

УДК 543.544

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

A. A. Ахрем и A. И. Кузнецова

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	823
II. Общая часть	824
III. Специальная часть	833

1. Введение

Успехи в химии природных соединений, достигнутые за последние 10—15 лет, в значительной мере обязаны широкому применению эффективных методов разделения смесей веществ и в первую очередь метода адсорбционной хроматографии, открытого Цветом¹. После развития метода распределительной хроматографии широкое распространение получил новый метод хроматографии на бумаге. Он позволяет успешно решать ряд сложных и трудных вопросов химии природных соединений.

В последнее время получил развитие новый эффективный метод хроматографии на пластинах в тонком слое адсорбента, получивший название метода тонкослойной хроматографии. Началом этого метода послужила работа Измайлова и Шрайбера², которые на тонком не закрепленном на стекле слое окиси алюминия впервые разделили алкалоиды, содержащиеся в вытяжках из лекарственных растений. Несколько позднее Мейнгард и Холл³ применили радиальную поверхностную хроматографию на закрепленном крахмалом слое окиси алюминия для деления смеси некоторых неорганических ионов. Основываясь на этой работе Киршнер, Миллер и Келлер⁴ для выяснения состава эфирных масел предложили новый метод разделения и идентификации терпенов. Этот метод, развитый ими и другими авторами, в особенности Штадлем^{5—16}, на закрепленных на стеклянной пластинке слоях адсорбента, нашел затем широкое применение для разделения как слабополярных, так и сильнополярных («гидрофобных») веществ.

В 1955 г. Моттье^{17, 18} осуществил разделение некоторых красителей на незакрепленном слое окиси алюминия. Лишь в последнее время этот способ работы начал быстро развиваться, в литературе появился ряд сообщений^{19—22}, в которых описано применение тонкослойной хроматографии на незакрепленных слоях окиси алюминия и силикагеля. Простота и быстрота способа с незакрепленным слоем адсорбента привлекает к нему внимание многих исследователей и число работ, в которых он применяется, непрерывно растет.

Экспериментальные данные, накопленные за последние годы^{13, 16, 23—25}, показывают, что тонкослойная хроматография — очень удобный метод для разделения небольших количеств многокомпонентных смесей веществ. Преимущества этого метода по сравнению с бумаж-

ной хроматографией — его быстрота, устойчивость слоя по отношению к агрессивным проявителям и нагреванию и большая чувствительность, позволяющая обнаруживать, при применении некоторых проявляющих реагентов, ничтожно малые количества ($0,1$ — $0,005 \mu\text{g}$) веществ.

II. ОБЩАЯ ЧАСТЬ

1. Способы разделения смесей веществ на тонком слое адсорбента

Сущность метода тонкослойной хроматографии заключается в следующем: тонкий слой адсорбента наносится на одну сторону небольшой стеклянной пластинки ($20 \times 5 \text{ см}$). На такой слой, также как на бумагу в бумажной хроматографии, наносят вещества и их смеси (на стартовую линию) и пластинку помещают в камеру с растворителем. Разделение смесей веществ происходит за 30 — 90 мин. Пластинку вынимают из камеры, сушат и опрыскивают подобно бумажной хроматографии. Положение исследуемых веществ, находящихся в виде пятен между линией старта и линией фронта (граница подъема) жидкости, отмечают (рис. 1), измеряют расстояние от центра пятна до стартовой линии (отрезок OB) и расстояние от линии фронта жидкости до стартовой точки (отрезок OF). Положение пятна обозначается через константу, характеризующую положение вещества на данной хроматограмме в виде отношения расстояния между стартовой линией и центром пятна OB к расстоянию от стартовой линии до линии фронта OF $R_f = OB/OF$.

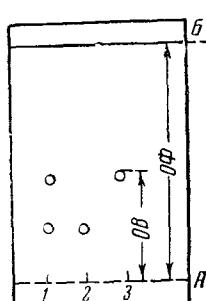


Рис. 1. Схема разделения смеси веществ на пластинке с тонким слоем адсорбента: *A* — линия старта; *B* — линия фронта. *1* — Смесь двух веществ 2 и 3; *2* и *3* — индивидуальные вещества

Величина R_f характерна для соединения на данном адсорбенте и в данной системе и зависит от ряда условий: способа работы, качества адсорбента, активности слоя, толщины слоя, качества растворителей, количества нанесенного вещества, длины пробега, положения стартовой линии и почти не зависит от температуры.

Разделение веществ на тонком слое адсорбента проводят как на слоях адсорбента, закрепленных на стеклянной пластинке, так и на не закрепленных.

Вещество наносят на ту сторону пластинки, с которой поступает растворитель.

Существует несколько способов продвижения растворителей по пластинке с адсорбентом. Обычно растворитель продвигается по пластинке с адсорбентом для разделения веществ один раз, но существует также ряд способов повторяющейся хроматографии. Если разделяют смесь веществ, из которых некоторые разделяются лучше одной системой растворителей, а другие — другой системой, то применяют ступенчатый способ хроматографирования⁸: вначале разделение проводят в системе, которая делит менее полярные вещества. При этом растворитель продвигается вперед почти до конца пластинки. Затем хроматограмму сушат для удаления растворителя и хроматографирование проводят вновь в другой системе, которая продвигается на расстояние более короткое, чем продвигалась первая система растворителей. Применение этого способа часто дает хорошие результаты. Возможно также ступенчатое разделение смесей, когда применяют и третью ступень. При этом третья ступень разделения проводится в новом растворителе при повороте пластинки на 180° . В этом случае система движется в направлении, обратном движению первых двух систем^{26, 27}.

Двумерное хроматографирование проводят на квадратной пластинке с адсорбентом (обычно 20×20 см)^{10, 28, 29}. Анализируемую смесь веществ наносят в одном из углов пластинки и движение разделяющих жидкостей происходит сначала в одном направлении и затем после просушки хроматограммы в другой системе, в перпендикулярном направлении. Двумерную хроматографию применяют часто, и она дает особенно хорошие результаты при разделении многокомпонентных смесей веществ. Двумерный способ разделения с применением в обоих направлениях одной и той же системы растворителей так называемый способ «разделение, реакция, разделение» служит для определения однородности вещества¹⁰. В некоторых случаях на хроматограмме появляются два пятна и не ясно является ли второе пятно другой формой того же вещества или оно соответствует продукту превращения этого вещества во время разделения на пластинке с адсорбентом (например, окисление, изомеризация и т. д.). Если такое превращение не произошло во время хроматографирования, пятна должны лежать на диагонали пластиинки. В случае же образования продуктов превращения, пятна нового вещества лежат выше или ниже диагонали.

Иногда для лучшего разделения веществ желательно удлинение пути пробега растворителей. Тогда проводят повторное хроматографирование в одной и той же системе или применяют проточный способ хроматографирования³⁰, который основан на непрерывном поступлении свежего растворителя на пластинку с адсорбентом. Пластинку сверху прикрывают стеклом, не касающимся слоя, чтобы предотвратить испарение растворителя. Растворитель, доходящий до конца пластиинки, стекает с нее или просто испаряется.

При работе на незакрепленном слое адсорбента пластиинку располагают под углом 15—20°. При работе же на закрепленном слое возможно любое расположение пластиинки, обычно применяют вертикальное положение. Хроматографию называют восходящей, если растворитель поступает снизу вверх под действием капиллярных сил. Подъем жидкости в этом случае имеет некоторый предел. Хроматографию называют нисходящей, если растворитель поступает сверху вниз и движется главным образом под действием силы тяжести^{31—33}.

Горизонтальный способ продвижения растворителя применяют при использовании радиальной (круговой) хроматографии на пластиинках. При этом пластиинку с закрепленным слоем адсорбента кладут на чашку Петри слоем внутрь. Растворитель подается из чашки при помощи жгута в центр пластиинки. Вокруг центра пластиинки по кругу наносят разделяемое вещество.

2. Хроматографирование на закрепленном слое адсорбента

В качестве адсорбента для тонкослойной хроматографии на закрепленном слое применяют главным образом силикагель, хроматографические свойства которого позволяют использовать его как для адсорбционной, так и распределительной хроматографии. Кроме того, в качестве адсорбентов используют окись алюминия, кизельгур (для сильно полярных соединений), силикат магния³⁴, гидроокись кальция, порошок целлюлозы, полиамидные смолы и др.

Силикагель должен иметь крупнопористое строение и подходящий размер зерна (150—180 меш.). Его емкость по отношению к воде должна быть 80—100 %. Хорошие результаты получаются с отечественным силикагелем марки КСК^{35—37}, размолотом и просеянном через сито 150 меш. (величина отверстия 0,1 мм). Предварительно силикагель

должен быть отмыт от примесей железа, если они в нем содержатся, кипячением с концентрированной соляной кислотой и затем отмыт дистиллированной водой от ионов хлора, отмучен от мелкой взвеси взвалтыванием и декантацией и высушен при 120° в течение 48 часов.

Обычно слой адсорбента закрепляют на стекле при помощи какого-либо фиксатора. Для этой цели служат гипс (медицинский)³⁵ штукатурный⁴ и рисовый или маисовый крахмал*.

В связи с развитием тонкослойной хроматографии с закрепленным на стекле слоем оказалось необходимым для получения воспроизводимых результатов стандартизовать условия работы. Для этой цели Шталь предложил следующий ряд условий⁶ стандартизации слоя:

1. Слой должен быть ровным, гладким, без царапин и пузырьков толщиной 0,25—0,30 мм. Для получения такого слоя лучше пользоваться специальным прибором. Пластина после нанесения слоя должна активироваться в сушильном шкафу при 105° в течение 30 мин. и сохраняться в экскаторе над blaугелем (прокаленный силикагель, пропитанный солями кобальта) или хлористым кальцием. Такой слой имеет активность, примерно соответствующую II/III активности окиси алюминия по Брокману. Для получения менее активного слоя пластины иногда высушивают на воздухе.

2. Слой должен быть достаточно прочным и хорошо переносить воздействие агрессивных проявителей. Эти условия вполне удовлетворяются при работе с силикагелем КСК с добавкой 5% медицинского гипса или с силикагелем G (Merck).

3. Капиллярные свойства слоя должны быть такими, чтобы смесь из трех красок: индофеноловый синий, красный судан-IV и *p*-диметилазобензол, нанесенная на пластиинки, оставалась бы на старте при хроматографировании в гексане (погружение пластиинки в жидкость на 0,5 см) и давала бы три пятна в бензole. Быстрота передвижения растворителя зависит от качества слоя, растворителя и насыщенности камеры и

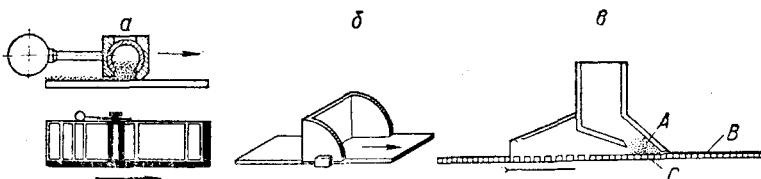


Рис. 2. Схемы приборов для получения тонкого слоя сорбента.
а — прибор Штала, б и в — приборы из плексиглаза. Стрелки указывают направление движения прибора; А — адсорбент, В — тонкий слой адсорбента, С — стеклянная пластиинка

должна быть при делении этих красок в бензole, не дольше 30—45 мин. при подъеме жидкости на 10 см. В таких условиях величина R_f колеблется в пределах $\pm 0,05$. Получить такой ровный слой без применения специальных приборов довольно трудно. Однако результаты, полученные на слое, приготовленном без применения прибора, вполне приемлемы для характеристики хроматографируемых соединений, если значение полученного R_f отнести к значению R_f какого-либо известного соединения метчика, хроматографируемого на той же пластиинке.

