абсцисс отложено расстояние от нижнего края хроматограммы, по оси ординат – величина денситометрического сигнала



### ЛИТЕРАТУРА

1. Штрауб Ф. Б. Биохимия. Будапешт: Изд. АН Венгрии, 1965. 772 с.
2. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 2. С. 163–164.
3. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. 582 с.
4. Lepri L., Coas V., Densideri P. G. // J. Planar Chromatogr. 1989. V. 2. P. 214–218.
5. Toper R., Fath W. W., Brendel M. // Mol. Genet. 1981. V. 182. P. 60–67.

### 3.4.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РСР ФРАГМЕНТА ГЕНОВ 16S РНК E. COLI K12 С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 60 кДа

При проведении работ в области молекулярного клонирования требуется информация о молекулярных массах фрагментов ДНК (рестриктов), полученных при гидролизе последней с помощью специфических рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз). Молекулярная масса ДНК и ее фрагментов в геной инженерии выражается в дальтонах (Да) и килодальтонах (кДа) или указывается длина ДНК (или ее фрагмента), измеряемая количеством оснований ["base"(b) или "kilobase"(kb)] [1, 2]. ПХ, к сожалению, не может быть использована для разделения высокомолекулярных фрагментов ДНК [2], поэтому для количественного определения фрагментов ДНК был использован электрофорез в агарозном геле.

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК [3]. С помощью электрофореза можно быстро разделить смеси фрагментов ДНК различной молекулярной массы, которые не могут быть разделены другими методами (например, центрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия). Визуализация полос фрагментов ДНК в геле осуществляется обработкой геля раствором флуоресцирующего, интеркалирующего в двойную спираль красителя – бромистого этидия. Предел обнаружения в УФ-свете ( $\lambda = 302$  нм) – 1,0 нг ДНК [3].

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется пятью параметрами:

1. **Размер молекул ДНК.** Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле со скоростями, обратно пропорциональными логарифму их молекулярных масс [4].
2. **Концентрация агарозы.** Фрагменты ДНК одинаковой молекулярной массы перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Применяя гели раз-

ных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по молекулярной массе.

3. **Конформация ДНК.** ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например кольцевая неповрежденная, кольцевая с одноцепочечным разрывом и линейная форма, движутся в агарозном геле с разными скоростями [5].
4. **Напряженность электрического поля.** Скорость передвижения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Максимальное разрешение при разделении фрагментов ДНК достигается при напряженности 2–5 В/см [3].
5. **Состав оснований.** Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях мало зависит от состава оснований ДНК [6].

Видеоденситометрия была использована для количественного определения рестрикционного PCR фрагмента генов 16 S РНК *E. Coli K12* с молекулярной массой 60 кДа, полученного после проведения электрофореза [7, 8].

#### Условия проведения электрофореза

0,6 % -й агарозный гель [1], 200×200×5 мм; количество треков 18. Содержание фрагментов ДНК в стартовой зоне каждого трека – 80 нг.

Буферный раствор: 0,04 М трис-ацетатный буфер, содержащий 0,002 М ЭДТА.

Прибор для электрофореза: “Multiphore” фирмы “LKB” (Швеция).

Напряженность электрического поля: 4,0 В/см. Время разделения – 1,5 ч, температура 0 °С.

#### Визуализация зон фрагментов ДНК на электрофореграммах [8]

Электрофореграмму погружают в 10<sup>-3</sup> М раствор бромистого этидия и выдерживают в течение 10 мин, после чего промывают водой 3 раза. Промытую водой электрофореграмму просматривают под ультрамикроскопом фирмы “UVP” (США) при длине волны 302 нм; наблюдают темные пятна на светло-голубом фоне. На рис. 3.21 представлена электрофореграмма рестриков PCR фрагментов генов 16 S РНК различных бактерий; трек 1 содержит маркеры (стандарты) – фрагменты ДНК, различающиеся по молекулярной массе, выраженной в кДа. Предел обнаружения – 2 нг ДНК.

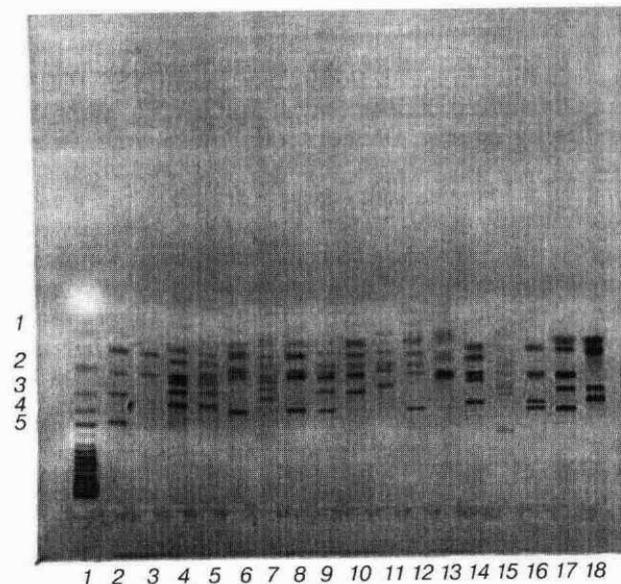


Рис. 3.21. Электрофореграмма рестриков PCR фрагментов генов 16S РНК различных бактерий. Видеоизображение электрофореграммы. Видеоденситометр “GDS 8000”, длина волны 302 нм  
Трек 1 – реперные (стандартные) точки: 1 – 10 кДа, 2 – 20 кДа, 3 – 50 кДа, 4 – 70 кДа и 5 – 90 кДа

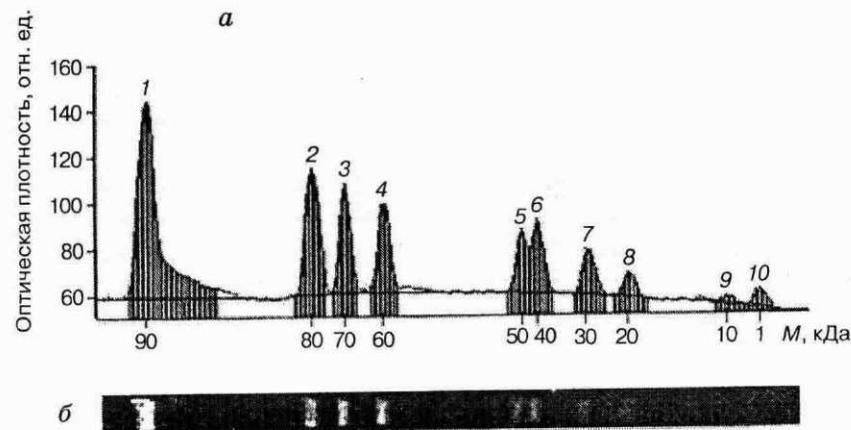


Рис. 3.22. Денситограмма (а) и электрофореграмма (б) трека 4 (рис. 3.21). Видеоденситометр “GDS 8000”, длина волны 302 нм  
По оси абсцисс отложена величина молекулярной массы PCR фрагментов генов 16S РНК (*E. Coli K12*); по оси ординат – величина денситометрического сигнала (А)

## Количественное определение

Видеоденситометр "GDS 8000" фирмы "UVP" (США); режим работы – пропускание; длина волны 302 нм. Предел детектирования – 5 нг ДНК в полосе. Область линейного сигнала денситометра 5–100 нг.

На рис. 3.22 представлена денситограмма (а) и видеоизображение (б) трека 4 (см. рис. 3.21).

Площадь и высота пика (4), соответствующая фрагменту ДНК с молекулярной массой 60 кДа, составляет 17 % от общей площади под профилем трека. Общее количество ДНК, внесенной в стартовую зону трека 4, составляет 80 нг. Количество фрагмента ДНК с молекулярной массой 60 кДа составляет  $80 \text{ нг} \times 0,17 = 13,6 \text{ нг}$ .

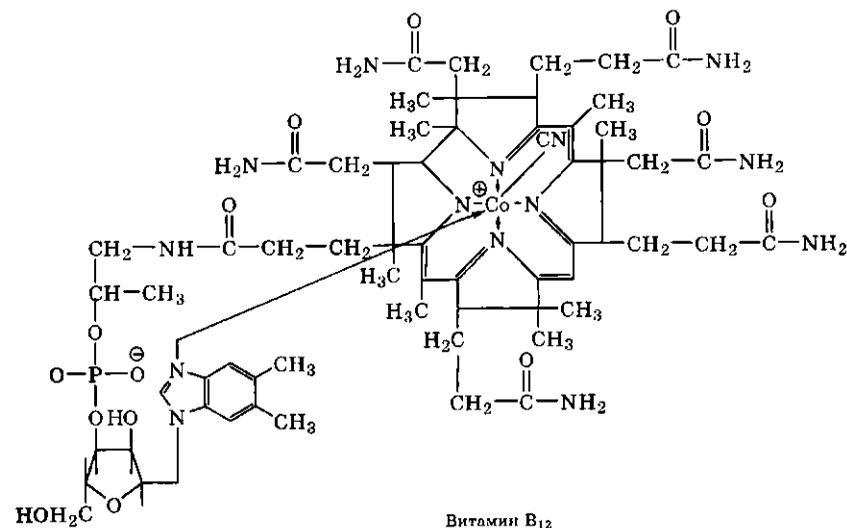
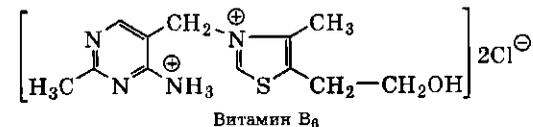
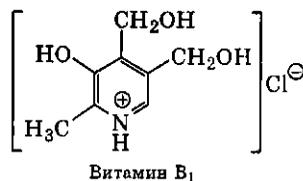
## ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 479 с.
2. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 288 с.
3. Aaij C., Brost P. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 269. P. 192–231.
4. Helling R. B., Goodman H. M., Boeyr H. W. // J. Virlogy. 1974. V. 14. P. 1235–1244.
5. Throne H. V. // J. Mol. Biol. 1967. V. 29. P. 203–220.
6. Thomas M., Davis R. W. // J. Mol. Biol. 1975. V. 91. P. 315–328.
7. Drouin J. // J. Mol. Biol. 1995. V. 240. P. 15–29.
8. GDS 8000 System. Manual Instruction. Polo Alto. California. USA, 2002. 170 с.

## 3.5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДО- И ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ

## 3.5.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В

ПХ была использована для количественного определения витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>, которые входят в состав многих поливитаминных комплексов [1, 2]; структурные формулы витаминов этой группы представлены ниже:



Стандартные растворы витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> были приготовлены из препаратов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> фирмы "Sigma" (США), Cat. No. V-1. Исследуемый препарат содержал витамины В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> производства Белгородского витаминного комбината (Россия).

## Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения камеры 45 мин при 20 °С.

Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки "Сорбфил", ПТСХ-АФ-В-УФ, 10×15 см (Россия). Процедура промывания и активирования пластинок описана в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: бутанол-1 – хлороформ – метанол – лед. уксусная кислота – вода (8,0 + 1,5 + 2,0 + 0,5 + 2,5, v/v); фронт элюента 8,0 см; время разделения 45 мин; температура 20 °С [3, 4].

## Визуализация пятен витаминов на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (25 мин, 20 °С), просматривают под ультрахемископом при длине волны 254 нм; наблюдают темные пятна на зеленом фоне.



Рис. 3.23. Денситограмма водорастворимых витаминов группы В:

1 - В<sub>6</sub>; 2 - В<sub>12</sub>; 3 - В<sub>1</sub>

По оси абсцисс отложено расстояние от нижнего края хроматограммы, по оси ординат - величина денситометрического сигнала

Величины  $R_f$  витаминов:

В<sub>1</sub> 0,37      В<sub>6</sub> 0,48      В<sub>12</sub> 0,86

#### Количественное определение

Денситометр "TLC Scanner 3" фирмы "Camag" (Швейцария); длина волны 240 нм; параметры щели 0,2×5,0 мм.

На рис. 3.23 представлена денситограмма витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Букин В. Н. Биохимия витаминов. М.: Наука, 1982. 315 с.
2. Мецлер Д. Е. Биохимия. М.: Мир, 1980. 520 с.
3. Арзамасцев А. П., Никуличев Д. Б., Попов Д. М. // Хим.-фарм. журн. 1989. С. 486-491.
4. Никуличев Д. Б., Арзамасцев А. П., Попов Д. М. // Тезисы докладов конференции "Результаты и перспективы научных исследований по биотехнологии и медицине". Ленинград, 1989. С. 88-89.

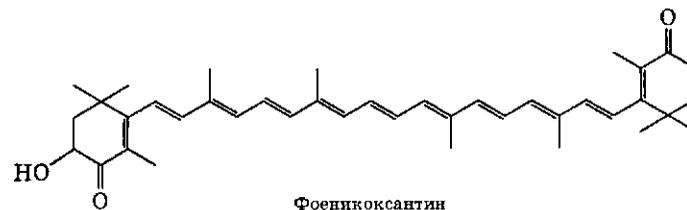
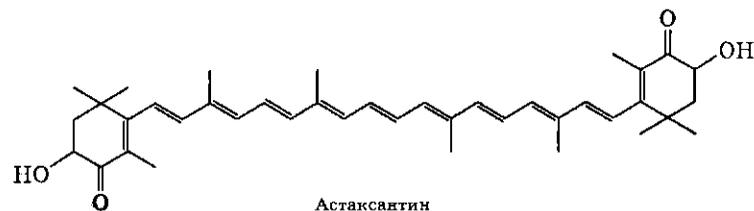
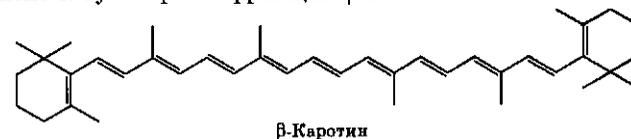
#### 3.5.2. ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ β-КАРОТИНА И АСТАКСАНТИНА В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ PHAFFIA RHODOZYMIA

β-Каротин (β-К) и астаксантин (А) относятся к группе жирорастворимых витаминов. Они применяются в качестве пищевой добавки как общеукрепляющее и иммуностимулирующее средство для профилактики простудных заболеваний, при сердечно-сосуди-

дистых и желудочно-кишечных заболеваниях (язвах, гастритах), а также при катаракте [1]. Антиоксидантное действие β-К и А позволяет использовать их при лечении лучевых поражений кожных покровов [2]. Эти соединения получают с помощью экстракции из овощей, например моркови, стручков перца, томатов и др. [2].

В настоящее время разработаны промышленные штаммы продуценты β-К и А. В качестве метода контроля суммарной фракцией каротиноидов использовалась спектрофотометрия [2]. Однако для проведения генетико-селекционных работ по совершенствованию штаммов продуцентов этих каротиноидов возникла необходимость определения каждого из компонентов, находящихся в экстрактах культуральных жидкостей.