К настоящему времени описано несколько приборов для нанесения тонкого закрепленного слоя вещества. Лучшим, всеми применяемым и

* За рубежом некоторые фирмы готовят специально силикагель G, кизельгур G и окись алюминия G с добавкой 5% гипса для тонкослойной хроматографии по Штальню (фирмы Desaga, Heidelberg или Merck. Darmstadt).

изготавляемым промышленностью, является прибор Штала⁹, рассчитанный для приготовления 5 пластинок размером 20×20 см с толщиной слоя 0,27 мм (см. рис. 2, а).

Кроме того, имеется ряд более простых моделей, изготавляемых из плексигласа, дающих слой примерно 0,30³⁸ и 0,25 мм³⁹ и др. (рис. 2б, в).

Для получения тонкого слоя пользуются в качестве основы стеклами любого качества (оконное стекло, фотопластишка со смытой эмульсией, зеркальное и пирекс). Обычно применяют размеры 20×20 см и 5×20 см.

Для получения слоя толщиной 0,27 мм на 5 пластинках размером 20×20 см 25 г силикагеля, содержащего 5% гипса, тщательно смешивают с 24 мл воды и полученную массу разравнивают на поверхности стекла при помощи прибора Штала. Затем пластиинки сушатся на воздухе, активируются и хранятся, как описано выше. Пластиинку (11×17 см) с толщиной слоя примерно 0,3 мм при отсутствии прибора готовят так: в колбе с притертой пробкой на 100—150 мл тщательно взбалтывают 6,9 г силикагеля и 0,35 г гипса с 18 мл дистиллированной воды. Полученную при этом густую, однородную массу выливают на стекло и разравнивают по его поверхности при помощи шпателя и встряхивания. Пластиинку оставляют на 20 мин. на горизонтальной поверхности и затем активируют и хранят как обычно.

Слой может быть закреплен на пластиинке при помощи крахмала⁴⁰, однако в последнее время этим методом почти не пользуются.

Для получения слоя целлюлозы, целлюлозный порошок взбалтывают с водой или ацетоном и наносят на пластиинку с применением прибора Штала.

В некоторых случаях бывает необходимо приготовление так называемых модифицированных слоев^{8, 13}, тогда вместо воды при приготовлении слоя добавляют растворы кислот, щелочей, буферов и пр. Для получения кислых слоев добавляют 0,5 N щавелевую кислоту⁴¹ или 0,1 N борную кислоту⁴². Щелочные слои готовят с добавлением растворов едкого кали⁴³ или едкого натра⁴⁴ в концентрациях от 0,5 до 0,1 N. Слон с фосфатным буфером Зеренсена получают прибавлением равных объемов 0,2 M раствора первичного фосфата калия и 0,2 M раствора вторичного фосфата натрия¹¹. Слон с ацетатным буфером готовят с добавкой 0,02 M раствора ацетата натрия^{11, 13}. Слон целлюлозы пропитывают 20%-ным раствором формамида в ацетоне⁴⁵.

Применяют также слои, пропитанные углеводородами^{46, 47}, жидким парафином, тетрадеканом или нефтяной фракцией с т. кип. 240°, керосином с т. кип. 240—250° и силиконовыми маслами: низкомолекулярным (вязкость 50 сантистокс) и высокомолекулярным (вязкость 1000 сантистокс). Для пропитывания пластиинку обычно осторожно погружают в 5%-ный раствор этих веществ в эфире или петролейном эфире, после чего высушивают для удаления растворителя.

В некоторых случаях, если вещество само не флуоресцирует в УФ-свете, применяют флуоресцирующие слои (особенно для препаративного деления). При приготовлении такого слоя добавляют водные растворы флуоресцирующих веществ, которые прочно удерживаются на адсорбенте и не смываются обычными растворителями. Для этой цели применяют, главным образом для слоя силикагеля, — родамин Ж-6 (на 0,0011 г 54 мл воды)⁴⁰.

Обычно при работе на закрепленном слое силикагеля применяют восходящий способ. Камера для хроматографирования представляет собой подходящий размеру пластиинки стеклянный сосуд любой формы

с плоским дном. Высота камеры должна быть примерно 25 см при размере пластиинки 20×20 см.

В сосуд наливают растворитель в таком количестве, чтобы поставленная почти вертикально пластиинка с нанесенным веществом погружалась в растворитель на 5 мм. На заднюю стенку камеры налепляют смоченный растворителем лист фильтровальной бумаги, доходящий до дна сосуда, для получения перенасыщенной камеры. Сверху камеру закрывают пришлифованной крышкой. В пересыщенной камере пятна бывают глубже и продолжительность продвижения жидкости сокращается на $\frac{1}{3}$. Подъем жидкости не должен быть выше 10—11 см, так как при большем пробеге наблюдается диффузия пятен и поэтому большие колебания величины R_f . При таком методе работы⁴⁸ колебания R_f такого же порядка, что и наблюдалось в бумажной хроматографии.

3. Хроматографирование на незакрепленном слое адсорбента

В качестве адсорбента для тонкослойной хроматографии с незакрепленным слоем применяют главным образом окись алюминия и силикагель. При приготовлении незакрепленного слоя может быть использована продажная окись алюминия марки «для хроматографии» нужной активности по Брокману⁴⁹.

Для эффективного деления смесей очень большое значение имеет выбор адсорбента подходящего качества и активности. При этом нужно помнить, что некоторые адсорбенты (например окись алюминия) могут вызвать побочные реакции в процессе хроматографирования.

Если вещество не устойчиво к щелочам, то окись алюминия отмывают до нейтральной реакции, высушивают при 350° в течение 6—8 часов и дезактивируют добавлением дистиллированной воды до нужной активности по Брокману⁴⁹.

Определение активности окиси алюминия удобно производить при помощи тонкослойной хроматографии⁵⁰. Для этого стандартную смесь азокрасителей (азобензол, *p*-метоксиазобензол, судан желтый, судан красный и *p*-аминоазобензол) разделяют на пластиинке с тонким слоем испытуемого образца окиси алюминия в четыреххлористом углероде и активность определяют по таблице, помещенной в той же работе⁵⁰.

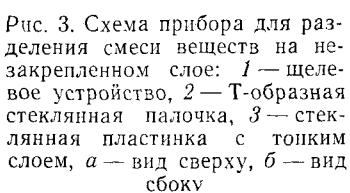


Рис. 3. Схема прибора для разделения смеси веществ на незакрепленном слое: 1 — щелевое устройство, 2 — Т-образная стеклянная палочка, 3 — стеклянная пластиинка с тонким слоем, а — вид сверху, б — вид сбоку

При получении тонкого незакрепленного слоя применяют силикагель марки КСК, обработанный, как описано на странице 825. Приготовленный таким образом силикагель дезактивируют прибавлением от 3 до 25% дистиллированной воды для получения адсорбента с нужной активностью.

Метод получения незакрепленного слоя адсорбента очень прост: адсорбент насыпают на стекло (лучше матовое) и разравнивают по его поверхности при помощи валика (из нержавеющей стали) с утолщениями в 0,5 мм или 1 мм ($\pm 0,01$ —0,02 мм) на концах или стеклянной трубки с одетыми на концы кусочками каучуковой трубки. Расстояние между утолщенными концами валика или трубки должно быть на 10—12 мм меньше ширины применяемой пластиинки. Валик (или трубку) медленно двигают утолщенными концами по краям пластиинки и получают ровные

слои адсорбента. После нанесения вещества пластинку помещают в стеклянный кристаллизатор с растворителем под углом 15—20° и опускают одним краем в растворитель^{17, 19, 22} или же растворитель подается на пластинку при помощи капиллярной щели²¹, в последнем случае для разделения необходимо всего 25—30 мл растворителя. Сверху кристаллизатор закрывают пришлифованным стеклом. На рис. 3 изображена камера для работы на незакрепленном слое адсорбента. Пластинку помещают в сосуд на выступ приспособления для получения щели и на изогнутую стеклянную палочку с перекладиной. Приспособление для получения щели представляет собой две стеклянные полоски с шириной пластинки и высотой 2 и 1 см соответственно, между которыми проложены по краям кусочки тефлона или покровного стекла. Эти полоски скрепляются друг с другом никромовой проволочкой. Приспособление поддерживается вертикально при помощи перекладины стеклянной палочки. При этом способе работы длина пробега жидкости не влияет на величину R_f . Колебания значения R_f от средней величины составляют не более 2% расстояния между стартовой и фронтовой линиями.

4. Нанесение вещества

Раствор испытуемых веществ (0,1—0,5%) обычно в каком-либо летучем растворителе (эфире — хлороформе) при помощи пипетки на 0,1 мл или специально приготовленного капилляра наносится в виде точек в количествах примерно от 0,1 до 50 мкг на стартовую линию, отстоящую до 1,5 см от края пластинки. Расстояние между точками с пробами вещества должно быть не меньше 1 см. Вещества наносят осторожно так, чтобы слой адсорбента при этом не нарушался. Количество наносимого соединения или смеси играет существенную роль при разделении веществ при помощи тонкослойной хроматографии. Столь же существенна и чувствительность проявляющего ре-

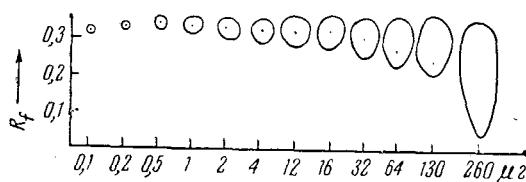


Рис. 4. Зависимость величины R_f от количества взятого для разделения вещества (μg) на примере глицина⁵¹

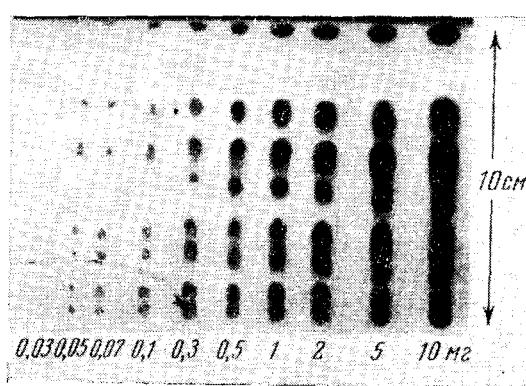


Рис. 5. Хроматограмма смеси сахаров. Наносимые количества смеси возрастают слева (0,03 μg) направо (10 μg)¹²

агента. Очень большие количества соединений могут быть слабо заметны или могут вовсе не проявиться мало чувствительным реагентом. Величина R_f , зависит от количества нанесенного на пластинку вещества.

Очень большие количества вещества часто дают чересчур большие и плохой формы пятна, которые сливаются с пятнами соединений, имеющих близкую величину R_f .

Как видно из рис. 4, при идентификации глицина лучший результат достигается с количеством вещества порядка 0,5—1,0 μg ⁵¹.

В последнее время вопросу чувствительности реагентов, применяемых в тонкослойной хроматографии, уделяется большое внимание. Есть реагенты, которые позволяют обнаружить до 0,005 μg вещества¹⁵. Поэтому для получения точных результатов следует знать чувствительность проявителя и правильно подобрать количество испытуемого соединения или смеси веществ. Для подбора нужного количества смеси веществ на пластинку наносят пробы различных количеств смеси, например, от 1 до 10 μg ⁸ или от 0,03 до 10 μg ¹¹ (таким же способом проверяют и чувствительность реагента, обычно на индивидуальных соединениях), смесь разделяют в какой-либо подходящей системе и проявляют подходящим проявителем. На рис. 5 показано разделение смеси 8 сахаров¹². Лучшее разделение бывает при количестве смеси 0,5 μg , хотя еще заметно деление и при меньших количествах вещества.

5. Выбор адсорбента и растворителя

Растворители, применяемые в тонкослойной хроматографии, должны быть чистыми и хорошо высушеными. Очистку и сушку растворителей производят методами, обычно применяемыми для других видов хроматографии.

Разделение смесей веществ можно производить одним растворителем, но обычно применяют системы, состоящие из двух, трех и даже четырех растворителей. Не допускается повторное хроматографирование в одной и той же порции растворителя или системы.

При выборе адсорбента следует учитывать полярность и химическую устойчивость разделяемых веществ. Гидрофильные (полярные) адсорбенты (окись алюминия, силикагель, кизельгур) адсорбируют вещество тем сильней, чем больше полярных групп оно содержит и чем выше степень его ненасыщенности. Слабо полярные соединения хроматографируются обычно на сильно активных адсорбентах, а сильно полярные — на слабо активных.

Адсорбционная способность соединений, содержащих функциональные группы, увеличивается в ряду:



При выборе растворителя для адсорбционного метода тонкослойной хроматографии пользуются элюотропным рядом¹⁶, начиная от неполярного и кончая сильно полярным растворителем. Для этой цели применяют микроциркулярный способ, сущность которого заключается в следующем: на стеклянную полоску со слоем адсорбента наносят, как обычно, несколько проб вещества на расстоянии 2 см друг от друга. Через несколько минут в центре каждой точки, с нанесенным веществом или смесью, тонким капилляром наносят исследуемый растворитель или систему. После просушки хроматограмму проявляют, при этом обнаружаются в виде циркулярных колец более или менее удачно разделенные вещества или их смеси, что позволяет сделать выбор растворителя или системы.

На основании вышеизложенного, Шталь предложил простую и наглядную схему подбора условий хроматографирования на тонком слое адсорбента¹⁶, изображенную на рис. 6.

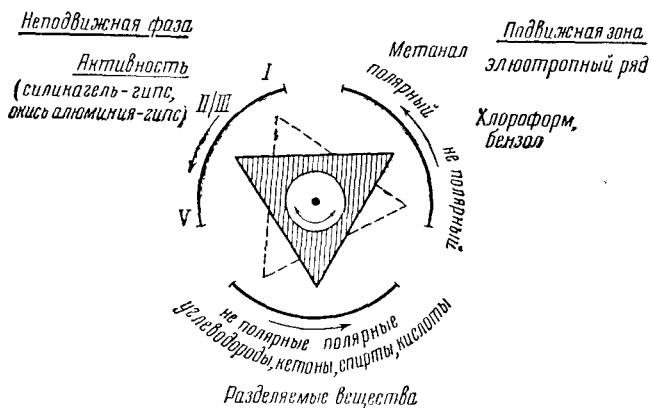


Рис. 6. Схема подбора условий для хроматографирования на тонком слое адсорбента. Римские цифры указывают на активность по Брокману. Заштрихованный треугольник вращается вокруг центра. Один угол треугольника указывает на разделяемые соединения, другой — на необходимую активность адсорбента, третий — на растворитель

В последнее время тонкослойную хроматографию применяют не только как адсорбционный метод, но и как распределительный метод хроматографии. Недавно опубликована работа⁵², посвященная теоретическим основам этого метода. При подборе растворителя для распределительной тонкослойной хроматографии рекомендуется пользоваться миксотропным рядом Геккера⁵³. Перед употреблением подвижную фазу всегда насыщают неподвижной фазой.

6. Обнаружение пятен

При работе с окрашенными веществами видны цветные пятна разделившихся веществ. Для обнаружения бесцветных веществ в первую очередь необходимо проверить, не флуоресцирует ли вещество в УФ-свете.

В случае не флуоресцирующих веществ применяют опрыскивание хроматограммы из пульверизатора растворами реагентов, дающих цветную реакцию с испытуемыми соединениями. Опрыскивание производят возможно меньшим количеством проявителя, чтобы не нарушить слоя и избежать изменения формы пятен. В некоторых случаях используют пластиинки, содержащие флуоресцирующее вещество, или применяют опрыскивание из пульверизатора раствором флуоресцирующего вещества.

Для обнаружения пятен, полученных на тонком слое адсорбента, применяют большинство реагентов бумажной хроматографии. Преимуществом тонкослойной хроматографии является возможность работы на чисто неорганических слоях, на которых почти все вещества могут быть обнаружены опрыскиванием агрессивными проявителями такими, как концентрированная серная кислота с добавкой или без добавки альдегидов (ванилин, анисовый альдегид и др.) или смесью концентрированной серной и азотной кислот. После проявления этими реагентами иногда необходимо пластинку нагреть при 80—100° или даже до 400°. Кроме того, хорошие результаты часто получаются при проявлении растворами SbCl₃ и SbCl₅ и последующим нагреванием до 80—100°.

Соединения, содержащие двойную связь или способные присоединять иод, проявляются парами иода. При нагревании пластинки (100—150°) после насыщения парами иода проявляются соединения, способные легко дегидратироваться.

Для определения карбонильной группы применяют опрыскивание растворами 2,4-динитрофенилгидразина. Альдегиды обнаруживаются раствором о-дианизидина в уксусной кислоте. Кислоты — слабощелочным раствором бромкрезоловой зеленой и т. д.

При обнаружении пятен, полученных на незакрепленном слое, опрыскивание производят осторожно из пульверизатора, находящегося на расстоянии одного метра от подсушенной или сырой пластинки. В таких условиях проявление происходит без нарушения слоя. Для обнаружения на незакрепленном слое окиси алюминия предлагается также, после разделения веществ и сушки пластинки на воздухе, слой окиси алюминия пропитывать концентрированными кислотами со стороны, перпендикулярной делению. При этом окрашивание происходит тотчас же⁵⁴.

В специальной части данной статьи в каждом разделе приводятся применяемые для обнаружения реагенты.

7. Препаративное разделение смесей веществ

Тонкослойная хроматография может быть использована для препаративного разделения смесей веществ в количествах 0,4—0,5 г и даже больше одновременно. Разделение проходит почти с количественными выходами.

Препаративное разделение на закрепленном слое обычно проводят на флуоресцирующем слое силикагель — гипс. Пятна веществ обнаруживают в УФ-свете, отмечают, высекают и вещество вымывают с адсорбента подходящим растворителем. Хроматографирование проводят несколько раз, и растворы, полученные при вымывании одинаковых пятен, объединяют. После удаления растворителя выделяют индивидуальные соединения.

На обычную пластинку (20×20 см) с флуоресцирующим слоем силикагель — гипс может быть нанесена смесь веществ в виде сплошной линии в количествах до 1 мг. В этом случае отдельные соединения обнаруживают в УФ-свете в виде полос, которые отмечают и обрабатывают затем, как описано выше.

Особенно удобен метод препаративного разделения на незакрепленном слое окиси алюминия и силикагеля¹⁹. Разделение производят на пластинках шириной до 40 см и длиной до 80 см, при толщине слоя адсорбента от 1,5 до 3 мм. Количество наносимого вещества достигает при толщине слоя 1,5 мм примерно 20—25 мг на 1 см длины стартовой линии.

Смесь веществ растворяют в подходящем летучем растворителе и наносят на пластинку в виде сплошной линии, после чего пропитывают чистым растворителем для более глубокого проникновения вещества в слой. Растворитель испаряется и смесь веществ разделяется в подходящей системе. Для проявления, если вещество не флуоресцирует в УФ-свете, пластинку иногда опрыскивают морином и полосы разделившихся веществ обнаруживают в УФ-свете, отмечают их или проводят хроматографирование на пропитанном морином слое окиси алюминия⁵⁵. Вещество вместе с адсорбентом собирают с пластинки при помощи простого приспособления (см. рис. 7). В воронку с пористым фильтром (№ 3 и № 4) вставляют пробку с изогнутой трубкой. Нижний конец воронки присоединяют к водоструйному насосу. Адсорбент с

веществом всасывается с пластинки через трубку при помощи вакуума водоструйного насоса. В этой же воронке вещество вымывают с адсорбента подходящим растворителем.

Обнаружение вещества может быть проведено парами иода. Для этой цели в такую же воронку помещают кристаллы иода и через трубку, вставленную в пробку, продувают осторожно ток воздуха, при этом концом воронки медленно проводят над слоем адсорбента с двух боковых сторон пластинки. Окрашенные иодом участки отмечают с обеих сторон пластинки и соединяют друг с другом. Отмеченные на пластинке зоны с веществом собирают в воронку и вымывают, как указано выше.

Описано несколько примеров количественного разделения смесей веществ на тонком слое адсорбента: визуальным методом, основанным на измерении величины и яркости пятен^{32, 41, 56, 57} и фотометрическим^{58–60}.

Для документации хроматограмм рекомендуются: зарисовка на пергаментной бумаге, черно-белая фотокопия⁶, хранение результатов в виде цветной пленки, фиксация результатов парафином^{17, 18} и фотокопия в УФ-свете³⁰.

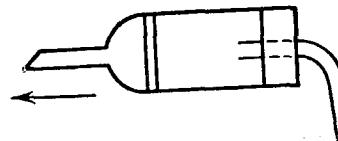


Рис. 7. Прибор для извлечения вещества вместе с адсорбентом с платинки

III. СПЕЦИАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Моно-, сескви-, ди- и тритерпеноиды

Развитие тонкослойной хроматографии началось, как известно, с изучения состава эфирных масел⁴. Оказалось, что на тонком слое силикагель — крахмал в системе гексан — этилацетат (85 : 15) возможно разделение терпеновых углеводородов, спиртов, сложных эфиров, а также коричного альдегида и нормальной каприловой кислоты. Общим реагентом для обнаружения терпеноидов служила концентрированная серная кислота и смесь ее с азотной (95 : 5) с последующим нагреванием до 500° и обнаружением в УФ-свете. Для соединений, способных присоединять бром, применяли флуоресцеинброновую пробу, для альдегидов — опрыскивание 1%-ным раствором дианизидина в уксусной кислоте, а для обнаружения кислот — бромкрезоловый зеленый. Кроме того, применяли хроматографирование на слое силикагель — гипс с добавкой флуоресцирующих веществ (цинккадмийсульфат или цинксиликат) и облучение УФ-светом с короткой волной.

Метод тонкослойной хроматографии на слое силикагеля⁶¹ был применен для контроля фракций, полученных в результате разделения эфирных масел при помощи адсорбционной хроматографии на колонке и использован с успехом для разделения многих эфирных масел^{62–64}.

Систематически обследованы⁶⁵ на том же слое в гексане некоторые предельные и непредельные алифатические, ароматические и терпеноевые углеводороды.

Далее⁶⁶ подробно изучены на 32 примерах возможности разделения различных терпеновых спиртов, альдегидов, кетонов, эфиров и окисей на слое силикагель — гипс, но для этих соединений применен ряд других систем: I — гексан — этилацетат (85 : 15); II — хлороформ — этилацетат (9 : 1); III — бензол — этилацетат (85 : 15), IV — хлороформ — этилацетат (95 : 5); V — гексан — нитропропан (1 : 1); VI — гексан — этилацетат (70 : 30); VII — хлороформ — этилкарбонат (85 :

: 15); VIII — гексан — изопропилформиат (70 : 30); IX — гексан — изопропиловый эфир (1 : 1); X — гексан; XI — хлороформ.

Хорошие результаты были получены при опрыскивании хроматограмм концентрированной серной кислотой с добавкой 1% ванилина⁶⁷⁻⁶⁸. Этот метод был использован для определения *L*-ментола, *L*-ментена, *L*-ментилацетата и *L*-лимонена в составе японской мяты, на том же слое (SiO_2) и системе гексан — этилацетат (85 : 15).