ПХ была использована для определения β-К и А в ацетоновых экстрактах дезинтегрированной биомассы, выделенной из культуральных жидкостей промышленного штамма продуцента *Phaffia rhodozyma*. КЖ *Phaffia rhodozyma* помимо β-К и А содержат также феникоксантин (5-10 % во фракции β-К и А) и другие каротиноиды, такие как лейкопин, β-криптосантин, ехинон и 3'-гидроксиехинон, причем их количество не превышает 4 % по отношению к суммарной фракции β-К и А.



Известно, что каротиноиды легко окисляются кислородом воздуха; реакция окисления ускоряется на свету и в присутствии большого ряда катализаторов, одним из которых является сили-

кагель. Было установлено, что  $\beta$ -К и А в количествах 10–100 мкг устойчивы на слое силикагеля (ВЭТСХ-пластинки “Сорбфил”) в течение 15 мин [3], поэтому количественный хроматографический анализ каротиноидов (нанесение, элюирование и денситометрирование) должен быть выполнен за время менее чем 15 мин. Для сокращения времени анализа был использован высокоскоростной видеоденситометр “ДенСкан-2” [4].

ПХ была использована для определения содержания  $\beta$ -К и А в КЖ *Phaffia rhodozyma*. В качестве стандартных образцов использовали  $\beta$ -К и А фирмы “Sigma” (США), Cat. No. C4582 и A9335 соответственно.

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное хроматографирование в насыщенной камере; время насыщения 30 мин при 20 °С.

Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки “Сорбфил” ПТСХ-П-В-УФ, 10×15 мм (Россия). Процедуры промывания и активирования пластинок описаны в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: гексан – метанол (98 + 2, v/v) [5], фронт элюента 6,0 см; время разделения 4,5–5,0 мин; температура 20 °С.

#### Визуализация пятен $\beta$ -К и А на хроматограммах

Высушенную при 20 °С хроматограмму (2 мин) просматривают под ультрамикроскопом при длине волны 254 нм; наблюдают темные пятна на зеленом фоне.

Величины  $R_f$ ,  $\beta$ -К, А и феникоксантина:

$\beta$ -К	0,28±0,03
А	0,43±0,03
Феникоксантин	0,55±0,03

$$n = 5; P = 0,95$$

Предел обнаружения  $\beta$ -К и А составляет 5,0 мкг в хроматографической зоне.

#### Количественное определение

Видеоденситометр “ДенСкан-2” (НТЦ “Ленхром”, Россия); длина волны 254 нм. Область линейного сигнала денситометра находится в пределах от 10 до 80 мкг. Время количественной обработки хроматограммы 2,0–2,5 мин. Результаты количественного определения  $\beta$ -К и А в образцах КЖ и метрологические характеристики методики представлены в табл. 3.9.

ТАБЛИЦА 3.9

Результаты количественного определения  $\beta$ -каротина (мкг/мл) и астаксантина (мкг/мл) в ацетоновых экстрактах дезинтегрированной биомассы, выделенной из КЖ *Phaffia rhodozyma*, и метрологические характеристики методики

Номер пробы	$\beta$ -Каротин			Астаксантин		
	x	$\pm\rho x$	$\epsilon, \%$	x	$\pm\rho x$	$\epsilon, \%$
1	350	11	3,1	240	10	4,3
2	380	9	2,3	250	8	3,3
3	260	4	1,6	180	4	1,9
4	300	7	2,4	200	6	2,8
5	300	10	3,3	210	4	1,7
6	320	15	4,8	240	3	1,1
7	230	3	1,5	190	5	2,6

$n = 5; P = 0,95$

Время анализа (одна хроматограмма), включая пробоподготовку, нанесение, элюирование, высушивание и количественную обработку, составляет 12–12,5 мин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2000. Т. 2. С. 71.
2. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 450 с.
3. Вустин М. М., Красиков В. Д., Лукина Г. П., Малахова И. И., Синевский С. П., Тяглов Б. В. // Материалы Российского научно-производственного семинара “Современное состояние и практическое применение метода ТСХ”. Москва, 10–11 декабря 1996. С. 26.
4. Видеоденситометр “ДенСкан 2”. Техническое описание. СПб: НТЦ “Ленхром”, 1995. 59 с.
5. Foppen F. // Chromatogr. Rev. 1971. V. 14. P. 133–145.

### 3.6. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ, ИХ ЭФИРОВ И УГЛЕВОДОВ

#### 3.6.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

ПХ была использована для разделения и количественного определения смеси карбоновых кислот.

Стандартные растворы карбоновых кислот были приготовлены из набора карбоновых кислот фирмы “Sigma” (США), Cat. No. F-0677.

## Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: пластинки "Kieselgel 60" на стеклянной подложке, 10×10 см, фирмы "Merck" (Германия), Art. 5626.

Подвижная фаза: диизопропиловый эфир\* – муравьиная кислота – вода (90 + 7 + 3, v/v); фронт элюента 9,0 см; время разделения 30 мин; температура 20 °С [1, 2].

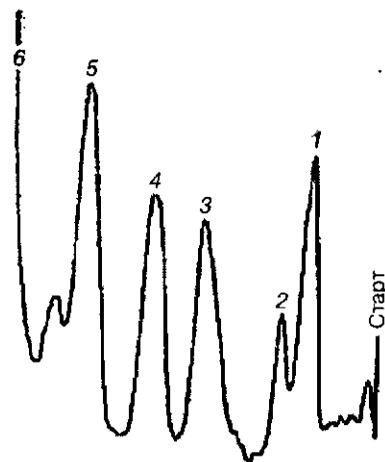
## Визуализация пятен карбоновых кислот на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (20 мин, 25 °С) выдерживают в течение 10 мин при 100 °С, охлаждают до комнатной температуры и на 1 с погружают в раствор с обнаруживающим реагентом (40 мг натриевой соли 2,6-дихлориндофенола + 100 мл 95 %-го этанола), высушивают на воздухе 5 мин при 20 °С и нагревают в течение 15 мин при 100 °С; наблюдают темно-красные пятна на светло-фиолетовом фоне. Предел обнаружения 3–5 мкг/пятно.

Величины  $R_f$  карбоновых кислот:

Винная кислота	0,15–0,20
Малоновая кислота	0,25–0,30
Молочная кислота	0,45–0,50
Янтарная кислота	0,60–0,65
Фумаровая кислота	0,80
Стеариновая кислота	0,95–1,0

## Количественное определение



Денситометр "TLC Scanner II" фирмы "Camag" (Швейцария). Режим работы – отражение; длина волны 550 нм; параметры щели 0,3×4,0 мм. Область линейного сигнала денситометра – 5,0–60,0 мкг [3].

На рис. 3.24 представлена денситограмма смеси карбоновых кислот.

Рис. 3.24. Денситограмма смеси карбоновых кислот (содержание каждого компонента 20 мкг) [3]:

1 – винная кислота; 2 – малоновая кислота; 3 – молочная кислота; 4 – янтарная кислота; 5 – фумаровая кислота; 6 – стеариновая кислота

\* Обязателен тест на наличие пероксидов.

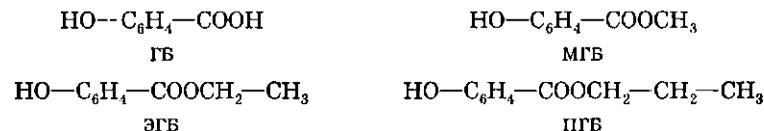
## ЛИТЕРАТУРА

1. Pastera S., Pedrotti A., Ferrari G. // J. Chromatogr. 1964. V. 14. P. 281–291.
2. Chan H., Chenahin E. // J. Agric Food Chem. 1972. V. 20. P. 110–113.
3. Jork H., Kany E., Klein I. GDCh-training course Nr. 300. Saarbrücken: Univesitat des Saarlandes, 1987.

## 3.6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСЕРВАНТОВ – ПРОИЗВОДНЫХ 4-ГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

4-Гидроксibenзойная кислота и ее эфиры (метилловый, этиловый и пропиловый) широко используются в пищевой промышленности в качестве консервантов при производстве фруктовых соков и овощных консервов [1].

ПХ была использована для количественного определения следующих консервантов: пропилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты (ПГБ), этилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты (ЭГБ), метилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты (МГБ) и 4-гидроксibenзойной кислоты (ГБ):



Использовали стандарты ПГБ, ЭГБ, МГБ и ГБ фирмы "Elanko" (США).

## Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: пластинки RP-18W/UV", на стеклянной подложке, 10×10 см, Cat. No. 811075, фирмы "Macherey-Nagel" (Германия).

Подвижная фаза: ацетон – вода (40 + 60, v/v); фронт элюента 7,5 см; время разделения 30 мин; температура 18–20 °С [2–4].

## Визуализация пятен консервантов на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (20 мин, 20 °С) просматривают под ультрамикроскопом, длина волны 254 нм; наблюдают темно-синие пятна на светло-голубом фоне. Предел обнаружения 0,3 мкг/пятно.

Величины  $R_f$  консервантов:

ПГБ	0,24	МГБ	0,42
ЭГБ	0,32	ГБ	0,60

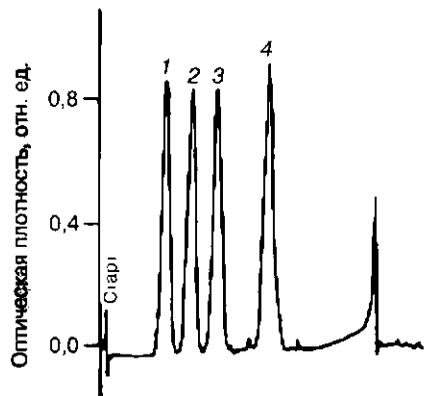


Рис. 3.25. Денситограмма модельной смеси консервантов-производных 4-гидроксibenзойной кислоты:

1 – ПГБ; 2 – ЭГБ; 3 – МГБ; 4 – ГБ  
По оси абсцисс отложено расстояние от нижнего края хроматограммы, по оси ординат – величина денситометрического сигнала

### Количественное определение

Денситометр “TLC Scanner II” фирма “Camag” (Швейцария); длина волны 250 нм; параметры щели 0,3×3,0 мм. Предел детектирования этих соединений 0,5 мкг/пятно.

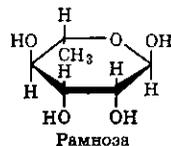
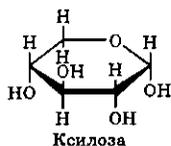
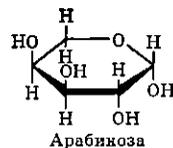
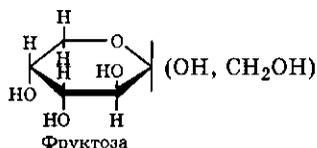
На рис. 3.25 представлена денситограмма: ПГБ, ЭГБ, МГБ и ГБ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ротаунт М. Анализ пищевых продуктов. Вальдбронн, Германия: изд. фирмы “Hewlett-Packard”, 1994. 145 с.
2. König H., Schuller M. // Fres. Z. anal. Chem. 1979. V. 294. S. 36–44.
3. Gossele J. A. // J. Chromatogr. 1971. V. 63. P. 433–439.
4. Volkmann D. HRC GC. 1980. V. 3. P. 189–198.

### 3.6.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

ПХ была использована для количественного определения смеси углеводов – лактозы, фруктозы, арабинозы, ксилозы и рамнозы [2]:



### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки “Kieselgel 60” на стеклянной подложке, 10×10 см, фирмы “Merck” (Германия), Art. 5631. Перед экспериментом пластинки промывали и активировали, как описано в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: пропанол-2 – 0,75 %-й водный раствор борной кислоты – лед. уксусная кислота (40 + 5 + 1, v/v), фронт элюента 8,0 см; время разделения 1 ч 20 мин; температура 20 °С.

### Визуализация пятен углеводов на хроматограммах

Высушенную хроматограмму при 20 °С (30 мин) на 1,0 с погружают в кювету с раствором обнаруживающего реагента (500 мг 4-аминогипсуровой кислоты + 50 мл 95 %-го этанола + 50 мл толуола), высушивают (10 мин, 25 °С), нагревают в течение 8–10 мин при 140 °С, охлаждают до комнатной температуры и просматривают под ультрахемископом, длина волны 365 нм; наблюдают пятна гексоз и пентоз в виде ярко-оранжевых флуоресцирующих зон на белом фоне [3].

На рис. 3.26 представлено хроматографическое разделение пяти моносахаридов.

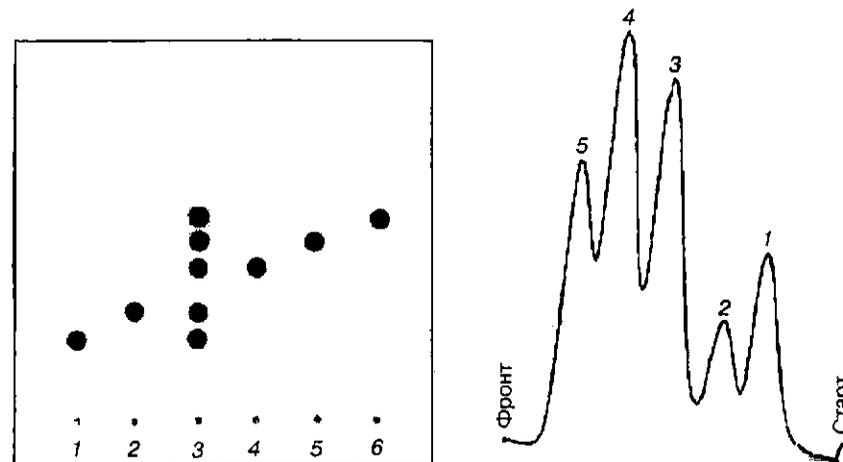


Рис. 3.26. Хроматографическое разделение пяти моносахаридов:

1 – лактоза; 2 – фруктоза; 3 – смесь моносахаридов; 4 – арабиноза; 5 – ксилоза; 6 – рамноза

Рис. 3.27. Денситограмма смеси пяти моносахаридов (содержание каждого моносахарида в пятне 4,0 мг):

1 – лактоза; 2 – фруктоза; 3 – арабиноза; 4 – ксилоза; 5 – рамноза

## Количественное определение

Денситометр "TLC Scanner II" фирмы "Camag" (Швейцария). Режим работы – отражение; измерение интенсивности флуоресценции, длина волны возбуждения 313 нм; длина волны флуоресценции 480 нм; фильтр FL-46; параметры щели 0,2×4,0 мм.