Наряду с этим, предложено при приготовлении флуоресцирующего слоя^{40, 69} добавлять родамин Ж-6, который не дает продуктов присоединения с испытуемыми веществами и прочно удерживается на силикагеле. Хорошие результаты были получены при проявлении УФ-светом. Так, для обнаружения кетонов применяли опрыскивание пластиинки раствором 2,4-динитрофенилгидразина (0,4 г ДНФГ в 100 мл 2*N* HCl). Пятна отмечались при дневном и УФ-свете. Затем хроматограмму нагревали при 105° в течение 10 мин. и вновь рассматривали при дневном и УФ-свете. Такое многократное рассмотрение позволило обнаружить некоторые вещества, которые раньше замечены не были.

На слое силикагель — крахмал в системе гексан — этилацетат (85 : 15) были разделены 12 алифатических и терпеновых альдегидов и кетонов^{40, 64} и в той же системе дитерпеноиды класса фитола^{55, 70, 71}. В последнем случае кроме обычных методов применено для обнаружения эфиров опрыскивание 0,25%-ным водным раствором перманганата калия.

Был исследован также ряд эфирных масел на слое силикагель — гипс в бензole. При этом были обнаружены⁷²: борнеол, цинеол, борнилацетат, туйон, линолилацетат и пинен. В системе бензол — этилацетат (95 : 5) обнаружены ментол, цинеол, лимонен, ментон, ментилацетат, ментофуран, пинен и фелландрен⁷³.

Особенно интересен случай разделения эпимерных соединений, а именно, изомерных γ-ментолов на слое силикагель — гипс в системах: норм.-гексан — этилацетат (85 : 15)⁷⁴ и позднее в системе бензол — метанол (95 : 5)⁷⁵.

Сесквитерпены и их спирты⁷⁶: патшулен, патшулиловый спирт и эвгенол разделены на слое силикагель — крахмал в системе норм.-гексан — этилацетат, содержащий 5% хлороформа (85 : 5), и проявлены серной кислотой.

Успешно разделялись и многокомпонентные смеси тритерпеноидов⁷⁷ на слое силикагель — гипс. Этот метод применялся как для разделения ряда тритерпеноидных кислот, так и нейтральных тритерпеноидов (эфиры, спирты, углеводороды). Для обнаружения применяли опрыскивание хлорсульфоновой и уксусной кислотами (1 : 2) и последующую сушку при 130° в течение 5 мин., а также обнаружение в УФ-свете. Нижняя граница обнаружения этим реагентом для олеаноловой кислоты составляет 0,02 μg .

Для разделения кислот применяли следующие системы: I — дизопропиловый эфир — ацетон (5 : 2); II — дизопропиловый эфир — ацетон (5 : 2) с добавлением 5% пиридина; III — этилацетат — метанол — диэтиламин (14 : 4 : 3); IV — хлорбензол — уксусная кислота (9 : 1); V — метиленхлорид — пиридин (7 : 2).

Углеводороды и эфиры кислот хорошо разделялись в следующих системах: дизопропиловый эфир — ацетон (5 : 2); дизопропиловый эфир — циклогексан; бензол — хлористый метилен.

Кроме того, на том же слое в системе дизопропиловый эфир — ацетон (10 : 19) разделены⁷⁸ метиловый эфир бредемоловой кислоты и аце-

гонид метилового эфира бредемолевой кислоты и в системе хлороформ — этилацетат (4:1)⁷⁹ пять новых тритерпеноидных кислот, выделенных из смолы «*Comiphora gladulosa*».

Содержание в эфирных маслах сквалена и других терпенов и сесквитерпенов определили на слое силикагель — гипс в бензоле^{6,7}. Этот метод был применен⁸⁰ также для полукачественной оценки содержания геранилацетата, азарона и метилового эфира изоэвгенола в некоторых эфирных маслах.

2. 2,4-Динитрофенилгидразоны

Алифатические альдегиды и кетоны удобно разделять в виде их 2,4-динитрофенилгидразонов. При этом лучшей системой для разделения жирных альдегидов⁸¹ в виде этих производных на тонком слое силикагель — крахмал оказался насыщенный раствор бензол — вода (98:8,2).

При помощи 2,4-динитрофенилгидразонов был идентифицирован на том же слое⁸² ряд альдегидов и кетонов, содержащихся в эфирных маслах: карвон, цитраль, ментон, коричный альдегид, бензальдегид, фенхон, ванилин, салициловый и лауриновый альдегиды, фурфурол и пиперональ в системах лигроин — эфир (2:8) и гексан — этилацетат (17:3) на слое силикагель — гипс⁸³.

На том же слое⁸⁴ идентифицированы с хорошо воспроизводимыми результатами 2,4-динитрофенилгидразоны ряда ароматических альдегидов и кетонов в системах: бензол — петролейный эфир (т. кип. 60—80°) (3:1) и бензол — этилацетат (95:5).

3. Стероидные соединения и эфиры холестерина

Первыми стероидными соединениями⁹, разделенными на тонком слое силикагель — гипс, были лактоны $\Delta^5\text{-}3\beta$, 20-диоксихолевой кислоты и $\Delta^5\text{-}3\beta\text{-ацетокси-20-оксихолевой кислоты}$, холестерин, его ацетат и липидные экстракты крови. Хроматографирование проводили в хлороформе в пересыщенной камере, и пятна обнаруживали опрыскиванием насыщенным раствором треххлористой сурьмы в хлороформе и нагреванием при 110°.

Разделение эфиров холестерина очень важно для биологической и медицинской химии и в последнее время вызвало особенно большой интерес. Работы по разделению липидных экстрактов крови на слое силикагель — гипс были продолжены^{26,27}. Хорошие результаты были получены с применением трехступенчатого способа разделения. Вначале деление проводили в системе пропанол — аммиак (2:1), когда фронт жидкости достигал 30 мм, пластинку вынимали, растворитель испаряли и хроматографирование проводили в системе хлороформ — бензол (3:2) до подъема жидкости на 100 мм. После этого пластинку вынимали, поворачивали на 180° и хроматографировали ее вновь восходящим методом в четыреххлористом углероде (подъем жидкости 40 мм). Хроматограмму опрыскивали раствором SbCl_3 в хлороформе и рассматривали в УФ-свете. Таким образом были разделены: холестерин и его эфиры, лейцин, кефалин, олеиновая, масляная, пальмитиновая и стеариновая кислоты.

Разделение эфиров холестерина⁸⁵ и некоторых других слабополярных стероидных соединений было подробно обследовано на тонком слое силикагель — гипс в 13 различных растворителях и системах. При

этом удалось в течение 90 мин. разделить нейтральную фракцию продуктов окисления боковой цепи холестерина, состоящую более чем из 20 соединений и даже полуколичественным методом определить содержание некоторых из них в общей смеси.

На рис. 8 изображено полуколичественное разделение нейтральной фракции продуктов окисления боковой цепи холестерина на слое силикагель — гипс визуальным сравнением пятен с пятнами, содержащими известные количества этих соединений.

Для разделения эфиров холестерина, содержащихся в кровяной сыворотке⁸⁶, кроме вышеуказанных систем, было применено деление в тетрахлорметане.

Наконец, для более детального изучения этого вопроса⁸⁷ были специально синтезированы и получены в чистом виде эфиры холестерина как с насыщенными, так и с ненасыщенными кислотами (холестерил: -формиат, -ацетат, -пропионат, -пальмитат, -стеарат и -олеат, -линоват, -линолеат, -эркурат). В указанных выше системах многие эфиры холестерина имеют одинаковое значение R_f . Лучший результат по разделению эфиров получен в работе⁸⁷ в системе тетралин — гексан (1 : 1). Однако автору не удалось найти систему, в которой бы резко делились эфиры высших жирных насыщенных кислот. Для этой цели разделение проводили на пропитанном жидким парафином слое силикагель — гипс в системе метилэтилкетон — ацетонитрил (7 : 3). При этом

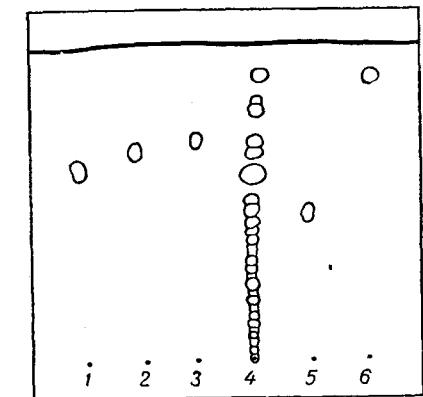


Рис. 8. Хроматограмма нейтральной фракции продуктов окисления боковой цепи холестерина на слое силикагель — гипс. 1 — 3β -ацетокси-5-андростен-17-он; 2 — 3β -ацетокси-5-прегнен-20-он; 3 — 3β -ацетокси-26-нор-5-холестен-25-он; 4 — нейтральная фракция окисления дибромида ацетата холестерина; 5 — 3β -ацетокси-5-холен-(24,20)-олид; 6 — холестерилацетат. Нейтральная фракция содержит: 1 — $4 \pm 1\%$, 2 — $3 \pm 1\%$, 3 — $3 \pm 1\%$, 4 — $22 \pm 2\%$, 5 — $12 \pm 2\%$

было достигнуто хорошее разделение холестериновых эфиров неразветвленных высших жирных кислот как с короткими, так и с длинными цепочками атомов. Для разделения смесей насыщенных и ненасыщенных холестериновых эфиров применен двумерный способ разделения в системах: 1) тетралин — гексан (25 : 75) и 2) метилэтилкетон — ацетонитрил (7 : 3) при частичной гидрофобизации слоя парафином. Хроматограммы проявляли фосфорномolibденовой кислотой.

Очень хорошие результаты были получены³⁸ при разделении на слое силикагель — гипс в системах этилацетат — циклогексан (15 : 85) и (30 : 7) слабополярных стероидов главным образом этиановых эфиров, разделить которые при помощи бумажной хроматографии не удавалось.

Более полярные стероидные соединения — холевую и дизоксихолевую кислоты удалось разделить на дезактивированной на воздухе пластинке со слоем силикагель — крахмал в этилацетате. Кроме того, в системе этилацетат — циклогексан (15 : 85) определено значение R_f для следующих соединений: 5β -холестанон-3 0,71; 5α -холестанон-3 0,86; Δ^4 -холестенон-3 0,63 и в системе этилацетат — циклогексан (30 : 70) : 5β -холестанол-3 β 0,15 и $3\alpha,4\alpha$ -эпоксихолестан 0,85. Пятна обнаруживались опрыскиванием хроматограммы раствором треххлористой сурь-

мы. Карбонильные соединения обнаруживались при опрыскивании 2,4-динитрофенилгидразином.

Недавно ряд стероидных соединений³⁵ был разделен на слое силикагеля марки КСК и медицинского гипса в системе циклогексан—этилацетат в разных соотношениях. Для обнаружения пятен, кроме вышеуказанных реагентов, была применена концентрированная серная кислота и УФ-свет.

В системе циклогексан—этилацетат удалось разделить смеси эпимерных 5,6- α - и β -окисей 3 β -ацетата эпиандростерона и 5,6- α - и β -окисей 3 β -ацетата этиниландростендиола³⁵. Позднее³⁸ в системе бензол—этилацетат (2 : 1) были разделены эпимерные Δ^4 -холестен-7 α - и 7 β -ол-3-оны.

В последнее время³⁹ для разделения стероидных соединений на слоях силикагель—гипс и окись алюминия—гипс были применены и более полярные системы: бензол—хлороформ, бензол—ацетон, хлороформ—ацетон, хлороформ—эфир, бутилацетат—метанол в различных соотношениях.

При изучении корня *Uzarawigzel* были обнаружены⁴⁰ содержащиеся в нем в виде гликозидов Δ^5 -прегненол-3 β -он-20 и 5 α -прегненол-3 β -он-20, а также β -ситостерин. Для идентификации полученных продуктов они были окислены хромовым ангидридом, а разделение продуктов окисления проводили на пластинках силикагель—гипс в системах: дизопропиловый эфир, дизопропиловый эфир—этилацетат (5 : 2).

Тонкослойная хроматография⁴¹ применяется также для контроля протекания реакций стероидных соединений, проводимых при помощи микробиологических методов (введение гидроксильных групп, двойных связей и др.).

Разделение некоторых эстрогенных гормонов⁴² на слое силикагель—гипс или силикагель—крахмал проведено в системе пентан—этилацетат (9 : 1) и (3 : 2), а также в системе бензол—этанол (9 : 1)⁴³. Пятна обнаруживали раствором треххлористой сурьмы в хлороформе нагреванием при 200—250° и в УФ-свете. На пластинках, приготовленных с крахмалом, проявление проводили парами иода или 0,5% раствором перманганата калия и затем водой. Описан также⁴³ спектрофотометрический метод определения состава смеси этих веществ.

Новым эффективным методом разделения стероидных соединений¹⁹ является хроматографирование на тонком, незакрепленном слое окиси алюминия или силикагеля. Этот метод позволяет применять адсорбенты любой активности. Разделение проводили на слое окиси алюминия (V активности) в различных простых системах и растворителях (бензол, эфир и смеси: гексан—бензол, бензол—эфир, эфир—этанол). В работе была изучена зависимость адсорбционной способности¹⁹ различных стероидных соединений главным образом андростанового и холестанового рядов от их полярности и положения и конфигурации функциональных групп в стероидном скелете. Хроматограмму проявляли H_2SO_4 .

Основания обнаруживали реагентом Драгендорфа. Нижняя граница обнаружения серной кислотой, проверенная на примере 6 соединений от 5 до 100 μ г.

Для проявления применяли также опрыскивание раствором морина или хроматографирование проводили на слое окиси алюминия, пропитанном морином⁵⁵.

В работе¹⁹ описано препаративное разделение эпимеров 5 α -холестанола-3 α и 5 α -холестанола-3 β на слое нейтральной окиси алюминия, пропитанной морином в системе бензол—эфир (7 : 3). Разделение про-

ходит с количественным выходом. Хорошие результаты были получены при анализе ряда эпимерных 3 α - и 3 β -стериоидных соединений. Как правило, изомеры, имеющие экваториальное положение полярного заместителя, более прочно удерживаются на окиси алюминия. Исключением являются лишь андрост-5-ен-3 β -, 17 α - и 3 β -, 17 β -диолы.

В этой же работе¹⁹ на незакрепленном слое силикагеля в системе бензол — этилацетат (1 : 1) получены хорошие результаты разделения стериоидных соединений ряда прогнана.

Разделение стериоидных соединений²⁰ на незакрепленном слое окиси алюминия III активности было проведено также и в системе бензол — этанол в различных соотношениях. Было разделено еще 50 стериоидных соединений, содержащих от одной до пяти функциональных групп. В работе²⁰ обсуждается влияние различных заместителей на общую адсорбционную способность стериоидных соединений. Показано, что разделение на продажной (щелочной) окиси алюминия и специально очищенной (нейтральной) дает одни и те же результаты. Однако в случае щелочной окиси алюминия наблюдается все же частичный гидролиз у очень неустойчивых соединений и полное разложение у таких соединений как трихлор- и трифторацетаты стериоидных соединений.

4. Гликозиды

Для подтверждения строения некоторых сердечных гликозидов, извлеченных из корня *Uzarawurzel*, была применена тонкослойная хроматография⁹⁴ на слое силикагель — гипс. Этот метод особенно хорош при определении алло-узаригенина наряду с другими узаригенинами. В системе динопропиловый эфир — ацетон (3 : 1) и в этилацетате определены значения R_f ряда карденолидов. Для обнаружения пятен сухую пластинку, прогретую при 130° в течение 5—10 минут, опрыскивали раствором хлорсульфоновой кислоты в уксусной кислоте (1 : 2) и затем нагревали 5 мин. при 130° и пятна обнаруживали в УФ-свете.

Разделение на тонком слое силикагель — гипс было применено также для быстрого анализа смеси гликозидов *Digitalis* и *Podophyllum*¹². Для разделения сердечных гликозидов *Digitalis* применяли систему хлористый метилен — метанол — формамид (80 : 19 : 1). Хроматограмму проявляли трихлоруксусной кислотой и хлорамином (16 : 1) с последующим нагреванием при 110° в течение 10 мин. и обнаружением в УФ-свете. При этом проявляется до 0,1 мг сердечного гликозида при дневном свете и до 0,01 мг в УФ-свете. Существующие методы бумажной хроматографии позволяют открывать не менее 3—5 мг. Этим путем были разделены: втор.-глюкозиды, дигиланиды А, В и С, дезацетилдигиланиды А, В и С, дигиталоиды.

Разделение содержащихся в обоих видах *Podophyllum* лигнангликозидов и аглюконов проводили при помощи двуступенчатого способа. Вначале разделение проводили в системе хлороформ — метанол (90 : 10), при этом делили гликозиды и затем в системе хлороформ — ацетон (65 : 35) осуществляли разделение аглюконов. Между обеими ступенями в течение 5 минут холодным воздухом удаляли растворитель. Проявление производили опрыскиванием смесью серной и уксусной кислот (1 : 1) и нагреванием в течение 10 мин. при 100°. Нижняя граница проявления 0,3 мг. Таким образом разделены глюкозиды (α -пелтатин- β -глюкозид, подофиллотоксинглюкозид, β -пелтатин- β -D-глюкозид) и аглюконы (4,4'-диметилподофиллотоксин, α -пелтатин, подофиллотоксин, β -пелтатин и 1-дезоксиподофиллотоксин).

Недавно было описано⁹⁵ разделение на слое полиамидного порошка 14 гликозидов, у которых аглюконами являлись: камферол, кверцетин, мирицетин, а в углеводную часть включались: рамноза, арабиноза, глюкоза и галактоза. В этой работе показано резкое разделение 3-моноизидов, 3-биозидов и 3,7-гликозидов. Деление проводили в системах: этанол — вода (3 : 2), вода — этанол — ацетилацетон (4 : 2 : 1), вода — этанол — метил — этилкетон — ацетилацетон (13 : 3 : 3 : 3 : 1). Пятна обнаруживались в УФ-свете.

5. Липиды

В последнее время в биохимических исследованиях большое внимание уделяется установлению состава природных липидов. Обычно исследуются продукты их гидролиза. Для разделения и идентификации последних применяют хроматографические методы.

В первой работе⁹⁶, посвященной разделению липидов, при помощи тонкослойной хроматографии была показана возможность разделения различных классов соединений, входящих в состав липидов. На слое силикагель — гипс в системе петролейный эфир (т. кип. 60—70°) — эфир (92 : 8) были разделены продукты гидролиза липидов, состоящие из высших жирных спиртов, эфиров кислот, ацетилглицеридов, диацетилмоглициеридов и диацетилглицериновых эфиров. Хроматограммы проявляли либо при действии паров иода на пластинку, опрысканную 0,2%-ным спиртовым раствором α -циклодекслина, роданином В, либо опрыскиванием концентрированной серной кислотой.

Описано также⁹⁷ разделение и идентификация продуктов гидролиза природных жиров, масел и восков на слое силикагель — гипс в системе гексан — эфир (95 : 5) и петролейный эфир — эфир — уксусная кислота (70 : 30 : 1) и (70 : 30 : 2). Хроматограмму опрыскивали 0,2%-ным спиртовым раствором 2', 7'-дихлорфлуоресцена.

Для анализа липидов при помощи тонкослойной хроматографии наряду с адсорбционным методом применяется также способ, в основе которого лежит распределительная хроматография⁹⁸.

На пропитанном слое⁹⁸ в эфире хорошо разделяются различные классы соединений, полученные при гидролизе липидов, начиная от углеводородов и кончая фосфатидами. В системе петролейный эфир (60 : 70°) — эфир — уксусная кислота (90 : 10 : 1) разделены высшие алифатические углеводороды, спирты, альдегиды, кислоты и сложные эфиры. Более полярные соединения — моноглицериды, глицериновые эфиры и фосфатиды разделены в системе петролейный эфир — эфир — уксусная кислота (70 : 30 : 1). Хроматограмму опрыскивали 0,2%-ным спиртовым раствором 2', 7'-дихлорфлуоресцена. К сожалению, величина R_f для гомологических рядов соединений с длинными углеродными цепями остается одинаковой. По аналогии с делением гомологических рядов на пропитанной бумаге был применен слой силикагель — гипс, пропитанный 5%-ным раствором силиконового масла в эфире. В системе ацетонитрил — уксусная кислота — вода (70 : 10 : 25) этим методом были разделены смеси метиловых эфиров высших жирных кислот.

Для обнаружения насыщенных соединений применяли раствор α -циклодекстрин — иодата. Ненасыщенные соединения обнаруживали парами иода.

В последнее время опубликован ряд сообщений^{46, 47, 99, 100}, посвященный подробному изучению разделения липидов при помощи тонкослойной хроматографии. При этом исследовались как модельные смеси про-

дуктов гидролиза липидов, так и смеси, полученные из природных липидов.

В сообщении I⁹⁹ описано разделение на слое силикагель—гипс в эфире следующих классов соединений: высшие жирные альдегиды, кислоты, кетокислоты (C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{20}) и моноглицериды. Моно-, ди- и триглицериды высших жирных кислот разделены в изопропиловом эфире. Проведено также разделение триглицеридов жирных кислот, окси-, диокси-, эпокси-, диэпокси-жирных кислот в изопропиловом эфире + 1,5% уксусной кислоты.

В качестве реагента для обнаружения применяли спиртовый раствор фосфорномолибденовой кислоты и раствор родамина В. Двумерным способом на том же слое разделено 11 соединений различных классов (рис. 9).

В той же работе⁹⁹ проведено разделение на пропитанном ундеканом слое силикагель — гипс в системе ацетонитрил — уксусная кислота (1:1) гомологических рядов высших жирных спиртов, насыщенных и ненасыщенных кислот. Эпокси- и эписульфидо-жирные кислоты разделяли на том же слое в 80%-ной уксусной кислоте. Пластиинки затем опрыскивали фосфорномолибденовой кислотой. Для разделения диглицеридов служила трехкомпонентная система хлороформ — метанол — вода (5:15:1). Применение воды совершенно необходимо для уменьшения растворимости ундекана в хлороформе (обнаружение родамином В). Применялись и другие системы, как например: ацетон —

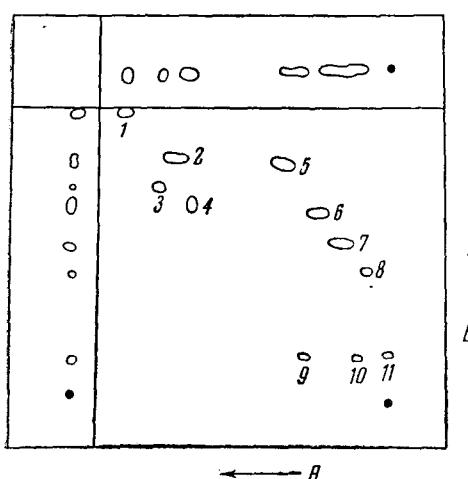
Рис. 9. Хроматограмма разделения смеси соединений различных классов на слое силикагель — гипс с применением двумерного способа.