Пределы детектирования углеводов в хроматографических зонах, нг:

Ксилоза	10–20
Фруктоза, арабиноза и рамноза	50–100
Лактоза	1,0–2,0

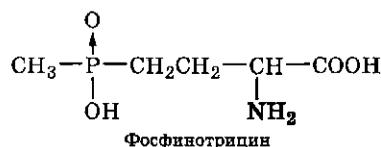
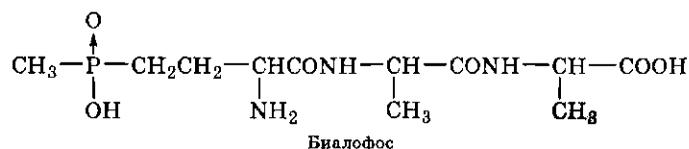
На рис. 3.27 представлена денситограмма смеси пяти моносахаридов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Jork H., Kany E. GDCH-training course Nr. 300. "Einführung in die Dunnschicht Chromatographie". Saarbrücken: Universität des Saarlandes, 1987.
2. Штрауб Ф. Б. Биохимия. Будапешт: Изд. АН Венгрии, 1965. 772 с.
3. Jork H., Funk W., Fisher W., Wimmer H. Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods. Weinheim, Germany: VCH, 1990. 464 p.

### 3.7. АНАЛИЗ ГЕРБИЦИДОВ, ПЕСТИЦИДОВ, ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ И ФОСФОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

#### 3.7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОГО ГЕРБИЦИДА БИАЛОФОСА В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ



Пептидный гербицид биалофос (ВА): – 4-(гидроксиметилфосфоноил)-L-2-аминобутирил-L-аланил-L-аланин. Продуктируемый

культурой *Streptomyces hygrosopicus*, он не только обладает широким спектром гербицидной активности, но и со временем хорошо разрушается под воздействием ферментов, выделяемых почвенными микроорганизмами [1–3]. Культуральная жидкость *Str. hygrosopicus* помимо ВА содержит: фосфинотрицин (ФТ), L-аланин, L-аланил-L-глутаминовую кислоту, а также некоторые короткие пептиды. Фосфинотрицин (L-2-амино-(4-гидроксиметилфосфоноил)-масляная кислота) является ближайшим предшественником ВА, также обладает гербицидной активностью [3].

ПХ была использована для количественного определения ВА и ФТ в КЖ. В качестве стандартов использовали коммерческие препараты фирмы "Meiji Seika Kaisha" (Япония). Пробы КЖ *Str. hygrosopicus* разбавляли 30 %-м этиловым спиртом, тщательно перемешивали, центрифугировали (12000 об/мин) в течение 10 мин, и надосадочную жидкость использовали для работы.

## Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения 1,0 ч при 20 °С.

Неподвижная фаза: пластинки "Сорбфил" ПТСХ-П-В, 10 × 15 см (Россия). Процедура промывания и активирования пластинок описана в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: пропанол-2 – 25 %-й водный аммиак (3 + 1, v/v); фронт растворителя 9,0 см; время разделения 60–65 мин; температура 20 °С.

## Визуализация пятен ВА и ФТ на хроматограмме

Высушенную при 20 °С хроматограмму выдерживают при 120 °С в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры и погружают на 17–20 с в кювету с раствором обнаруживающего реагента (0,3 %-й раствор нингидрина в ацетоне, который содержит 3,0 % лед. уксусной кислоты), высушивают при 20 °С в течение 15 мин, затем выдерживают при 70 °С в течение 20 мин, наблюдают малиновые пятна на белом фоне. Пределы обнаружения ВА и ФТ составляют 0,5 и 0,1 мкг/пятно соответственно [4].

Хроматографическое разделение компонентов КЖ *Str. hygrosopicus* представлено на рис. 3.28.

## Количественное определение

Денситометр "Шимадзу", модель CS-920; режим работы – отражение; длина волны 530 нм; параметры щели 0,4×0,4 мм. Область линейного сигнала для ВА 0,8–4,0 и для ФТ 0,2–2,0 мкг/пятно.

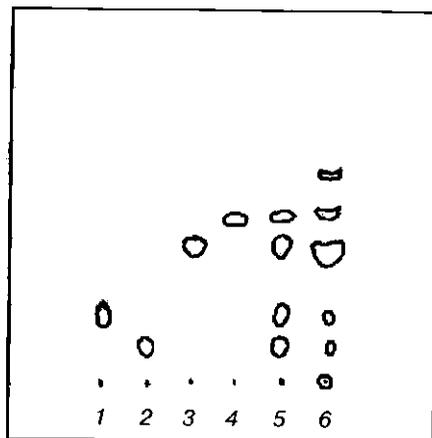


Рис. 3.28. Хроматографическое разделение компонентов КЖ *Str. hygrosopicus*:

1 – биаллофос; 2 – фосфинотрицин; 3 – L-аланин; 4 – L-аланил-L-аланин; 5 – смесь веществ стандартов; 6 – КЖ *Str. hygrosopicus*

На рис. 3.29 представлена денситограмма КЖ *Str. hygrosopicus*.

Результаты количественного определения ВА и FT и метрологические характеристики методики приведены в табл. 3.10.

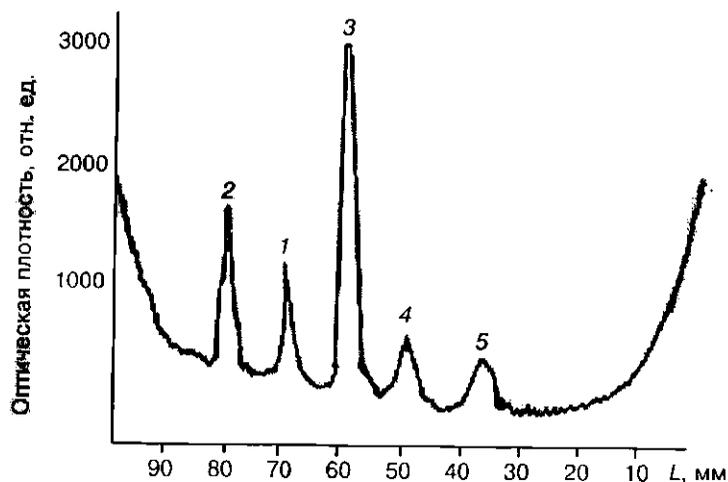


Рис. 3.29. Денситограмма КЖ *Str. hygrosopicus*:

1 – биаллофос; 2 – фосфинотрицин; 3 – L-аланин; 4 – L-аланил-L-аланин; 5 – неидентифицированный продукт  
По оси абсцисс отложено расстояние от верхнего края хроматограммы, по оси ординат – величина денситометрического сигнала

ТАБЛИЦА 3.10

Количественное определение ВА и FT (мг/мл) в КЖ *Str. hygrosopicus* и метрологические характеристики методики

Номер образца	x	±рх	ε, %	Номер образца	x	±рх	ε, %
1 ВА	3,1	0,127	4,1	6 ВА	3,7	0,126	3,4
FT	2,2	0,066	3,0	FT	1,6	0,032	2,0
2 ВА	3,4	1,105	3,1	7 ВА	4,0	0,148	3,7
FT	2,0	0,056	2,8	FT	2,3	0,08	3,5
3 ВА	3,7	0,144	3,9	8 ВА	3,0	0,062	2,1
FT	1,8	0,04	2,1	FT	1,5	0,047	3,1
4 ВА	3,0	0,74	3,2	9 ВА	2,9	0,096	3,3
FT	1,3	0,38	2,9	FT	1,6	0,023	1,4
5 ВА	3,1	0,117	3,8	10 ВА	3,4	0,121	3,6
FT	1,8	0,065	3,6	FT	2,0	0,046	2,3

n = 5; P = 0,95

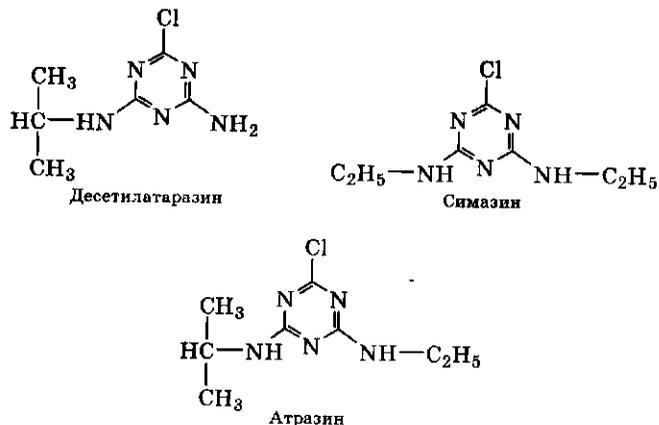
### ЛИТЕРАТУРА

1. Kondo J., Shomura T., Ogawa Y. // Science Reports of Meiji Seika Kaisha (Japan). 1973. V. 13. P. 34–41.
2. Ogawa Y., Tsuruka T., Inouye S. // Science Reports of Meiji Seika Kaisha (Japan). 1973. V. 13. P. 42–48.
3. Anzai H., Murakami T., Imai S. // J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 3482–3888.
4. Sizova I. A., Degtiar W. G., Tyaglov B. V., Vaisburg A. F. // Proceedings of 8th International Symposium on Instrumental Planar Chromatography. Interlaken, Switzerland, 5–7 April 1995. Q10.

### 3.7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕСТИЦИДОВ В ПИТЬЕВОЙ ВОДЕ

В соответствии с положением Европейского Союза по контролю и качеству питьевой воды с 1980 г. во всех европейских странах-членах ЕС вводятся предельно допустимые нормы на общее содержание пестицидов и продуктов их метаболизма в питьевой воде на уровне 500 нг/л и 100 нг/л отдельного вещества. Определению подвергаются около 300 разрешенных к применению пестицидов и их основных метаболитов [1, 2].

ПХ была использована для определения пяти пестицидов триазинового ряда.



Стандартные образцы пестицидов: десетилатразина, гексазиона, симазина, атразина и кримидина производства фирмы "Sigma" (США). Пестициды экстрагировали из питьевой воды равным объемом хлороформа 3 раза, хлороформные вытяжки объединяли, упаривали досуха (при пониженном давлении), и остаток растворяли в хлороформе (минимальный объем) [3].

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения 30 мин при 25 °С.

Неподвижная фаза: пластинки "Nano-Durasil-20 UV<sub>254</sub>", Cat. No. 812010, 10×10 см на стеклянной подложке фирмы "Macherey-Nagel" (Германия).

Подвижная фаза: хлороформ – ацетон (95 + 5, v/v); фронт элюента 9,8 мм; время разделения 25 мин при 20 °С.

#### Визуализация пятен пестицидов на хроматограмме

Высушенную при 20 °С хроматограмму (10 мин) просматривают под ультрамикроскопом при длине волны 254 нм и наблюдают темные пятна на светло-зеленом фоне.

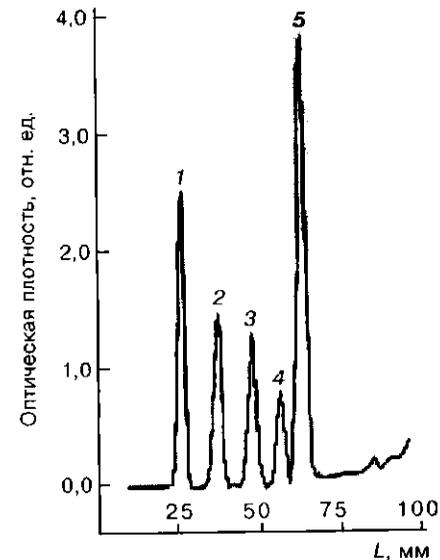
Величины  $R_f$  пестицидов:

Десетилатразин	0,26	Атразин	0,50
Гексазион	0,35	Кримидин	0,65
Симазин	0,43		

Предел обнаружения пестицидов 0,05 мкг/пятно.

Рис. 3.30. Денситограмма смеси пяти пестицидов триазинового ряда:

1 – десетилатразин; 2 – гексазион; 3 – симазин; 4 – атразин; 5 – кримидин. По оси абсцисс отложено расстояние от нижнего края хроматограммы, по оси ординат – величина денситометрического сигнала.



#### Количественное определение

Денситометр "Desaga" CD-60 фирмы "Desaga" (Германия); режим работы – отражение; параметры щели 0,3×4,0 мм; длина волны 240 нм. Область линейного сигнала денситометра для пестицидов триазинового ряда лежит в интервале от 0,1 до 0,4 мкг/пятно.

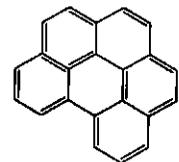
На рис. 3.30 представлена денситограмма смеси пяти пестицидов триазинового ряда.

#### ЛИТЕРАТУРА

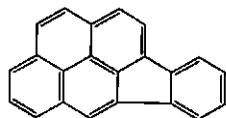
1. Werner G. Untersuchungen zur Analytik und zum Vorkommen von Triazinen in Grund und Oberflächengewässern. LW-Schriftreihe, 1986. 212 s.
2. Беспамятов Г. П., Кротов Ю. А. Предельно-допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. М.: Химия, 1995. 528 с.
3. Gardyan G., Their H. P. // Z. Lebensm. Unter. Forsch. 1991. V. 192. P. 40–45.

#### 3.7.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ПИТЬЕВОЙ ВОДЕ (ГЕРМАНИЯ)

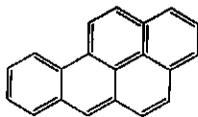
Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) обладают канцерогенной активностью и в следовых количествах присутствуют в воде, воздухе, почве, а также в пищевых продуктах. Норма содержания ПАУ в питьевой воде в Германии составляет 0,2±0,04 мкг/л (рассчитано на углерод) [1]. В данном примере рассмотрено количественное определение бензо(ghi)перилена, индено(1,2,3-cd)пирена, бензо(b)флюорантена, бензо(k)флюорантена и флюорантена с помощью метода ПХ в питьевой воде в Германии [2, 3].



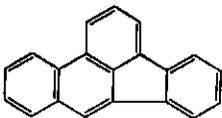
Бензо(ghi)перилен  $C_{22}H_{12}$   
 $M = 276,34$  г/моль 95,6 % С



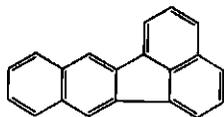
Индено(1,2,3-сd)пирен  $C_{22}H_{12}$   
 $M = 276,34$  г/моль 95,6 % С



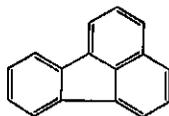
Бензо(а)пирен  $C_{20}H_{12}$   
 $M = 252,32$  г/моль 95,2 % С



Бензо(б)флюорантен  $C_{20}H_{12}$   
 $M = 252,32$  г/моль 95,2 % С



Бензо(к)флюорантен  $C_{20}H_{12}$   
 $M = 252,32$  г/моль 95,2 % С



Флюорантен  $C_{16}H_{10}$   
 $M = 202,25$  г/моль 95,0 % С

Стандартные растворы образцов ПАУ были приготовлены из препаратов фирмы "Ehrendorfer" (Германия), чистота препаратов ~98 %. Исследуемые объекты – образцы питьевой воды после прободготовки, выполненной по методикам [2, 3].