Системы: A — эфир (30 мин.); B — изопропиловый эфир + 1,5% уксусной кислоты (45 мин.). 1 — тристеарин, 2 — миристиловый альдегид, 3 — дистеарин, 4 — стеариновый спирт, 5 — стеариновая кислота, 6 — 9,10-окись стеариновой кислоты, 7 — 12-окисстеариновая кислота, 8 — 9,10-12,13-диокисстеариновой кислоты, 9 — моностеарин, 10 — амидстеариновой кислоты, 11 — 9,10-диокисстеариновая кислота. Обнаружение фосфорномолибденовой кислотой

ацетонитрил (7:3), в которой были разделены как насыщенные, так и ненасыщенные триглицериды. Применение двумерного способа со слоем, пропитанным ундеканом, позволяет лучше разделять вещества, чем в случае не пропитанного слоя. На рис. 10 дана хроматограмма деления смеси ди- и триглицеридов и жирных кислот.

В сообщении III^{*} предложен новый способ окрашивания тонкослойных хроматограмм¹⁰⁰, основанный на фиксации слоя дихлорметилсиалном, что позволяет погружать пластинку в водные растворы и тем самым применить специфические методы окрашивания, используемые в бумажной хроматографии. В работе дан пример разделения высших жирных кислот на слое кизельгур — гипс в системе уксусная кислота — ацетонитрил (1:1), фосфатидов в системе хлороформ — метанол — вода (11:5:11) и триглицеридов в системе ацетон — ацетонитрил (8:2).

* Сообщение II⁸⁷ посвящено разделению холестериновых эфиров жирных кислот и изложено в разделе «стериодные соединения и эфиры холестерина» (87, стр. 836).



← A

↑ B

Для обнаружения кислот применяли ацетат меди и рубеановодородную кислоту. Фосфатиды обнаруживались 1%-ным раствором фосфорномolibденовой кислоты в смеси хлороформа и этанола (1:1) и после удаления растворителей промыванием пластиинки проточной водой и погружением в 1%-ный раствор хлорного олова в 2*N* соляной кислоте. Триглицериды после погружения пластиинки в 20%-ный водный этанол обнаруживались методом транспаренции¹⁰¹.

В сообщении IV тот же автор с сотрудниками более подробно изучил разделение триглицеридов⁴⁶, включая 20 синтетических и множество природных триглицеридных соединений на слое кизельгур — гипс, пропитанном углеводородами или силиконовыми маслами. Было испробовано несколько углеводородов: ундекан, жидкий парафин, додекан и тетрадекан, представляющий собой нефтяную фракцию с т. кип. 240° (так называемый Tetradekan Stand.). Последний оказался наиболее удобным и был применен для пропитывания слоя. В этой работе⁴⁶ описано разделение насыщенных и ненасыщенных триглицеридов и их смесей на слое кизельгур — гипс, пропитанном тетрадеканом в системе ацетон — ацетонитрил (8:2), из которой 80% были насыщены тетрадеканом. Пластиинки проявлялись парами иода и опрыскиванием раствором родамина B.

В этой же работе даны примеры разделения насыщенных синтетических триглицеридов на слое кизельгур — гипс, пропитанном низкомолекулярным силиконовым маслом с вязкостью 50 сантистокс, в системе метанол — ацетонитрил (5:4). Ненасыщенные триглицериды разделялись в системе метанол — ацетонитрил — пропионитрил (5:4:1,5). На том же слое разделяли и природные триглицериды в системе метанол — ацетонитрил — пропионитрил (5:4:1,5) на 95%, насыщенной высокомолекулярным силиконовым маслом (1000 сантистокс). Пятна обнаруживались при действии паров иода и фосфорномolibденовой кислотой.

В сообщении V тем же автором описано⁴⁷ разделение различных синтетических кетокислот, 2-оксикислот и лактонов с длинными цепями на пропитанном слое кизельгур — гипс. Было осуществлено разделение 14 синтетических жирных кетокислот и лактонов на указанном слое, пропитанном тетрадеканом в системе уксусная кислота — вода (80:20), на 80% насыщенной тетрадеканом. Те же кислоты и лактоны в смеси с жирными кислотами были разделены на слое, пропитанном ундеканом в системе уксусная кислота — вода (80:20), на 75% насыщенной ундеканом.

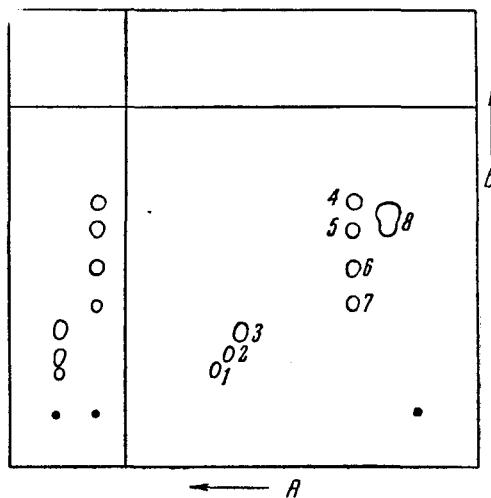


Рис. 10. Хроматограмма разделения смеси диглицеридов кислот двумерным способом на слое силикагель — гипс, перед разделением в направлении Б — пропитанном ундеканом. Системы: А — дихлорэтан, Б — ацетон — ацетонитрил (7:3). 1 — триолеин, 2 — тримиристин, 3 — трилаурин, 4 — дигалурин, 5 — димиристин, 6 — дипальмитин, 7 — дистеарин, 8 — жирные кислоты.

Проявление фосфорномolibденовой кислотой

Там же дан пример разделения на слое, пропитанном тетрадеканом 2-оксикислот и жирных кислот и их смесей в системах уксусная кислота и вода (75:25) и (90:70) на 75% насыщенных тетрадеканом (обнаружение раствором родамина В).

При помощи тонкослойной хроматографии удалось разделить^{102,103} некоторые структурные изомеры высших жирных кислот и эфиров, содержащих окси- и хлорокси-группы. На слое силикагель — гипс в системе петролейный эфир — эфир (8:2) разделены 9-окси-транс-10, цис-12-октадекадиеновая и 13-окси-цис-9-транс-11-октадекадиеновая кислоты¹⁰². На том же слое разделены¹⁰³ трео-12-хлор-13-оксиолеиновая и трео-13-хлор-12-оксиолеиновая кислоты и их эфиры в системах: для эфиров петролейный эфир (т. кип. 30—45°) — эфир (9:1) и для кислот та же система с добавлением 1%-ной уксусной кислоты (обнаружение серной кислотой и 2',7'-дихлорфлуоресцеином и УФ-светом). Полученный результат указывает на то, что во многих случаях тонкослойная хроматография оказывается более эффективной, чем бумажная хроматография, при помощи которой пока не удавалось разделение подобных соединений.

Даже газо-жидкостная хроматография, обладающая наиболее эффективной техникой разделения жирных кислот в виде их метиловых эфиров, не может полностью разделить очень сложных смесей. Например, эфиры насыщенных нормальных и разветвленных кислот перекрываются эфирами высоконенасыщенных кислот с более короткой длиной цепи, что затрудняет и делает невозможным осуществление количественного анализа липидов этим методом. Комбинированное применение обоих методов газо-жидкостной и тонкослойной хроматографии облегчает эту задачу. Для этой цели¹⁰⁴ эфиры ненасыщенных кислот превращали в ацетоксирутные производные и последние отделяли от эфиров насыщенных кислот на слое силикагель — гипс с применением двуступенчатого способа. В системе петролейный эфир (т. кип. 60—70°) — эфир (4:1) насыщенные эфиры (R_f 0,9) отделялись от ртутных производных ненасыщенных эфиров (R_f 0,1) (пробег 15—18 см). Затем в системе пропанол — уксусная кислота (100:1) в том же направлении разделялись ртутные производные (3—4 часа пробег 12—14 см). При этом разделялись ртутные производные кислот, содержащих одну двойную связь (R_f 0,85), две двойных связи (2 пятна R_f 0,55 и 0,45), три двойные связи (R_f 0,15) и более ненасыщенных (R_f 0,0). После сушки пластинку проявляли 1%-ным спиртовым раствором дифенилтиокарбазона. Затем пятна, соответствующие насыщенным эфирам (R_f 0,9), выскребали с пластинки, вещество экстрагировали и выделенные насыщенные кислоты анализировали при помощи газо-жидкостного метода.

Методом тонкослойной хроматографии осуществляли контроль за ходом реакции ацетилирования моноглицеридов, полученных из различных жиров, на слое силикагель — гипс в системе эфир — петролейный эфир (т. кип. 66—67°) (8:92)¹⁰⁵, а также контроль синтеза линоленового альдегида на том же слое в системе петролейный эфир (т. кип. 30—60°) — эфир (95:5)¹⁰⁶.

Описано также¹⁰⁷ разделение жирных кислот и α -глицериновых эфиров, содержащихся в аллоксиглицеридах, выделенных из масла печени рыбы и применение тонкослойной хроматографии для выяснения состава вытяжки из Feces и Fecalithes¹⁰⁸.

При изучении липидов распада человеческого мозга необходимо быстро идентифицировать главные фракции, полученные при хроматографическом делении на колонке. Для этой цели была применена тонкослойная хроматография на слое силикагель — гипс¹⁰⁹. Этот метод дает лучшие результаты разделения, чем бумажная хроматография,

благодаря более резкому разделению зон. Продолжительность разделения всего 60—90 мин. при длине пробега 10—15 см. Предложенный автором¹⁰⁹ универсальный реагент для обнаружения позволяет открывать некоторые липидные компоненты, количество которых в смесях составляет всего 0,2%. Нижняя граница определения от 0,1 до 1 мг. 30 образцов липидов и их производных, часть которых специально синтезирована, проверены в 12 различных системах и растворителях и указан способ их разделения.

В качестве универсального реагента для липидов предложены следующие два раствора: 1) 50 г бромтимолового синего, 1,25 г борной кислоты, 8 мл 1,0 N NaOH и 112 мл воды и 2) 40 г бромтимолового синего и 100 мл 0,01 N NaOH. Нижние границы обнаружения лежат от 0,1 мг (например сфингомиelin) до 1 мг (например церебронсерный эфир).

Кроме того, дан ряд специальных реагентов для определения: холестерина и его эфиров (нижняя граница 2—4 мг), насыщенных и ненасыщенных α-моноглицеридов (нижняя граница 1—3 мг), фосфо- и гликоглипидов (нижняя граница для цереброна 4 мг, для церебронсерного эфира 10 мг). Тот же автор применил этот метод¹¹⁰ при изучении состава сфингоглипидной фракции нормального и патологически измененного человеческого мозга на том же слое в системе *n*-пропионол — 12%-ный аммиак (8 : 2).

Недавно³⁶ было исследовано разделение цереброзидной фракции сфингоглипидов головного мозга крупного рогатого скота на тонком слое силикагель (КСК) — гипс. В системе хлороформ — метанол (8 : 2) были обнаружены четыре индивидуальных цереброзида: цереброн, керазин, нервон и оксинервон. В качестве проявителя применяли концентрированную серную кислоту. Результаты, полученные на пластинке, были использованы для разделения этих соединений на колонке с силикагелем.

Тонкослойная хроматография применена также для разделения гликоглипидов и фосфатидов¹¹¹ на слое силикагель — гипс в системе хлороформ — метанол — вода (60 : 35 : 8). При этом обнаружены цереброзид и цереброзидсерный эфир. В той же системе в соотношении (65 : 25 : 4) разделены лизолецитин, сфингомиэлин, лецитин, коламинкефалин, цереброзид, кардиолипин. Обнаружение родамином В и реагентом Драгендорфа.