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование при температуре 20 °С.

Неподвижная фаза: пластинки "Nano-Sil-PAH" на стеклянной подложке, 10×10 см, фирмы "Macherey-Nagel" (Германия), Cat. No. 811050 [4–6].

Подвижная фаза: хлористый метилен; фронт элюента 8,0 см; время разделения 20 мин; температура 20 °С.

#### Визуализация пятен ПАУ на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (5 мин, 20 °С) на 2 с погружают в кювету с смесью парафин – *n*-гексан (1 + 2, *v/v*), через 10 мин просматривают под ультрахемископом, длина волны 365 нм, и наблюдают флуоресцирующие пятна ПАУ.

Величины  $hR_f$  исследуемых ПАУ:

Бензо[ghi]перилен	27	Бензо[b]флюорантен	41
Индено[1,2,3-сd]пирен	34	Бензо[k]флюорантен	45
Бензо[а]пирен	37	Флюорантен	49

Предел обнаружения 20–40 нг/пятно.

#### Количественное определение

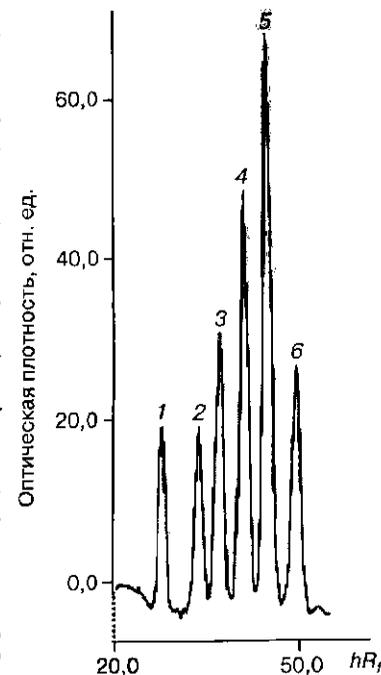
Денситометр "TLC Scanner II" фирмы "Camag" (Швейцария). Режим работы – отражение; измерение интенсивности флуоресценции, длина волны возбуждения 365 нм, длина волны флуоресценции 450 нм; фильтр FL-39; параметры щели 0,2×4,0 мм. На рис. 3.31 представлена денситограмма смеси шести исследованных ПАУ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bekanntmachung der Neufassung der Trinkwasserverordnung Vom 5.12.91 (BGBL IS 2612) und (BGBL IS 2613).
2. Richlenie des Rates uber die Qualität des Wasser für menschlichen Gebrauch Vom 15.07.80 (Amtsblatt der EG Nr. L229/11).
3. World Health Organization "Guidelines for Drinking Water Quality". V. 1 and 2. Gent. 1984.
4. Slifkin M. A., Lin S. H. // J. Chromatogr. 1983.V. 269. P. 103–107.
5. Slifkin M. A., Singh H. // J. Chromatogr. 1984.V. 303. P. 109–192.
6. Funk W., Gluck V., Donnevert G. // J. Planar Chromatogr. 1992. V. 5. P. 28–32.

Рис. 3.31. Денситограмма ПАУ (содержание каждого компонента 20 нг в хроматографической зоне):

1 – бензо[ghi]перилен; индено[1,2,3-сd]пирен;  
 2 – бензо[а]пирен; 3 – бензо[б]флюорантен;  
 4 – бензо[к]флюорантен; 5 – флюорантен  
 По оси абсцисс отложены значения  $hR_f$ , по оси ординат – величина денситометрического сигнала



## 3.7.4. АНАЛИЗ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) до сих пор состоят на вооружении армий многих государств [1]. Эти соединения обладают нервно-паралитическим действием и характеризуются высокой токсичностью. Так, смертельная концентрация при действии через органы дыхания человека в течение 10 мин составляет  $7 \times 10^{-3}$ – $1,5 \times 10^2$  мг в 1 л воздуха [2]. Токсичное действие ФОВ связано со способностью ингибировать различные ферменты, главным образом холинэстеразу – фермент, ответственный за передачу нервных импульсов [3].

В табл. 3.11 представлены структурные формулы ряда наиболее распространенных ФОВ.

ТАБЛИЦА 3.11

Структурные формулы, названия и аббревиатуры\* наиболее распространенных ФОВ

Соединение	Структурная формула	Название (общепринятое)	Аббревиатура
Этил-N,N'-диметилцианофосфат		Табун	GA
Метилизопропилфторфосфат		Зарин	GB
Метилпинаколилфторфосфат		Зоман	GD
Диизопропилфторфосфат		Диизопропилфторфосфат	PF-3
Метил-O-этил-S-2-диизопропиламинофосфотиолат		VX	VX

\* Данные аббревиатуры используются в армии США.

ПХ, а также ПХ с принудительным движением элюента (OPLC) были использованы для количественного определения смеси табельных ФОВ в воздухе, воде, почве и пробах растительного и животного происхождения [4, 5].

Пробоподготовка осуществлялась согласно методикам, представленным в работе [5].

Стандартные растворы табельных ФОВ в концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  % были приготовлены в хлороформе [4].

## Условия хроматографирования [4]

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: пластинки "Kieselgel 60", 10×10 см, Art. 5626, фирмы "Merck" (Германия). Перед экспериментом пластинки промывали метанолом, высушивали при комнатной температуре и активировали при 130 °С в течение 20 мин.

Подвижная фаза: диизопропиловый эфир\* – бензол – тетрагидрофуран – *n*-гексан (10 + 7 + 5 + 11, *v/v*); фронт элюента 6,0 см; время разделения 10 мин; температура 20 °С.

## Условия хроматографирования с принудительным движением элюента [4]

Горизонтальное, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: пластинки "Kieselgel 60", 20×20 см, Art. 5721, фирмы "Merck" (Германия). Перед экспериментом пластинки промывали метанолом, высушивали при комнатной температуре и активировали при 130 °С в течение 20 мин.

Подвижная фаза: диизопропиловый эфир – бензол – тетрагидрофуран – *n*-гексан (10 + 7 + 5 + 11, *v/v*).

Установка "Chrompress", модель 25, снабженная "сэндвич-камерой" для горизонтального элюирования, фирмы "OPLC-Nit, Ltd." (Венгрия). Входное давление 50 атм, внутренний диаметр отверстия подачи элюента 0,25 мм; скорость подачи элюента 0,45 мл/мин; время разделения 7,5 мин; температура 20 °С.

## Визуализация пятен ФОВ на хроматограммах [5]

Высушенную при 20 °С хроматограмму выдерживают при 100 °С в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры и опрыскивают раствором обнаруживающего реагента (насыщенный водный раствор хлорида кобальта(III), содержащий 1,0 %

\* Обязателен тест на пероксиды.

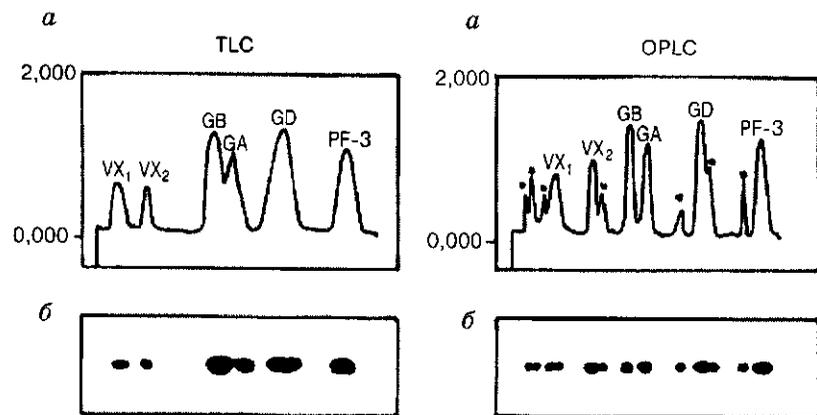


Рис. 3.32. Денситограмма (а) и хроматограмма (б) VX<sub>1</sub>, VX<sub>2</sub>, GB, GA, GD и PF-3 [4]. Получены с помощью ПХ (TLC) и ПХ с принудительным движением элюента (OPLC)

30 %-го пероксида водорода и 5,0 % гидроксида натрия); наблюдают голубые пятна на белом фоне. Предел обнаружения ФОВ 15–20 нг в хроматографической зоне.

#### Количественное определение [4]

Денситометр “Shimadzu CS 900” фирмы “Shimadzu” (Япония); режим работы – отражение; длина волны 585 нм; параметры щели 0,2 × 2,0 мм. Область линейного сигнала денситометра 30–100 нг ФОВ в хроматографической зоне.

На рис. 3.32 представлены денситограммы и хроматограммы пяти табельных ФОВ, полученные с помощью ПХ (TLC) и ПХ с принудительным движением элюента (OPLC).

#### ЛИТЕРАТУРА

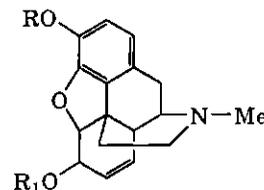
1. Scientific Method of the Verification of Chemical Disarmament. Ministry for Foreign Affairs of Finland. Helsinki, 1984. 420 p.
2. Химическая энциклопедия. М.: Советская энциклопедия. Т. 2. 1990. С. 317.
3. Хадсон Р. Структура и механизмы реакций фосфорорганических соединений. М.: Мир, 1967. 361 с.
4. Mazurek M., Wilkiewicz Z. // J. Planar Chromatogr. 1991. V. 4. P. 379–384.
5. Wilkiewicz Z., Mazurek M., Szulc J. // J. Chromatogr. 1990. V. 503. P. 293–357.

### 3.8. ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

В настоящее время во всем мире интенсифицируется незаконное производство и оборот наркотических, психотропных и сильнодействующих одурманивающих веществ.

В этой связи усиливается контроль за производством, распространением и употреблением любого наркотического вещества. Анализ наркотических, психотропных, сильнодействующих одурманивающих веществ имеет специфические особенности, главной из которых является скрининг объектов неизвестного состава [1–3].

ПХ была использована для разделения и определения содержания опиатов в некоторых видах растительного сырья и синтетических препаратов.



- 1) R=R<sub>1</sub>=H (морфин)
- 2) R=R<sub>1</sub>=MeCO (героин)
- 3) R=H  
R<sub>1</sub>=MeCO (6-ацетилморфин)
- 4) R=Me  
R<sub>1</sub>=H (кодеин)

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки “Kieselgel 60” на стеклянной подложке, 10×10 см, фирмы “Merck” (Германия), Art. 5631. Перед экспериментом пластинки промывали и активировали, как описано в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: метанол – хлороформ – вода (12 + 8 + 2, v/v); фронт элюента 6,0 см; время разделения 20 мин; температура 20 °С.

#### Визуализация пятен опиатов на хроматограммах

Высушенную хроматограмму (10 мин, 20 °С) погружают на 4 с в раствор с обнаруживающим реагентом (100 мг натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфокислоты + 40 мл 95 %-го этанола + 20 мл 70 %-й хлорной кислоты и 2,0 мл раствора формальдегида), высушивают (15 мин, 20 °С) и нагревают в течение 10 мин при 70 °С; наблюдают синие пятна на светло-зеленом фоне.

Величины R<sub>f</sub> опиатов составляют [4]:

Морфин	0,25–0,30	6-Ацетилморфин	0,40–0,45
Кодеин	0,30–0,35	Героин	0,50–0,55

Предел обнаружения 10–20 нг/пятно.

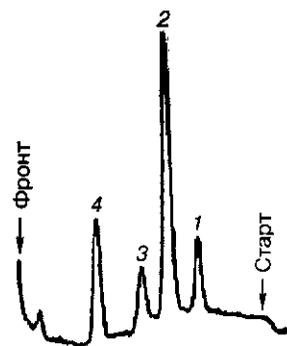


Рис. 3.33. Денситограмма смеси четырех опиатов при содержании 50 нг/пятно:

1 — морфин; 2 — кодеин; 3 — 6-ацетилморфин; 4 — героин

### Количественное определение

Денситометр "TLC Scanner II" фирмы "Camag" (Швейцария). Режим работы — отражение; длина волны 610 нм, параметры щели 0,2 × 3,0 мм. Предел детектирования 25–30 нг/пятно. Область линейного сигнала денситометра от 25–30

до 200–250 нг в хроматографической зоне.

На рис. 3.33 представлена денситограмма модельной смеси четырех опиатов [4]. Эти данные можно использовать для определения содержания опиатов как в препаратах, выделенных из растительного сырья, так и в смесях, полученных синтетическим путем.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Еремин С. К., Изотов В. Н., Веселовская Н. В. Анализ наркотических средств. М.: Мысль, 1993. С. 105–122.
2. Гаевский А. В., Савенко В. Г., Семкин Е. П. Криминалистическое исследование опийного и масличного маков. М.: МВД РФ, 1991. С. 3–30.
3. Дегтерев Е. В., Гаевский А. В., Зенкова Е. А. // Хим.-фарм. журн. 1998. Т. 32. С. 48–54.
4. Patzsch K., Funk W., Schultz H. // GIT Fachz. Supplement 3 "Chromatographie", 1998. P. 83–91.

## 3.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ ПОЛИСТИРОЛОВ В ПРЕПАРАТАХ БЛОКСОПОЛИМЕРОВ (ПОЛИСТИРОЛ–ПОЛИМЕТИЛМЕТАКРИЛАТ)

Исследования полимеров и блоксополимеров с помощью метода жидкостной хроматографии впервые было начато в 70–80-х годах в ИВС АН СССР [1–6]. Методом планарной хроматографии было осуществлено разделение олигостиролов различной молекулярной массы. Проведено микропрепаративное выделение индивидуальных олигомергомологов, а затем с помощью денситометрии — количественное определение содержания отдельных фракций [7] в смеси олигостиролов с различной молекулярной массой [8].

ПХ была также использована для количественного определения примесей полистиролов (PS), имеющих различную молекулярную массу в блоксополимерах (BC) полистирол — полиметилметакрилат (PS — PMMA) [1]. В качестве стандартных образцов использовали PS фирмы "Atlex" (США); блоксополимеры PS — PMMA — лабораторные препараты.

### Условия хроматографирования [1]

Восходящее, одномерное элюирование.

Неподвижная фаза: высокоэффективные ТСХ-пластинки на стеклянной подложке, 10 × 10 см, покрытые слоем силикагеля КСКГ (диаметр пор 120 Å, размер частиц 8–12 мкм, толщина слоя 120–130 мкм, связующий материал — силиказоль (ИВС АН СССР) [8]. Перед анализом пластинки промывали и активировали так же, как в примере 3.1.1.

Подвижная фаза: циклогексан — толуол — метилэтилкетон (91 + 10 + 8, v/v), фронт элюента 9,0 см; время разделения 20 мин; температура 20 °С.

### Визуализация пятен полистиролов и блоксополимеров (полистирол — полиметаметилакрилат) на хроматограммах

Высушенные хроматограммы (15 мин, 20 °С) опрыскивают растворами обнаруживающих реагентов (а) или (б).