На том же слое разделены¹¹² в системе *n*-бутанол — пиридин — вода (3 : 2 : 1) некоторые продукты ганглиозидных фракций человеческого мозга. Описано также⁶⁰ количественное определение в лекарственных растениях коламинкефалина и лецитина при помощи тонкослойной хроматографии.

6. Углеводы и поликсисоединения

Разделение гидрофильных соединений, таких как углеводы, методом тонкослойной хроматографии удалось лишь при применении модифицированных слоев адсорбента.

Ряд сахаров был разделен на слое кизельгур — гипс^{11,13}, пропитанном 0,02 M раствором ацетата натрия в системе этилацетат — 65%-ный изопропанол (65 : 35) в пересыщенной камере. Сахара наносили на пластинку в растворе пиридина и обнаруживались опрыскиванием свежеприготовленным раствором концентрированной серной кислоты и анисового альдегида в этаноле*. Как указывает автор, этот метод

* 0,5 мл конц. серной кислоты и 0,5 мл анисового альдегида в 9 мл 95%-ного этанола.

оказался в 20 раз более чувствительным, чем до сих пор известные методы анализа на бумаге. Для разделения сахаров на бумаге, как известно, оптимально наносят 100—500 мг смеси сахаров и при этом нижняя граница определения лежит не ниже 5 мг. Для анализа же на слое кизельгур — гипс с применением для проявления реагента анисовый

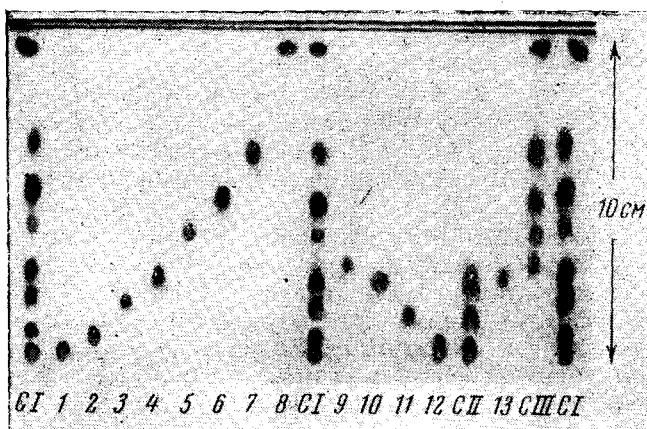


Рис. 11. Хроматограмма смесей сахаров на буферном слое кизельгур — гипс. (На рисунке даны сахара: 1 — лактоза, 2 — сахароза, 3 — глюкоза, 4 — фруктоза, 5 — D(+) - ксилоза, 6 — D(−)-рибоза, 7 — L(+) -рамноза, 8 — D(+) -дигитоза, 9 — L(+) -арабиноза, 10 — D(+) -манноза, 11 — D(+) -галактоза, 12 — мальтоза, 13 — L(−) -сорбоза. CI — смесь с 1 по 8; CII — смесь с 9 по 12; CIII — смесь с 5 по 9)

альдегид — серная кислота, нижняя граница определения сахаров 0,05 мг. Лучшее разделение достигается при 0,5 мг вещества и максимальное наносимое количество — 5 мг сахара.

На рис. 11 изображена хроматограмма сахаров на буферном слое кизельгур — гипс^{11,13}.

Проведено также⁴² качественное и количественное разделение сахаров на слое силикагель — гипс, пропитанном борной кислотой (на 4 г силикагеля 6 мл 0,1 N борной кислоты). В этом случае хроматографирование проводили в кислых системах бензол — метанол — уксусная кислота (1:3:1) и метилэтилкетон — метанол — уксусная кислота (3:1:1), а для обнаружения применяли опрыскивание смесью 20%-ной серной кислоты и 0,2%-ным раствором нафтрезорцина (1,3-диоксидафталина) в этаноле (1:1) и просушивание при 105°. При этом обнаруживались моно- и дисахариды и уроновые кислоты.

Метод количественного разделения сахаров, описанный в той же работе, основан на элюировании сахаров из высокобленных с пластинки пятен и некоторых превращениях выделенных соединений.

В связи с изучением химии макролидных антибиотиков³⁷ была исследована недавно возможность обнаружения полиоксиоединений на тонком слое силикагель — гипс. Исследовались углеводы и родственные им вещества (глюкоза, лактоза, гликосахарин), многоатомные спирты (этилен- и пропиленгликоли, глицерин, 3-метилгексин-1-диол-3,4) и поликислоты (винная и 2,3-диокси-2-метилпентановая

кислоты). Для обнаружения использовали реагенты на α -гликольную группировку, применяемые обычно в бумажной хроматографии: смесь 5%-ного водного раствора нитрата серебра с аммиаком, щелочной раствором периодата натрия и перманганата калия, тетраацетат свинца с последующим опрыскиванием розанилином и периодат калия с бензидином. Большинство изучаемых веществ обнаруживалось лишь в количестве 20—50 мкг. Чувствительность всех реагентов в этом случае оказалась в 2—5 раз ниже, чем на бумаге.

7. Фенолы, фенолкарбоновые кислоты и хиноны

Известно несколько примеров деления летучих фенолов на тонком слое силикагеля, фиксированного на пластинке крахмалом⁴ или гипсом^{7,8} в различных системах.

Наиболее обстоятельно описаны¹¹³ анализ фенола, *o*-, *m*- и *p*-крезолов, гваяколя, эвгенола и тимола в хлороформе, ксиоле и их смесях (75 : 25), (50 : 50), (25 : 75) на тонком слое силикагель — кизельгур — крахмал (1 : 1 : 1). Во всех случаях для обнаружения применяли опрыскивание диазотированной сульфаниловой кислотой, а также спиртовым раствором FeCl_3 и концентрированной серной кислотой.

Этот метод был применен¹¹⁴ также для контроля реакции ступенчатого метилирования β -резорциловой кислоты. Исследование продуктов метилирования во время реакции при помощи тонкослойной хроматографии на флуоресцирующем слое силикагеля позволило направить реакцию в желаемую сторону. Для этой цели были применены системы петролейный эфир (т. кип. 66—67°) — эфир (3 : 7). Этим методом был также обследован ряд ароматических поликислоединений.

Недавно было описано также¹¹⁵ разделение ряда фенолов и фенолкарбоновых кислот на слое силикагель — гипс в кислых системах бензол — диоксан — уксусная кислота (90 : 25 : 4) и бензол — метanol — уксусная кислота (45 : 9 : 4). Для обнаружения применяли: диазотированный бензидин, диазотированную сульфаниловую кислоту, диазотированные: 5-нитро-2-аминоанизол, 1-амино-4-бензоиламино-2,5-диэтоксibenзол и тетразотированный ди-*o*-анизидин.

Некоторые ароматические оксикислоты¹³ и полифенолы разделялись также в системе бензол — метилацетат — 80%-ная муравьиная кислота (4 : 4 : 2). Успешно разделены природные бензохиноны¹¹⁶ на дезактивированных на воздухе пластинах силикагель — крахмал в системе гексан — этилацетат (85 : 15).

Описано также¹¹⁷ разделение смеси 2,2'-метил-бис(4-хлорфенола) и 2,2'-метилен-бис(3,4,6-трихлорфенола) на слое силикагель — крахмал в гексане, насыщенном уксусной кислотой. Обнаружение проводилось растворами хлорного железа и феррицианидом калия.

8. Кумарины и флавоноиды

При изучении экстракта лимона при помощи адсорбционной хроматографии на колонке и хроматографии на тонких флуоресцирующих слоях силикагель — гипс¹¹⁸ или крахмал¹¹⁹ в системах гексан — этилацетат (75 : 25) было выделено и охарактеризовано несколько замещенных кумаринов.

Этот метод был применен позднее⁵⁷ для количественного фотометрического определения некоторых из вышеописанных кумаринов, а также для их определения в некоторых пищевых¹²⁰ и лекарственных продуктах¹²¹.

Недавно для разделения при помощи тонкослойной хроматографии многокомпонентных смесей α - и β -пиронов, кумаринов, флавоноидов и гидрохинонов были применены кислые системы^{13,14} типа толуол — этилформиат — муравьиная кислота (5:4:1). Этот метод оказался значительно более чувствительным, чем определение при помощи бумажной хроматографии. При обнаружении в УФ-свете с длиной волны чувствительность для кумаринов 0,1 μg . Методом тонкослойной хроматографии были разделены следующие кумарины: эскулин, эскультин, скополетин, 4-метилумбеллиферон, ксантолоксин, бергентен, императорин и атаманин.

Разделенные этим методом флавоноиды робинетин, морин, токсифолин, кверцетин, кемпферол, нарингенин, хризин проявлялись 1%-ным раствором β -аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты в метаноле и затем обнаруживались в УФ-свете. Чувствительность метода 0,1 μg . Гидрохинон, его эфиры и глюкозиды обнаруживались реагентом Миллона, который приготавлялся путем растворения 5 г ртути в 10 г дымящей серной кислоты и добавлением 10 мл воды. Нижняя граница определения для арбутина и метиларбутина 5 μg , гидрохинона и его метилового эфира 1 μg , его диэтилового эфира 10 μg .

Для разделения флавоноидных гликозидов применена система этилацетат — метилэтилкетон — муравьиная кислота — вода (5:3:1:1). В этой работе описано также разделение ароматических оксикислот, некоторых дубильных веществ и фенолглюкозидов в системе толуол — этилформиат — муравьиная кислота (5:4:1) и веществ, содержащихся в лишайниках.

В другой работе флавоноиды были также разделены¹²² на тонком слое (0,1—0,2 мм) полиамидного порошка силона (капрона).

9. Каротиноиды и витамины

Еще в 1958 г. некоторые каротиноиды были разделены²³ на пластинке силикагель — крахмал в системе гексан — эфир (3:7). На том же слое в системе бензол — этилацетат — этанол (90:20:7,5) разделены пигменты тетрагидропирролового ряда²³.

За последние два года тонкослойная хроматография нашла широкое применение¹²³ при исследовании различных классов каротиноидов и, особенно, каротиноидных альдегидов, встречающихся в очень малых количествах в природных продуктах. Для обнаружения этих соединений был предложен новый чувствительный реагент^{124,125} — опрыскивание спиртовым раствором роданина и затем концентрированным водным раствором амиака или едкого натра. Этот реагент позволяет проявлять до 0,03 μg полиенового альдегида. Недавно¹²⁵ на пластинке, пропитанной жидким парафином со слоем силикагель — гипс в метаноле, насыщенном парафиновым маслом, были разделены ретенин (витамин А) и β -апо-8-каротиналь.

Для разделения каротиноидных альдегидов¹²⁶ применяли как пропитанные, так и непропитанные слои. На слое силикагель — гипс — $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (5:20), пропитанном парафиновым маслом, в системах петролейный эфир — бензол (1:1) и в некоторых случаях в той же системе с добавкой 1%-ного метанола разделены каротиноидные альдегиды со следующим значением R_f :

C_{40}	C_{37}	C_{35}	C_{32}	C_{30}	C_{27}	C_{25}	C_{20}
0,28	0,34	0,377	0,473	0,488	0,633	0,588	0,855

На непропитанном слое ясно видны два ряда со значением R_f , принадлежащим альдегидам C_{40} , C_{35} , C_{30} и C_{25} , с одной стороны, и C_{37} , C_{32} и C_{27} — с другой стороны.