а) Хроматограмму опрыскивают 3 %-м раствором марганцовокислого калия в конц. серной кислоте и выдерживают в течение 5–10 мин при температуре 180 °С. Наблюдают черные пятна полимеров на сером фоне. Предел обнаружения PS 0,2 мкг в хроматографической зоне.

б) Хроматограмму опрыскивают 10 %-м водным раствором гидроксида калия и в течение 10–15 мин выдерживают при температуре 150 °С. Наблюдают темные пятна полимеров на сером фоне. Предел обнаружения полимеров 1 мкг в хроматографической зоне.

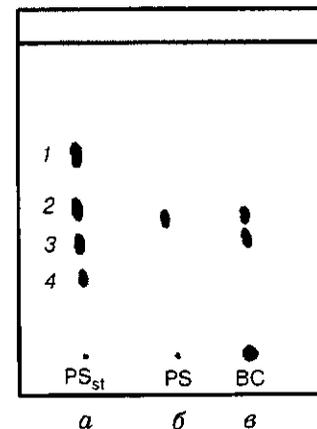


Рис. 3.34. Хроматограмма:

а — PS<sub>n</sub> с мол. массой, Да: 2 · 10<sup>4</sup> (1); 5 · 10<sup>4</sup> (2); 1,11 · 10<sup>5</sup> (3) и 2 · 10<sup>4</sup> (4); б — PS с мол. массой 5 · 10<sup>4</sup> Да; в — BC, содержащего примеси PS

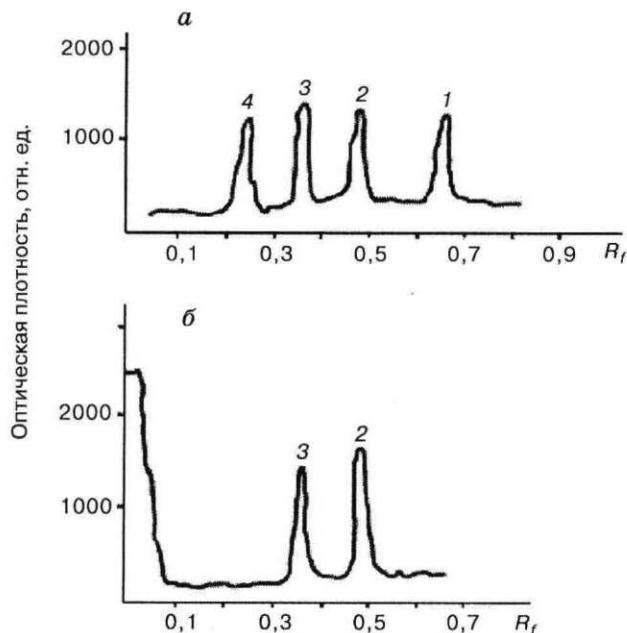


Рис. 3.35. Денситограмма:  
 а – PS<sub>st</sub>; б – примеси полистиролов, содержащиеся в ВС

На рис. 3.34 представлена хроматограмма полистирольных стандартов (PS<sub>st</sub>) 2,5 мкг в каждом из пятен (а), полистирола (PS) (б) и блоксополимера (ВС) полистирол – полиметилметакрилат, содержащего примеси гомополимера полистирола (в).

#### Количественное определение

Денситометр “Shimadzu CS-910” фирмы “Shimadzu” (Япония); режим работы – отражение; двуволновое сканирование  $\lambda_1 = 450$  нм и  $\lambda_2 = 570$  нм; параметры щели 0,12×0,12 мм. Пределы детектирования PS и ВС PS – ПММА 0,5 мкг в хроматографической зоне.

На рис. 3.35 представлена денситограмма: PS – стандартная смесь (а) и ВС PS – ПММА, содержащего примеси PS (б).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gankina E. S., Efimova I. I., Kever J. J., Belenkii B. G. // Talanta. 1987. V. 34. P. 167–174.

## Если Химия уже не игра для Вас



и Вы руководите лабораторией или в ней работаете, то мы откроем Вам заново все возможности ТСХ: экономичность, экспрессность, минимум пробоподготовки и наглядность в сочетании с современным швейцарским оборудованием и 50-летним опытом компании в стандартизации метода.

**CAMAG** Лидер в Планарной хроматографии

CAMAG (Швейцария) [www.camag.com](http://www.camag.com)



Россия, 199004, Санкт-Петербург, В. О. Большой пр., 31  
Тел./факс: (812) 323-7101, 323-6030, 323-6401  
E-mail: [lenchrom@hq.macro.ru](mailto:lenchrom@hq.macro.ru)  
[www.lenchrom.spb.ru](http://www.lenchrom.spb.ru), [www.lenchrom.ru](http://www.lenchrom.ru)

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ РАЗДЕЛЕНИЯ (ДЕНСИТОМЕТРИЯ)

### Оптический денситометр "ДенСкан-04" (гос. реестр № 19834-00).

Денситометр для ТСХ с программным обеспечением – наиболее эффективная Система для денситометрии. Прибор разработан для количественной обработки объектов ТСХ и электрофореза размером до 15 × 15 см.

Сканирование выполняется в режиме отражения

Спектральные характеристики:  $\lambda_{\max} = 254 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\max} = 365 \text{ нм}$  и  $\lambda = 400\text{--}800 \text{ нм}$

Время ввода кадра изображения – не более 1 с

Время обмера хроматограммы – в среднем 2–5 мин

Относительное СКО площади пятен, % – не более 5

Относительная погрешность оценки координат ( $R_f$ ), % – не более 2

Программное обеспечение позволяет выполнить полный цикл процедур, связанных с количественной обработкой хроматограмм, интегрирование, калибровку, количественные расчеты, вывод результата на принтер в виде изображений обрабатываемой пластины, таблицы результатов и калибровочных кривых.

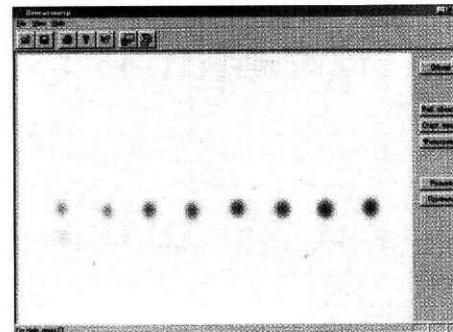


## КОМПЬЮТЕРНАЯ ОБРАБОТКА ТСХ АНАЛИЗА И ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ. ПРОГРАММА "DENS" ДЛЯ WINDOWS

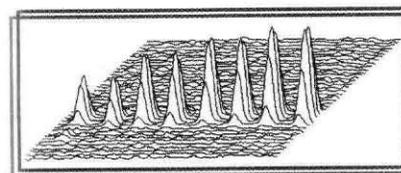


### Ввод изображений хроматограмм

Первичный ввод производится:  
1) с помощью специализированной видеокамеры – для хроматограмм, анализируемых как в видимом свете, так и при ультрафиолетовом облучении, а также 2) посредством стандартного сканера (для большинства типов тонкослойных хроматограмм, анализируемых в видимом свете). Введенное изображение можно наблюдать не только в прямом, но и в негативном отображении.

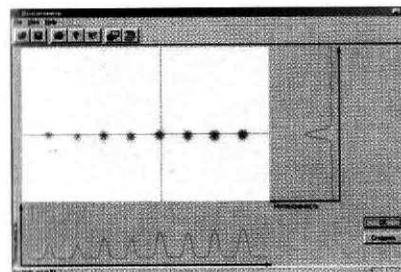


Главное окно с введенным изображением хроматограммы



### Отображение рельефа хроматограммы

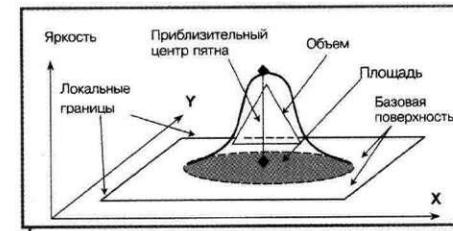
Окно трехмерного изображения можно вынести на печать, нажав кнопку  на панели инструментов.



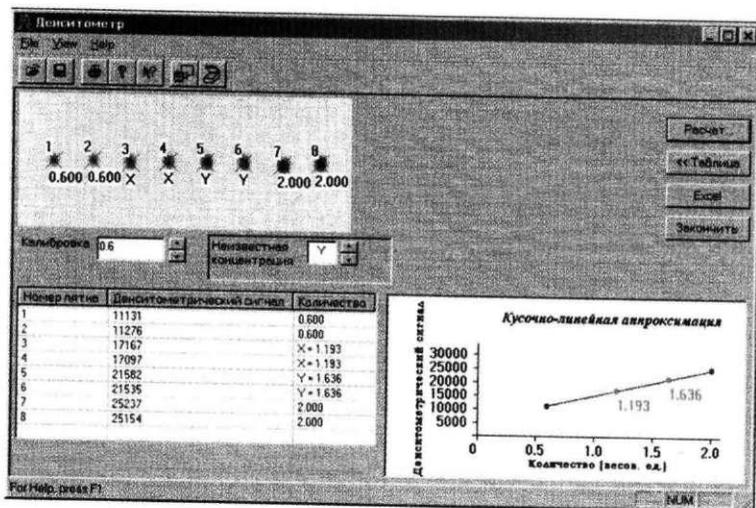
Наблюдение профилей хроматограммы

### Автоматическое и ручное детектирование пятен

Количественная оценка пятна происходит по двум характеристикам: по площади пятна и его "объему" в пространстве, в качестве третьей используется яркость (степень окрашенности) пятна.

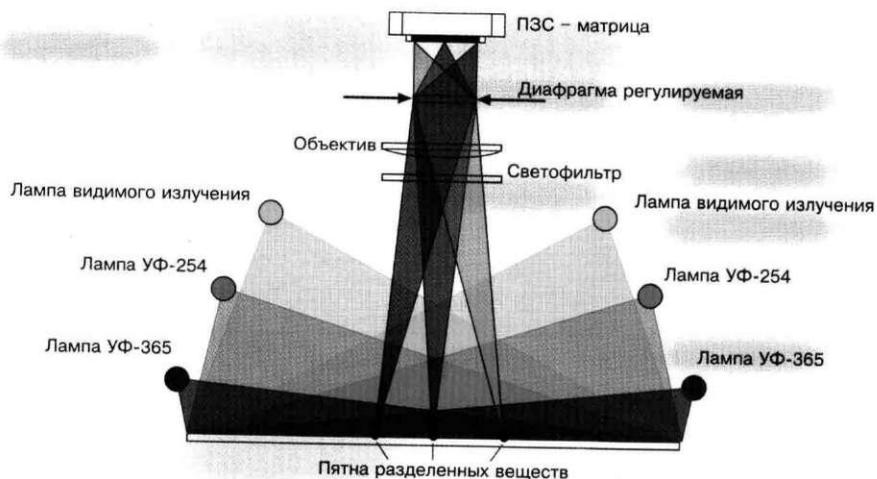


Локальные границы на базовой поверхности вокруг пятна

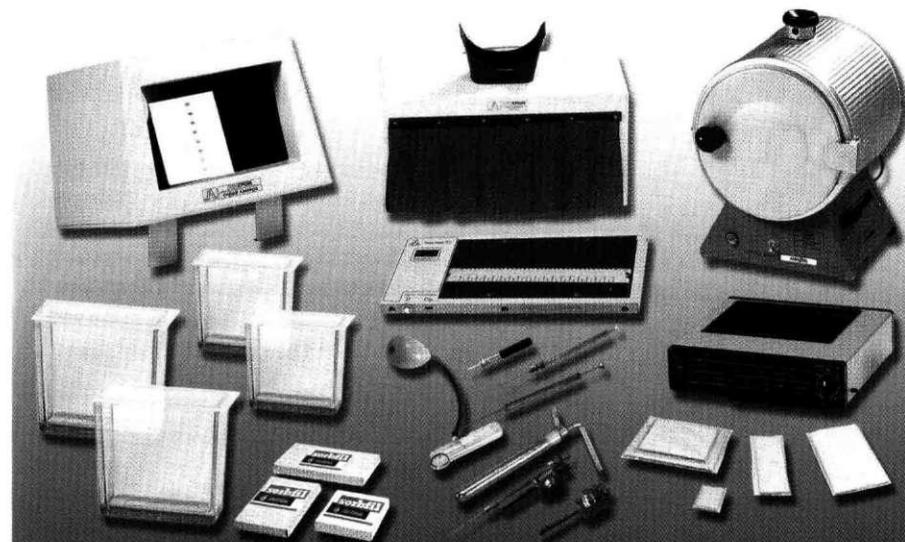


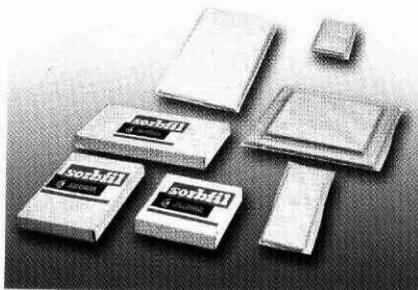
Результаты расчета встроенным алгоритмом

## ОПТИЧЕСКАЯ СХЕМА ДЕНСИТОМЕТРА "ДЕНСКАН-04"



- Спрей-камера (коррозионностойкая) 1 шт.
  - УФ-кабинет 254/365 1 шт.
  - Столик для нанесения образцов (с подогревом) 1 шт.
  - Пульверизатор для агрессивных жидкостей 1 шт.
  - Пульверизатор с резиновой грушей 1 шт.
  - Камера хроматографическая средняя (для пластин 15×15 см) 2 шт.
  - Камера хроматографическая малая (для пластин 10×10 см) 2 шт.
  - Микрошприц V= 1 мкл 1 шт.
  - Микрошприц V= 10 мкл 1 шт.
  - Сушильный шкаф ШСУ 1 шт.
  - Тепловентилятор "Ветерок-2С" 1 шт.
  - Капилляры (стеклянные) V= 1 мкл 50 шт.
  - Микрокап (держатель капилляров) 1 шт.
- ТСХ-пластины**
- силикагель фр. 5–20 мкм, стекл. подложка 10×10 см, связующее силиказоль 20 шт.
  - "Сорбфил" ПТСХ-П-А, фр. 5–17 мкм, полимерная подложка 10×10 см, связующее силиказоль 50 шт.
  - "Сорбфил" ПТСХ-П-А-УФ, фр. 5–17 мкм, полимерная подложка 10×10 см, связующее силиказоль, УФ-254 50 шт.
  - "Сорбфил" ПТСХ-АФ-А-УФ, фр. 5–17 мкм, полимерная подложка 10×10 см, связующее силиказоль, УФ-254 50 шт.
  - "Сорбфил" ПТСХ-П-В-УФ, фр. 8–12 мкм, полимерная подложка 10×10 см, связующее силиказоль УФ-254 50 шт.





Пластины для тонкослойной хроматографии аналитические и высокоэффективные на полимерной, стеклянной и алюминиевой подложке разных размеров (5×10, 10×10, 10×15 и 20×20 см), произведенные в России и за рубежом (Merck, Германия). В ассортимент входят пластины из силикагеля с прямой и обратной фазой, а также из целлюлозы и оксида алюминия.

Пластины на стеклянной подложке из силикагеля, произведенные по техно-

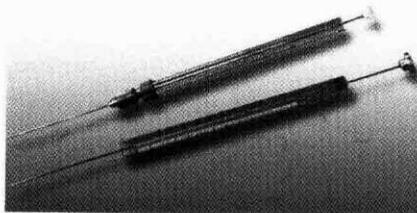
логии "Ленхром", выдерживают регенерацию в концентрированной хромовой смеси до 15 раз, что позволяет их многократно использовать.

**ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ НАНЕСЕНИЯ ОБРАЗЦОВ**

**Торрированные стеклянные капилляры**



**Микрошприцы для жидкостной, газовой и тонкослойной хроматографии**

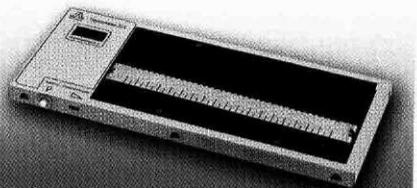


**Шприцевой дозатор "MULTISTEP-50" в комплекте с микрошприцем V = 1 мкл (аналог РВ-600 фирмы Hamilton)**



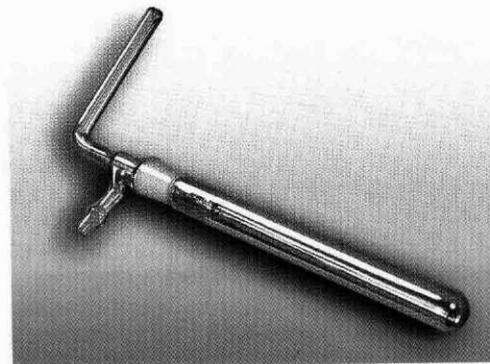
**Столик для нанесения образцов на пластины (с подогревом)**

Использование для нанесения проб на пластины столика с подогревом дает возможность получения пятен стартовых зон минимального размера (2-3 мм), что необходимо для более эффективного разделения многокомпонентных смесей при хроматографии.



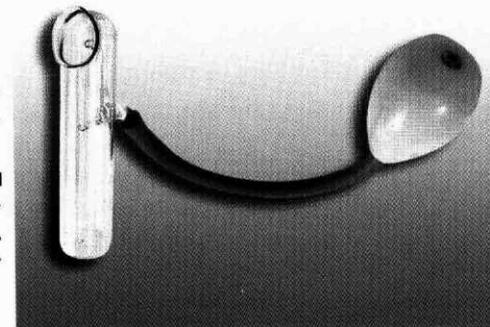
**Пульверизатор для агрессивных жидкостей**

Благодаря конструктивным особенностям пульверизатор безопасен при работе с агрессивными (н-р, концентрированные кислоты и щелочи) жидкостями. Пульверизатор может работать как с использованием резиновой груши (маловязкие жидкости), так и с использованием сжатого воздуха, что позволяет распылять вязкие жидкости.



**Пульверизатор для маловязких жидкостей**

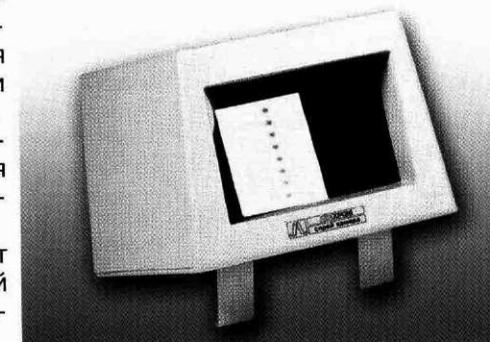
Пульверизатор работает с использованием резиновой груши. Пульверизатор используют для распыления маловязких и неагрессивных жидкостей, т. е. водных и спиртовых растворов.

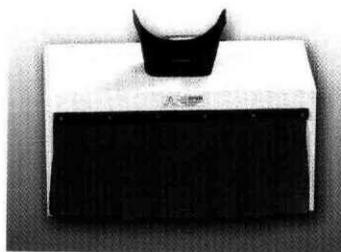


**Спрей-камера**

Устойчивая к агрессивным средам спрей-камера предназначена для окрашивания хроматограмм методом орошения (опрыскивания) различными детектирующими реагентами. Камера гарантирует безопасность процесса распыления вредных для организма человека веществ.

Камера, по желанию, может быть укомплектована гибкой трубой для соединения с вытяжной вентиляцией.





УФ-кабинет 254/365

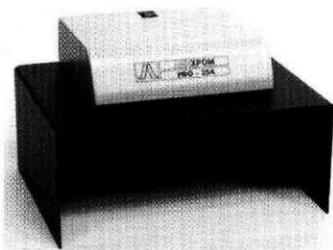
Для идентификации тонкослойных хроматограмм требуется ультрафиолетовое освещение двух типов:

– длинноволновое, с длиной волны 365 нм – под которым разделенные вещества на пластинах флюоресцируют яркими пятнами, часто разного цвета, на темном фоне. Чувствительность детектирования в таком свете увеличивается с ростом интенсивности облучения;

– коротковолновое, с длиной волны 254 нм – под которым вещества, адсорбируя свет, становятся видимыми. Эти вещества выглядят как темные пятна на ярком зеленом фоне пластины.

УФ-кабинеты фирмы НТЦ "Ленхром" разработаны специально для лабораторий ТСХ. Однако они могут использоваться и для решения других задач: проверки подлинности документов и денежных знаков, в минералогии, археологии, криминалистике и др.

Лампы помещены в защитный кожух, не пропускающий видимый свет, что позволяет исследовать хроматограммы в незатененных помещениях, сохраняя при этом высокую чувствительность. Выпускаются УФ-кабинеты двух типов: **УФ-кабинет 254/365, УФО-254.**



УФО-254

### ПОРТАТИВНЫЙ НАБОР ДЛЯ ТСХ



Фен "Ведуга"	1 шт.
Камера хроматографическая для пластин 10×10 см	1 шт.
Пульверизатор для агрессивных жидкостей	1 шт.
Пульверизатор с резиновой грушей	1 шт.
Пластины "Сорбфил" 10×10 см (50 шт./уп.)	1 шт.
Капилляры, V = 1 мкл	25 шт.
УФО-254	1 шт.
Микрокап (держатель капилляров)	1 шт.

2. Kurenbin O. I., Kever J. J., Malakhova I. I., Belenkii B. G. // J. Planar Chromatogr. 1990. V. 3. P. 68–72.
3. Vilenchik L. Z. Modern Liquid Chromatography of Macromolecules. Amsterdam: Elsevier, 1983. 338 p.
4. Нестеров В. В., Красиков В. Д., Бельский Б. Г. // Высокомолекул. соед. 1978. Т. А20. С. 2230–2235.
5. Нестеров В. В., Замойская Л. В., Красиков В. Д. // Высокомолекул. соед. 1983. Т. А25. С. 2561–2567.
6. Belenkii B. G., Gankina E. S. // J. Chromatogr. 1977. V. 141. P. 13–20.
7. Балабанович В. Р., Бельский Б. Г. и др. // Бюлл. изобрет. 1968. V. 25. Authors certificate 224138.
8. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С. // Биорг. хим. 1984. Т. 10. С. 244–250.

### 3.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ

В настоящее время ПХ широко применяется и в неорганическом анализе [1]. В данном примере рассматривается разделение и количественное определение катионов щелочноземельных металлов, а также меди и никеля [2–5].

#### Условия хроматографирования

Восходящее, одномерное элюирование в насыщенных камерах; время насыщения 30 мин; температура 20 °С.

Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки на стеклянной подложке, 10×10 см, "Cellulose", фирмы "Merck" (Германия), Art. 5787. Перед экспериментом пластинки были промыты подвижными фазами, высушены и активированы при 110 °С в течение 30 мин.

Подвижные фазы:

а) ацетон – 25 %-й раствор азотной кислоты (35 + 15, v/v) для определения катионов никеля, меди и бериллия;

б) метанол – 25 %-й раствор соляной кислоты (80 + 20, v/v) для определения катионов щелочноземельных металлов [6].

Фронт элюента (а) и (б) – 7,0 см, время разделения 25 мин, температура 20 °С.

#### Визуализация пятен катионов на хроматограммах

Высушенные хроматограммы (20 мин, 20 °С) погружают на 1 с в кювету с раствором обнаруживающего реагента (100 мг ализарина + 100 мл 95 %-го этанола), высушивают на воздухе и на 1,0 мин помещают в хроматографическую камеру с перегородкой в центре дна, в одном из отсеков которой содержится раствор 25 %-го водного аммиака. Наблюдают:

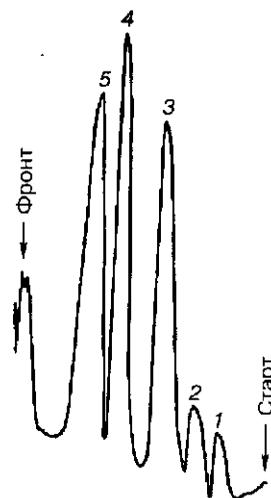


Рис. 3.36. Денситограмма смеси катионов щелочноземельных металлов; содержание каждого компонента – 2,0 мкг

Подвижная фаза (б): 1 –  $Ba^{+2}$ ; 2 –  $Sr^{+2}$ ; 3 –  $Ca^{+2}$ ; 4 –  $Mg^{+2}$ ; 5 –  $Be^{+2}$

подвижная фаза (а):

$Ni^{+2}$  – бледно-фиолетовые пятна,  $R_f = 0,45-0,50$ ;

$Cu^{+2}$  – фиолетовые пятна,  $R_f = 0,55-0,60$ ;

$Be^{+2}$  – фиолетовые пятна,  $R_f = 0,80-0,85$ ;

подвижная фаза (б):

$Ba^{+2}$  – светло-фиолетовые пятна,  $R_f = 0,15-0,20$ ;

$Sr^{+2}$  – светло-фиолетовые пятна,  $R_f = 0,30-0,35$ ;

$Ca^{+2}$  – фиолетовые пятна,  $R_f = 0,50-0,55$ ;

$Mg^{+2}$  – фиолетовые пятна,  $R_f = 0,75-0,80$ ;

$Be^{+2}$  – фиолетовые пятна,  $R_f = 0,93-0,98$ .

Предел обнаружения 30–50 нг.

### Количественное определение

Денситометр “Desaga” CD-60 фирмы “Desaga” (Германия); режим работы – отражение; длина волны 550 нм; параметры щели 0,3×4,0 мм. На рис. 3.36 представлена денситограмма катионов щелочноземельных металлов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Вольнец М. П.* Количественная тонкослойная хроматография в неорганическом анализе. М.: Наука. 1993. 225 с.
2. *De Viries, Schultz G. P., Van Dalen E.* // *J. Chromatogr.* 1964. V. 13. P. 119–128.
3. *Strivatova S. P., Bhushan R., Chauhan R. S.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1985. V. 8. P. 571–574.
4. *Gagliardi E., Likussar W.* // *Microchim. Acta.* 1965. P. 765–769.

### КРАТКИЙ АНГЛО-РУССКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Одной из отраслей науки с наиболее быстрыми темпами развития является хроматография, сформировавшаяся в самостоятельную научную дисциплину на стыке аналитической, физической, органической химии, химии поверхности и макромолекул и приборостроения.

В настоящее время количество журналов по хроматографии, издаваемых за рубежом, превысило десять, причем эта цифра увеличивается с каждым годом за счет более узкой специализации. Подавляющая часть научных работ публикуется на английском языке, который стал также общепризнанным языком международных симпозиумов и конференций.

Предлагаемый “Краткий англо-русский словарь терминов, используемых в планарной хроматографии”, предназначен для студентов, аспирантов и научных сотрудников, специализирующихся в области хроматографии.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Новый большой англо-русский словарь / Ред. Э. М. Медникова.* М.: Русский язык. 1993. Т. 1–3.
2. *Указатель основных терминов по хроматографии на русском и английском языках.* М.: ВИНТИ, 1993. 58 с.
3. *Англо-русский словарь по химии и химической технологии / Ред. В. В. Кафаров.* М.: Русский язык, 1986. 581 с.
4. *Кедринский В. В.* Англо-русский словарь по химии и переработке нефти. М.: Русский язык, 1979. 767 с.
5. *Англо-русский политехнический словарь / Под ред. А. Е. Чернухина.* М.: Советская энциклопедия, 1971. 671 с.
6. *Химический словарь на четырех языках – англо-немецко-польско-русский / Ред. С. Скобецкая.* Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1969. 724 с.
7. *Angel H. P.* Dictionary of Chromatography, Huethig, Verlag, Gmb. H., Heidelberg, 1984. 196 p.

## А

Absorbtion	поглощение (абсорбция)
Absorbtion capacity	абсорбционная емкость
Active carbon	активированный уголь
Active solid	адсорбент
Adhesion	адгезия
Adsorbability	адсорбционная способность
Adsorbate	адсорбированное вещество
Adsorbent	адсорбент
Adsorbtion	адсорбция
Adsorbtion capacity	адсорбционная емкость
Adsorbtion chromatography	адсорбционная хроматография
Affinity chromatography	аффинная хроматография
Alumina	оксид алюминия
AMD-system	прибор для проведения многократного хроматографического элюирования в автоматическом режиме, используемый в планарной хроматографии
Anion-exchange resin	анионообменник
Application	нанесение пробы на хроматографическую пластинку
Applicator	устройство для нанесения пробы на хроматографическую пластинку
Ascending chromatography	восходящая хроматография
Autosampler	автоматический дозатор

## В

Background noise	фоновый шум
Band	зона, полоса
Band broadening	размывание зоны
Band tailing	размывание нижней границы зоны
Base line	нулевая (базовая) линия
Base line drift	дрейф нулевой линии
Binary phase	бинарная фаза
Binder	связующее вещество
BN-chamber	БН-камера (ТСХ-камера для непрерывного элюирования)
Bonded phase	привитая фаза
Broadening	размывание (уширение)
Buffer solution	буферный раствор

## С

Calibration	калибровка (градуировка)
Calibration curve	калибровочная (градуировочная) кривая
Calibration factor	калибровочный коэффициент
Calibration standarts kit	набор веществ-стандартов для проведения градуировки (калибровки)
Capacity	емкость
Capacity factor	коэффициент емкости

Capillary chromatography	капиллярная хроматография
Capillary electrophoresis	капиллярный электрофорез
Carbon black	сажа
Cation exchange	катионный обмен
Cation-exchange paper	катионообменная бумага
Cation-exchange resin	катионообменник
Cellulose	целлюлоза
Centrifugal chromatography	центробежная хроматография
Chamber	камера (хроматографическая)
Chamber saturation	насыщение камеры
Charcoal	древесный уголь
Chromatogramm	хроматограмма
Chromatographic analysis	хроматографический анализ
Chromatographic paper	хроматографическая бумага
Chromatographic peak	хроматографический пик
Chromatographic separation	хроматографическое разделение
Chromatographic zone	хроматографическая зона
<b>Chromatography</b>	<b>хроматография</b>
adsorbtion	адсорбционная
affinity	аффинная
ascending	восходящая
high performance	высокоэффективная
capillary	капиллярная
column	колоночная
continuous	непрерывная
continuous flow	проточная
descending	нисходящая
direct (normal) phase	нормальнофазовая
elution	проявительная
exclusion, size exclusion	экслюзионная
frontal	фронтальная
gas	газовая
gas-liquid	газо-жидкостная
gel-permeation	гельпроникающая (ситовая)
gradient	градиентная
gradient thin-layer	градиентная тонкослойная
horizontal	горизонтальная
ion	ионная
ion-exchange	ионообменная
ion-pair	ионпарная
isocratic	с изократическим элюированием
ligand-exchange	лигандообменная
liquid (HPLC)	жидкостная (ВЭЖХ)
low temperature	низкотемпературная
micellar	мицеллярная
micro	микро
multi-dimentional	многомерная
multiple thin-layer	тонкослойная с многократным элюированием

one-dimensional	одномерная
over pressure	при повышенном давлении
paper	бумажная
partition	распределительная
planar	планарная
preparative	препаративная
radial	радиальная (круговая)
reversed-phase	обращеннофазовая
stepwise	ступенчатая
thin layer	тонкослойная
two-dimentional	двумерная
Coating	нанесение сорбента (на подложку)
Cohesion	когезия
Color reagent	обнаруживающий реагент
Colorless	бесцветный
Complexation chromatography	хроматография с комплексообразованием
Complexing resin	комплексообразующий ионит
Contamination	загрязнение

**D**

Date hendling system	система обработки данных
Dead time	"мертвое время"
Dead volume	"мертвый объем"
Degree of loading	степень пропитки
Densitometer	денситометр (сканер)
Derivatization	дериватизация (синтез производного)
Desorbition	десорбция
Detection	детектирование (обнаружение)
Detection limit	предел детектирования
Detector	детектор
Detector input	входной сигнал детектора
Detector linearity	область линейного сигнала детектора
Detector noise	шум детектора
Detector output	выходной сигнал детектора
Detector response	отклик (сигнал) детектора
Detector time-constant	постоянная времени детектора
Detector sensibility	чувствительность детектора
Detector stability	стабильность детектора
Development	элюирование, проявление (хроматограмм)
Development rate	скорость элюирования
Development sandwich chamber	хроматографическая сэндвич-камера
Development solvent	подвижная фаза (элюент)
Development technique	способ элюирования (проявления)
Development two-dimentional	двумерное элюирование (проявление)
Diffusion coefficient	коэффициент диффузии
Dip	погружать (хроматограмму)
Dipping chamber	камера, предназначенная для погружения хроматограмм в раствор обнаруживающего реагента

Dipping technique	метод погружения
Displacement	вытеснение (замещение)
Displacer	вытеснительный агент
Distribution coefficient	коэффициент распределения
Double-through chamber	хроматографическая камера с перегородкой в центре дна

**E**

Edge (of plate)	край (пластинки)
Electrochromatography	электрохроматография
Electrophoresis	электрофорез
Electrophoretic chromatography	электрофоретическая хроматография
Electrophoretic mobility	электрофоретическая подвижность
Electrophoregramm	электрофореграмма
Eluate	элюат
Eluent	элюент (подвижная фаза)
Elution behaviour	особенности (закономерности) элюирования
Error sources	источники погрешностей
Extract	экстракт (экстрагировать)

**F**

Film thickness	толщина пленки
Fixed phase	неподвижная фаза
Flow direction	направление потока
Flow rate	скорость потока
Fluorescence detector	флуоресцентный детектор
Fraction collector	коллектор фракции
Fraction purity	чистота фракции
Fronting	размывание фронта

**G**

Grain size (partical size)	размер частиц
Guard column	предколонка

**H**

Hard date handling	оборудование систем обработки данных
Heart cutting	"вырезание" части хроматографического пика
Height equivalent to a theoretical plate (HEPT)	высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)
High pressure pump	насос высокого давления
Hold-up time	время удерживания несорбирующегося компонента ("мертвое время")
Horizontal chromatography	горизонтальная хроматография
Hydrophobicity	гидрофобность

**I**

Immersion	погружение
Immersion device (Dip tank)	прибор, предназначенный для погружения хроматограммы в раствор (обнаруживающего реагента)

Injection volume	объем вводимой пробы
Injector	инжектор
Integrator	интегратор
Interface	поверхность раздела (интерфейс)
Interpartical porosity	пористость слоя
Ion chromatography	ионная хроматография
Ion-exchange	ионный обмен
Ion-exchange capacity	ионообменная емкость
Ion-exchange paper	ионообменная бумага
Ionic strenght	ионная сила
<b>J</b>	
Jar (tank, vessel)	камера (хроматографическая)
<b>К</b>	
Kieselguhr	кизельгур
<b>L</b>	
Lamp power supply	блок питания ламп
Layer equilibration	равновесное насыщение слоя
Layer thickness	толщина слоя
Light sources	источники света
Limit of detection	предел детектирования
Limit of determination	предел обнаружения
Linarity range	диапазон линейности
Liquid-adsorbtion chromatography	жидкостная адсорбционная хроматография
Liquid phase	жидкая фаза
Liquid sample injector	дозатор для жидких проб
<b>М</b>	
Macroporous polymer sorbent	макропористый полимерный сорбент
Mark (template for marking and sample application)	разметка (линейка для размещения и нанесения проб)
Marker (reference substance)	маркер (вещество-стандарт)
Microporous	микропористый
Microsyringe	микрошприц
Mixer	смеситель
Mixture	смесь
Modified active solid	модифицированный сорбент
Molecular mass calibration	калибровка по молекулярным массам
Molecular sieve	молекулярное сито
Molecular size distribution	распределение молекул по размерам
Monolayer	монослой
Multiple elution	многократное элюирование
Multi-wavelength scanning	сканирование, выполненное при различных величинах длин волн
<b>N</b>	
Noise level	уровень шума
Non polar	неполярный

Non specific adsorbent	неспецифический адсорбент
Normal phase	нормальная фаза
Number of theoretical plates	число теоретических тарелок
<b>O</b>	
"Off-line" chromatography	хроматография в режиме с разделением времени
"On-line" chromatography	хроматография в режиме реального времени
"On-line" connection of densitometer and computer	непосредственное соединение денситометра с компьютером (работа в режиме реального времени)
Operating conditions	рабочий режим
Optically active stationary phase	оптически активная (энантиомер-селективная) неподвижная фаза
Oven	сушильный шкаф
Overlapped peaks	перекрывающиеся пики
Overloading plate	перегруженная пластинка
Outlet pressure	выходное давление
<b>P</b>	
Paper electrophoresis	электрофорез на бумаге
Particle size	размер частиц
Particle size distribution	распределение частиц по размерам
Partition coefficient	коэффициент распределения
Peak	пик
Peak area	площадь пика
Peak asymmetry	асимметрия пика
Peak base	основание пика
Peak broadening	размывание (уширение) пика
Peak Gaussian model	гауссова форма пика
Peak height	высота пика
Peak inversion	инверсия пика
Peak maximum	максимум пика
Peak shape	форма пика
Peak tailing	размывание нижней границы пика
Peak width at base	ширина пика у основания
Peak width at half high	полуширина пика (ширина пика на половине высоты)
Peaks resolution	разрешение пиков
Perfomance	эффективность
Phase ratio	отношение объемов фаз
Photodocumentation	фотодокументирование
Plate	тарелка (теор.), пластинка хроматографическая
Plate box	контейнер для ТСХ-пластинок
Plate coater	устройство для нанесения сорбента на пластинку (подложку)
Plate high	высота теоретической тарелки
Plate number	число теоретических тарелок

Polarity	полярность
Polydispersity	полидисперсность
Pore diameter	диаметр пор
Pore size	размер пор
Pore size distribution	распределение по размерам пор
Postchromatographic derivatization	дериватизация соединений на пластинке после проведения элюирования
Precoated layers	готовые пластинки
Productivity	производительность

**Q**

Qualitative chromatographic analysis	качественный хроматографический анализ
Quantitative chromatographic analysis	количественный хроматографический анализ

**R**

Range of calibration	диапазон калибровки (градуировки)
Reagent sprayer (atomizer)	мелкодиспергирующий пульверизатор
Recorder	самописец
Resin layer	ионообменный слой
Resolution	разрешение
Retention	удерживание
Retention time	время удерживания
Reversed phase	обращенная фаза
Reversed phase high performance liquid chromatography	обращеннофазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

**S**

Sample	проба (образец)
Sample application (Sample dosage)	нанесение проб
Sample pads	листы фильтровальной бумаги (определенного размера) для выкладывания стенок хроматографической камеры для улучшения насыщения
Sample precision	правильность (точность) дозирования пробы
Sample reproducibility	воспроизводимость дозирования (пробы)
Sample size	размер (объем) пробы
Sample solubility	растворимость пробы
Sample syringe	шприц для нанесения проб
Sampling device	приспособление для ввода пробы
Scale up	масштабирование
Selective elution	селективное элюирование
Selectivity	селективность
Selectivity coefficient	коэффициент селективности
Sensitivity	чувствительность
Separation	разделение
Separation coefficient	коэффициент разделения
Separation efficiency	эффективность разделения

Separation factor	степень разделения
Separation number	число разделения
Separation power	разделительная способность
Sieve chromatography	хроматография на молекулярных ситах
Signal/noise ratio (S/N)	соотношение сигнал/шум
Silica	кремнезем
Silica gel	силикагель
Silica gel plates	хроматографические пластинки на основе силикагеля
Simulation	моделирование
Slurry	суспензия
Software data handling	математическое обеспечение
Solid sample	твердая проба
Solid support	твердый носитель
Solubility	растворимость
Solvent front	фронт элюента
Solvent migration distance	расстояние, пройденное элюентом
Solvent selection	выбор растворителя
Sorbent	сорбент
Sorbtion	сорбция
Sorbtion equilibrium	сорбционное равновесие
Sorbtion properties	сорбционные свойства
Specimen	образец
Spot	пятно
Starting point (line)	стартовая точка (линия)
Stationary phase	неподвижная фаза
Stepwise chromatography	ступенчатая хроматография
Stepwise elution	ступенчатое элюирование
Support	твердый носитель
Surface modification	модификация поверхности

**T**

Tailing	образование "хвоста" в нижней части пятна
Test solution (mixture)	исследуемый раствор (смесь)
Theoretical plate	теоретическая тарелка
Thin layer chromatography	тонкослойная хроматография, ТСХ
Thin layer chromatography over pressure (OPTLC)	тонкослойная хроматография при избыточном давлении
TLC basic kit	набор принадлежностей для проведения ТСХ
TLC plate box	контейнер для хранения ТСХ-пластинок
TLC plate coater	прибор для нанесения слоя сорбента на пластинки
TLC plate heater	стол с электроподогревом поверхности для нанесения проб на ТСХ-пластинку
TLC spray cabinet	или сушки хроматограмм мини-вытяжной шкаф для опрыскивания хроматограмм растворами обнаруживающих реагентов

**КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ,  
НЕПОСРЕДСТВЕННО СВЯЗАННЫХ  
С ПОНЯТИЕМ ВАЛИДАЦИИ**

TLC sprayer	мелкодиспергирующий пульверизатор для опрыскивания хроматограмм
Tool kit	набор инструментов
Trace analysis	следовой анализ
Trace enrichment	обогащение по примесям
Trace isolation	выделение примеси
Twin through chamber	хроматографическая камера с перегородкой в центре дна

**U**

Ultraviolet spectrophotometer	ультрафиолетовый спектрофотометр
UV/VIS spectrophotometer	спектрофотометр для работы в УФ и видимой областях спектра
UV-cabinet	ультрахемиоскоп, снабженный лампами на 254 и 365 нм
Universal capillary holder	держатель для капилляров различной вместимости
UV-indicator	флуоресцентный индикатор
UV-inspection	просмотр хроматограммы в УФ-свете

**V**

Validation	валидация – подтверждение обоснованности выбора аналитического (хроматографического) метода для определения показателей и норм качества анализируемого объекта (продукта) согласно нормативной документации
Video densitometer (CCD-device)	видеоденситометр
Videoscan	видеосканирование (хроматограмм)
Viscosity effects	вязкостные эффекты
Void volume	"мертвый объем"
Volume of the stationary phase	объем неподвижной фазы

**W**

Weight-average molecular weight	усредненная молекулярная масса
Wetting of packing	смачивание сорбента

**Y**

Yield	выход, производительность
-------	---------------------------

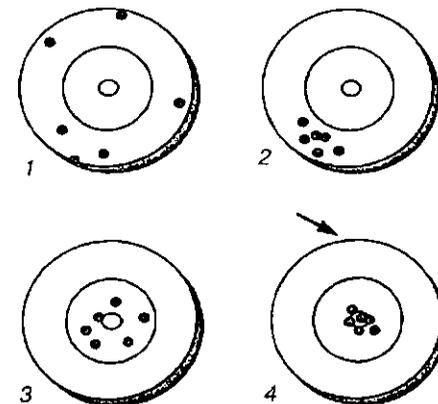
**Z**

Zona	зона
------	------

1. Правильность (точность) – **accuracy**. Правильность аналитического метода – приближенность результатов, полученных данным методом, к истинным значениям. Точность должна устанавливаться в пределах аналитической области и быть связана только со случайными ошибками. В планарной хроматографии эту величину определяют с помощью шести и более измерений пробы, взятой при трех и более концентрациях, выполненных методом парных анализов.
2. Погрешность среднего значения, связанная со систематическими ошибками, а также правильностью полученного результата, – **trueness (accuracy of the mean)**.
3. Разброс, величина, указывающая на случайные ошибки, – **precision**. Определяется повторением как минимум шести индивидуальных анализов одной и той же пробы, при этом рекомендуется использовать шесть индивидуальных навесок (точное взвешивание!) (см. схему).
4. Повторяемость, величина, указывающая на внутрилабораторный разброс результатов, – **repeatability**. Иными словами, результаты анализа сходимы, когда один и тот же аналитик произвел анализ той же пробы на том же самом рабочем месте,

Схема, иллюстрирующая влияние величины разброса и погрешности среднего значения на конечный результат измерения:

1 – величина разброса и погрешности большая; 2 – величина разброса выражена малым значением, величина погрешности большая; 3 – величина разброса большая, величина погрешности незначительная, несколько лучше, чем в случае 2; 4 – величина разброса и погрешности выражены малыми значениями, величина конечного результата измерения близка к истинному значению



используя одну и ту же аппаратуру. Воспроизводимость аналитического метода обычно выражается в виде стандартного отклонения или относительного стандартного отклонения (коэффициент вариации) для серии не менее девяти независимых измерений в пределах аналитической области, что необходимо при разработке новой аналитической методики.

5. Величина, указывающая на межлабораторный разброс результатов, – **reproducibility**. Анализ одной и той же пробы должен быть выполнен на разном оборудовании или в разных лабораториях различными аналитиками в разное время (несколько дней).
6. Линейная зависимость и аналитическая область методики – **linearity**. Линейная зависимость аналитического метода – это его способность привести к результатам испытаний, которые прямо или с использованием математических преобразований пропорциональны концентрациям целевого продукта в пробе в пределах аналитической области методики (АОМ). Она характеризуется коэффициентом регрессии, углом наклона линии регрессии. АОМ – интервал между высшей и низшей концентрацией анализируемого вещества, который определяется с высокой правильностью, воспроизводимостью и соблюдением линейной зависимости для рассматриваемого метода. АОМ обычно выражается так же, как и результаты испытаний (концентрация в %, ppm и др.)
7. Селективность, величина, отражающая то, что измерение содержания основного компонента в пробе может быть выполнено независимо от присутствующих примесей, – **selectivity**.
8. Величина, отражающая потери анализируемого вещества в процессе пробоподготовки, – **recover (recovery rate)**.
9. Величина, характеризующая способность аналитического метода оставаться неизменным при незначительных, но преднамеренных изменениях параметров метода и отражает надежность этого метода при использовании в обычных условиях, – **robustness (ruggedness)**.
10. Предел обнаружения, величина, отражающая наименьшую концентрацию, которую при заданной вероятности (обычно  $P = 0,95$ ) можно обнаружить, – **limit of detection**. Предел обнаружения обычно выражается в единицах концентрации исследуемого вещества.

В случае использования инструментальных аналитических методов (в том числе и планарной хроматографии) существенное значение имеет уровень шума базовой линии. При этом устанавливается минимальная концентрация, при которой ис-

следуемый продукт может быть надежно обнаружен. Обычно приемлемым считается соотношение сигнал/шум на уровне 2 : 1 или 3 : 1.

11. Предел количественного определения (ПКО) – **limit of determination** – параметр, используемый в количественном анализе для определения минимального количества исследуемого вещества в пробе, которое может быть определено с необходимой правильностью и воспроизводимостью в данных экспериментальных условиях. ПКО выражается в единицах концентрации. В инструментальных методах анализа (в том числе и в количественной планарной хроматографии), в которых существенное значение имеет уровень шума базовой линии, как правило, величина ПКО в 2–3 раза выше, чем предел обнаружения. Если измеряемая концентрация исследуемого вещества больше, чем предел обнаружения, но меньше, чем ПКО, нельзя считать результаты измерений достоверными. В случае, когда измеряемая концентрация превышает ПКО, можно осуществлять количественное определение.

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автография 64  
 Автосцинтиллография 64  
 Агарозные гели 185  
 Аденин см. АТФ и Тимидин  
 Аденозин см. АТФ и Тимидин  
 Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) 183 сл.  
 Адсорбционный механизм разделения 21  
 Адсорбция 21, 40  
 Азеотропные подвижные фазы 46  
 Азотистые основания 180 сл.  
 Активирование слоя сорбента 30  
 Аланин 167 сл.  
 Алкалоиды наперстянки 71, 72  
 Алкалоиды опия 71, 209 сл.  
 Альбумин сывороточный 71  
 Альдегиды 68, 70  
 Аминокислоты  
   модифицированные 68, 69  
   дансильные производные 68, 69  
   динитрофепильные производные 68  
   пезамещенные (свободные)  
     количественное определение 170, 173, 175  
     неподвижная фаза 29, 170, 173, 175  
     обнаружение 168, 172, 175, 177  
     подвижная фаза 168, 172, 175, 177  
 Андрогены 161 сл.  
*o*-, *m*- и *p*-Анизидины 72  
 Арабиноза см. Углеводы  
 Астаксантин 189  
 Афлотоксины 70  
 Ацетилсалициловая кислота 149 сл.  
 Апетогенон 70  
 Биалофос 198  
 Биоавтография 67  
 Бензойная кислота 67, 73, 195 сл.  
   производные 195  
 Блоксополимеры (полистирол-полиметилметакрилат) 209 сл.  
 Бруцин 72  
 Валидация 127  
 Валин 167 сл., 169  
 Вариокамера см. Хроматографические камеры  
 Видеоденситометрия 102  
 Видеоденситометры 103, 108 сл.  
 Винная кислота см. Карбоновые кислоты  
 Вирджиниомициновые антибиотики 141 сл.  
 Витамины группы А 190 сл.  
 Витамины группы В 188 сл.  
 Водородные связи 31  
 Воспроизводимость методов 129 сл.  
 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) 17, 18, 19, 169  
 Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) 17, 18, 19, 28, 29  
 Высота детектора 115 сл.  
 Гербициды  
   на основе мочевины 71  
   на основе фенолмочевины 70  
   пептидные 198  
 Героин см. Алкалоиды опия  
 Гликозиды наперстянки 69  
 Глицин 167, 169, 170, 172  
 Глутаминовая кислота 167, 169, 172  
 Гомолейцин 167 сл.  
 2'-Дезоксиридин см. Тимидин  
 2'-Дезоксцитидин см. Тимидин  
 Дезмикозин см. Тилозиновые антибиотики  
 Денситометрия (основы) 92  
 Денситометры 92, 95  
   видеоденситометры 102  
   двуволновые 97  
   двулучевые с разделением в пространстве 98  
   одноволновые 97  
   однолучевые 92, 95, 96  
 однолучевые с разделением во времени 98  
 радиоденситометры 106  
 сканирование 97  
 щелевые  
   с переменными параметрами щели 96  
   с постоянными параметрами щели 96, 97  
 Дериватизация 67  
   дохроматографическая 67  
   постхроматографическая 74  
 Детектирование хроматографических зон см. Денситометрия  
 Диазепам 152  
 Диизопропилфторфосфат см. Фосфорорганические отравляющие вещества  
 ДНК и ее фрагменты 185  
 Зарин см. Фосфорорганические отравляющие вещества  
 Зоман см. Фосфорорганические отравляющие вещества  
 Импрегнированные слои силикагеля 32  
 Изолейцин см. Гомолейцин  
 Инозин 180  
 Инструментальная планарная хроматография 15  
 Инсулин 15, 178 сл.  
 Ионообменные слои 32, 34  
 Калибровочные графики 120  
   линейная регрессия 120  
   полиномиальная регрессия 122  
   функции Михаэлиса – Ментем 122  
 β-Камеры 118  
 Камеры для погружения хроматограммы 77  
 Камеры ионизационные 118, 119  
 Камеры искровые 119  
 Камеры хроматографические см. Хроматографические камеры  
*o*-Карбамилфеноксиуксусная кислота см. Теофиллин  
 Карбоновые кислоты 192 сл.  
 Каротиноиды 190 сл.  
 Катионы металлов 213 сл.  
 Кетокислоты 68  
 Кетоны 68, 70  
 Кизельгур 32  
 Классификация растворителей  
   по Л. Снайдеру 43, 44  
   по В. Траппе 42  
 Консервирующие вещества 195  
 Кофеин 158 сл.  
 Ксантиксин 68, 72  
 Ксилроза см. Углеводы  
 Кумарин 69  
 Лактоза см. Углеводы  
 Лейцин 167 сл.  
 Лианол 70  
 Лизин 167 сл.  
 Линейная зависимость аналитического метода 121, 122  
 Макроцин см. Тилозиновые антибиотики  
 Межлабораторная воспроизводимость аналитического метода 129  
 Ментол 70  
 Ментон 70  
 Метандростенолон см. Андрогены  
 Метод парного нанесения 122  
 Метол Ф. Снайдера 65  
 Методы обнаружения 62 сл.  
   биологические 67  
   физические 63  
   химические 67  
 Методы выбора и оптимизации подвижных фаз 45  
 варнокамеры см. Хроматографические камеры  
 литературные источники 45, 46  
 метод "элюирования пятна" 46  
 модель "ПРИЗМА" 47  
 стандартные подвижные фазы 46  
 схема фирмы "Camag" 47, 48  
 Метронидазол см. Тинидазол  
 Механизмы разделения  
   адсорбционный 21, 22, 31  
   ионообменный 21, 22, 32  
   ион-парный 21, 22, 33, 34  
   распределительный 21, 22, 32  
   эксклюзивно-гель-проникающий 21, 22  
   энантиомер-селективный (хиральный) 35  
 Модель "ПРИЗМА" см. Методы выбора и оптимизации подвижных фаз  
 Модифицированные слои силикагеля 32  
 Моеномициновые антибиотики 138  
 Молочная кислота см. Карбоновые кислоты  
 Монолитные сорбенты 15, 36, 158  
 Моносахариды (углеводы) 196  
 Морфин см. Алкалоиды опия

- Налидиксовая кислота 163  
 Нанесение растворов образцов на хроматографическую пластинку 52  
 в виде полосы 53, 54  
 в виде пятна 53, 54  
 с помощью калиброванного капилляра 53  
 с помощью микропипетки 54  
 с помощью микрошприца 54  
 с помощью ручных и автоматических аппликаторов 55  
 Насыщение хроматографической камеры предварительное 56, 57  
 сорбционное 57, 58  
 Нафтолы 72  
 Непрерывное элюирование 22  
 Нитросоединения 72  
 Нордiazepam см. Диазепам  
 Нуклеозиды 180  
 Нуклеотиды 180  
 Обнаруживающие (визуализирующие) реагенты 67  
 приготовление 68, 74  
 обработка хроматограммы 74, 75  
 Оксид алюминия 31  
 Окситетрациклин см. Тетрациклиновые антибиотики  
 Парацетамол см. Кофеин  
 Патулин 70  
 Пиридин 73  
 Пиримидиновые основания см. Нуклеотиды, Нуклеозиды и Азотистые основания  
 Пиррол 73  
 Планшетный сканер 110  
 Погрешности  
 в видеоденситометрии 124  
 в денситометрии 123  
 Полиамид 31  
 Поликонденсированные ароматические углеводороды (ПАУ) 72, 203  
 Полистирол 210  
 Подвижные фазы см. Методы подбора и оптимизации подвижных фаз  
 Правильность (точность) аналитического метода 128  
 Предвалидационные тесты 130  
 Предел количественного определения 130  
 Предел обнаружения 130  
 Пригодность системы 130  
 Программы количественной обработки хроматографических данных
- Dens 104  
 winCats, версия 1.03 101  
 Пролин 177 сл.  
 Пропорциональный счетчик 118  
 Проточное элюирование 22  
 Радиоавтография 65  
 Радиоденситометрия 113  
 Радиохроматограммы 63  
 автоматическая аппаратура для отбора зон с пластинки 66  
 продолжительность экспозиции 65, 66  
 расчет методом авторадиоавтографии 65, 66  
 сцинтилляционный метод 66  
 счетчики Гейгера – Мюллера 114  
 Радиохроматография в тонком слое 63  
 Рамноза см. Углеводы  
 Распределительная хроматография 22; см. также Механизмы разделения  
 Реактивы для обнаружения см. Обнаруживающие реагенты  
 Реломицин см. Тилозиновые антибиотики  
 Салициловая кислота см. Ацетилсалициловая кислота  
 Связующие вещества для приготовления закрепленных слоев 27  
 Серии 170 сл.  
 Сила растворителя по Л. Снайдеру 43  
 Силикагели 30  
 диаметр пор 28  
 модифицированные 32  
 размер частиц 28  
 распределение частиц по размерам 28  
 силанольные группы 30  
 силоксановые группы 30  
 Силуфол 37  
 Слои на основе монолитных сорбентов см. Монолитные сорбенты  
 Сорбфил 37  
 Специфичность аналитического метода 128  
 Спирты 68, 70  
 Стеариновая кислота см. Карбоновые кислоты  
 Стероидные кетоны 70  
 Стрихнин 71  
 Сульфаниламиды 69  
 Схема Вальди 75  
 Счетчик Гейгера – Мюллера 114

- Табун см. Фосфорорганические отравляющие вещества  
 Теофиллин 156 сл.  
 Тетрациклиновые антибиотики 147 сл.  
 Тилозиновые антибиотики 144 сл.  
 Тимидин 180 сл.  
 Тинидазол 153 сл.  
 Тирозин 176 сл.  
 Толщина слоя сорбента 29, 37, 38  
 Тонкослойная хроматография 13  
 Треонин 172 сл.  
 Треугольник Э. Штала 41  
 Триптофан 174 сл.  
 Углеводы 196  
 Уридин см. Тимидин  
 Установки  
 AMD-2 24  
 AS-30 55  
 ATS-4 55  
 Казанга 86  
 МФТХ-1 99  
 ХромПресс 26  
 Элюхром 87  
 Уширение хроматографических зон 22, 23  
 Фенилаланин 176 сл.  
 Фенилкетонурия, диагностика 176, 177  
 Фенолы 72 сл.  
 Фермент-субстратная реакция см. Методы обнаружения  
 Флоросил 31  
 Фокусировка хроматографических зон 25  
 Фосфат кодеина 73  
 Фосфинотрицин см. Биалофос  
 Фосфорорганические отравляющие вещества 206 сл.  
 Фруктоза см. Углеводы  
 Фумаровая кислота см. Карбоновые кислоты  
 Хлортетрациклин см. Тетрациклиновые антибиотики  
 Холестерин 71, 73  
 Хроматографические камеры 56  
 варьокмеры 51, 52  
 классические 57  
 конструкции Перина (с перегородкой в центре дна) 56  
 насыщенные парами элюента 56, 57, 58  
 N-камеры 58  
 S-камеры 58  
 Хроматографический спектрофотометр 92  
 Целлюлоза 35  
 Целлюлоза модифицированная 35  
 Цитидин см. Тимидин  
 Цитозин см. Тимидин  
 Щелевые денситометры см. Денситометры  
 Электрофорез в агарозном геле с последующей количественной обработкой с помощью видеоденситометрии 186  
 Элюирование 22 сл.  
 антикруговое 23  
 градиентное 23  
 двумерное 25  
 круговое 23  
 многократное 22, 24  
 многоступенчатое 23  
 непрерывное 22  
 одноступенчатое 23  
 под действием вынуждающей силы 23, 26  
 проточное 22  
 Элюирующая сила 42  
 Элюотропные ряды 42  
 Энантиомер-селективные неподвижные фазы 35, 37  
 Эстрогены 72  
 Эстрон 73  
 Янтарная кислота см. Карбоновые кислоты