Разделены также¹²⁷ семь синтетических β -апокаротиналей C_{25} — C_{40} ряда на слое гидроокиси кальция — силикагель — гипс (6:1) в системе петролейный эфир — бензол (2:3) и в той же системе шесть метиловых эфиров β -апокаротиновых кислот (C_{27} — C_{30}).

Этим методом были обнаружены¹²⁸ жирорастворимые витамины α -токотерол и витамин А при разделении липидов на слое силикагель — гипс в системе этилацетат — петролейный эфир (2:8) и проявлению серной кислотой.

Тонкослойная хроматография была применена также для разделения витаминов¹²⁹ группы В (B_1 , B_2 , B_6 , амида никотиновой кислоты, биотина и кальциевой соли пантотеновой кислоты) и витамина С. Хроматографирование проводили на пластинке силикагель — гипс, содержащей 2% флуоресцирующего вещества (ZS — Super) в системе уксусная кислота — ацетон — метанол — бензол (5:5:20:70). В этой системе витамин B_1 остается на старте. Для обнаружения пятен прежде всего пластинку рассматривали в УФ-свете с длиной волны 366 μm , при этом флуоресцирующий; слой остается темным, а витамин B_2 (R_f 0,35) светится ярко на темном фоне. После этого пластинку освещали УФ-светом с длиной волны 254 μm и тогда на светлом фоне оставались темные пятна витаминов B_1 (R_f 0,0), витамина С (R_f 0,30) и амида никотиновой кислоты (R_f 0,65). Для обнаружения биотина другую пластинку опрыскивали иодоплатинатом калия при этом обнаруживались биотин (R_f 0,80), витамин B_1 , никотинамид и витамин С в виде пятен, окрашенных в разные цвета. Для обнаружения витамина B_6 и кальциевой соли пантотеновой кислоты, нижнюю часть другой пластинки опрыскивали 0,1%-ным раствором дихлорхинонхлорида в этаноле, насыщенном парами аммиака. В этом случае проявляется витамин B_6 (R_f 0,15). Затем пластинку нагревают до 160° и верхнюю часть пластинки опрыскивают 0,5%-ным раствором нингидрина в этаноле и вновь нагревают до 160° при этом проявляется кальциевая соль пантотеновой кислоты. Чувствительность метода 1—10 μg для витаминов группы В и от 5 до 30 μg для витамина С.

При разделении витаминов и провитаминов А и витаминов K_1 , K_2 и K_3 ⁵⁴ на незакрепленном слое окиси алюминия для обнаружения рекомендуется применять 70%-ную хлорную и 98%-ную серную кислоты. Для этой цели после разделения пластинка сушится на воздухе и слой окиси алюминия пропитывается указанными выше кислотами со стороны, перпендикулярной направлению деления.

10. Антиоксиданты и пластификаторы

Тонкослойная хроматография на слое силикагель — гипс была применена также для разделения и идентификации антиоксидантов пищевой промышленности¹³⁰, что сильно облегчило их исследование. Лучшей системой оказалась смесь хлороформ — метилцеллозольв (80:20). Этим методом были успешно разделены 24 различных антиоксиданта. Обнаружение производили опрыскиванием пластинки 2%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты в метаноле и через 1—2 минуты действием паров аммиака. Затем пластинку нагревали 10 минут при 120°, при этом некоторые пятна проявлялись дополнительно. Кроме того можно опрыскивать 1%-ным раствором 2,6-дихлорхинонхлорида в этаноле и затем 2%-ным раствором боракса в 40%-ном этаноле. Для разделения антиоксидантов применяли также двумерную хроматогра-

фию. При этом одно направление проводилось в бензоле, а второе — в хлороформе.

Хорошие результаты при анализе α -, β -, γ - и δ -токоферолов и их смесей были получены⁵⁸ при делении на слое силикагель — гипс в хлороформе и на слое окись алюминия — гипс в бензоле. В обоих случаях, при опрыскивании раствором фосфорномолибденовой кислотой β - и γ -токоферолы, отличающиеся положением гидроксильных групп, имели одинаковые значения R_f . Однако опрыскивание церий-IV-сульфатным реагентом¹³¹ дает пятна разного цвета, что позволяет их легко идентифицировать. Наряду с качественным разделением описано количественное разделение токоферолов.

Применение модифицированного слоя силикагель — кизельгур с добавкой щавелевой кислоты⁴¹ в системе бензол — этилацетат (6:4) позволяет определить качественно и количественно (с точностью $\pm 5\%$) наличие в смеси галлатов, норгидрогваяретовой и аскорбиновой кислот. Кроме проявления церий-IV-сульфатным реагентом можно также применять для этой цели 2,6-дихлорхинонхлорамид, при этом слой силикагель — кизельгур следует пропитывать бораксом в отношении 25:4,5. Количественное деление антиоксидантов основано на измерении величины пятна при помощи графической интерполяции.

Смеси пластификаторов¹³² были разделены на слое силикагель — гипс с добавкой 0,05% ультрафора в следующих системах: изооктан — этилацетат (9:1), бензол — этилацетат (95:5) и дибутиловый эфир — гексан (9:1) и обнаруживались в УФ-свете с длиной волнами 365 мкм . Этим методом были разделены следующие соединения: триацетат глицерина, этилфталилэтилгликолат, ацетилтриэтилцитрат, триэтилфосфат, диэтилфталат, бутилфталилбутилгликолат, 2-этилгексилдифенилфосфат, диэтилфталат, ацетилтрибутилцитрат, ди-*n*-бутилфталат, ди-изобутиладипат, дибутилсебацинат, динонилфталат, ди-2-этилгексилфталат, бутилстеарат. Для обнаружения пластификаторов дан ряд специфических цветных реакций.

11. Инсектициды

Ранее было замечено¹³³, что на слое силикагель — гипс в системе гексан — этилацетат (80:20) можно осуществить разделение смеси пиретрина I (R_f 0,42) и пиретрина II (R_f 0,21). Найденная система была применена затем для анализа экстракта пиретрума на колонке с силикагелем.

Как известно, пиретрины под влиянием света и воздуха быстро превращаются через их перекиси в люмибиретрины. При изучении этого процесса была применена тонкослойная хроматография¹⁰. Особенный интерес этой работы заключается в удачном применении способа «разделение — реакция — разделение». При этом легко обнаруживаются изменения полярности отдельных компонентов смеси от действия, например: γ -, рентген-, УФ-лучей, повышенной температуры и различных газов на смесь органических соединений. При изучении окисления пиретринов в этой работе был применен двумерный способ деления в системе гексан — этилацетат (75:25) в обоих направлениях. Нанесенные на пластинку соединения освещались солнцем или УФ-светом и нагревались. Если бы окисление не происходило, то пятна должны были бы лежать почти на диагонали хроматограммы, но так как окисление идет, то благодаря появлению веществ с другими значениями R_f , как видно на хроматограмме (рис. 12), пятна продуктов превра-

шения лежат ниже диагонали: пиретрин I и II — перекиси и люми-пиретрины.

Недавно тонкослойная хроматография была применена также¹³⁴ для разделения некоторых синтетических инсектицидов. Так, на слое силикагель — гипс в системе гексан — ацетон (4 : 1) были разделены тиофосфорные эфиры со следующим значением R_f : диазинон 0,76—0,82, паратион 0,65—0,68, метасистокс 0,62—0,64, мелатион 0,52—0,54, хлортион 0,43—0,45, фак 0,20—0,26, рогор 0,04—0,07. Обнаружение осуществлялось при помощи слегка подкисленного 0,5%-ного раствора хлористого палладия.

На слое окись алюминия — гипс II активности по Брокману, в гексане, в пересыщенной камере, разделены следующие хлорсодержащие инсектициды: альдрин 0,78—0,82, ДДТ 0,59—0,62, пертан 0,48—0,50, гексахлорциклогексан 0,39—0,41, диэльдрин 0,17—0,19, метоксихлор 0,10—0,12. Обнаружение проводилось опрыскиванием раствором 0,5 г N,N-диметил-*p*-фенилендиамингидрохлорида в растворе этилата натрия (1 г Na в 100 мл этанола) с последующим опрыскиванием пластинки водой и нагреванием в течение 1 минуты кварцевой лампой. Чувствительность метода <5 мг.

При помощи тонкослойной хроматографии разделены также некоторые тиофосфорные эфиры¹⁶ на слое силикагель — гипс в системе хлористый метилен — метанол — 10%-ный аммиак (8 : 2 : 3). При применении для обнаружения иод-азидного реагента нижняя граница определения от 1 до 5 мг.

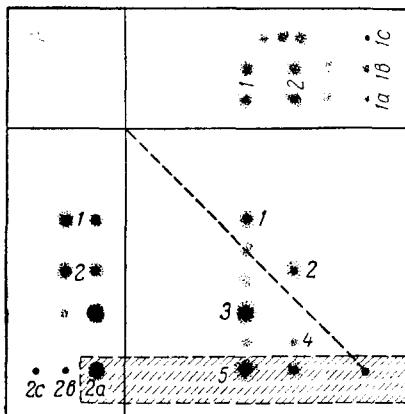


Рис. 12. Хроматограмма концентратата пиретрума на слое силикагель — гипс. 1а, 1в, 2а, 2в — концентрат пиретрума; 1с, 2с — смесь красителей; 1 — пиретрин I; 2 — пиретрин II; 3 — перекись пиретрина I; 4 — перекись пиретрина II; 5 — люмибирин. После разделения в первом направлении заштрихованная часть пластиинки облучалась УФ-светом

12. Аминокислоты, амины, пептиды, нуклеотиды

Первое разделение аминокислот¹³⁵ в виде их натриевых солей было проведено в 1958 г. на тонком не закрепленном на стекле слое окиси алюминия. Для этого были использованы четыре системы, лучшей системой оказалась *n*-бутанол — этанол — вода (60 : 40 : 40).

Годом позже получены были хорошие результаты разделения²⁹ натриевых солей ряда аминокислот также и на слое силикагель — гипс двумерным способом, в одном направлении в системе пропанол — вода (1 : 1) и в другом направлении в системе фенол — вода (10 : 4). Аминокислоты обнаруживались раствором нингидрина.

Почти одновременно аминокислоты были разделены²⁸ на слое силикагель — гипс с фосфатным буфером: при приготовлении слоя вместо воды был добавлен раствор 0,2 M KН₂РО₄ и 0,2 M Na₂НРО₄ (1 : 1).

Разделение проводилось в 96%-ном этаноле и системах: 96%-ный этанол — 25%-ный аммиак (4 : 1) и 96%-ный этанол — 25%-ный аммиак — вода (7 : 1 : 2). При двумерном делении применялись две первые системы. Обнаружение осуществлялось при помощи реагентов, обычно применяемых для этой цели в бумажной хроматографии.

Наконец недавно¹³⁶ на слое силикагель — гипс были получены превосходные результаты, которые стали возможными благодаря тщательному и всестороннему изучению техники разделения аминокислот при помощи тонкослойной хроматографии. Оказалось, что на слое силикагель — гипс пятна получаются небольшой величины и хорошей формы благодаря меньшей диффузии, чем на бумаге. Было найдено, что для получения хороших результатов при приготовлений слоя не следует активировать пластинку нагреванием, достаточно просушить ее на воздухе и не допускать подъема жидкости выше 10 см от линии старта. Наносить кислоты на пластинку следует в количествах, не превышающих 1—5 мг, так как величина пятна зависит от количества взятого вещества. При соблюдении этих условий получаются воспроизводимые результаты и величина R_f колеблется в пределах $\pm 0,05$. Было проверено пять систем. Лучшие результаты были получены при разделении в системах: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (60:20:20) и фенол — вода (75:25) и особенно хорошие результаты при двумерном делении в этих системах. Продолжительность разделения 1,5—2 часа.

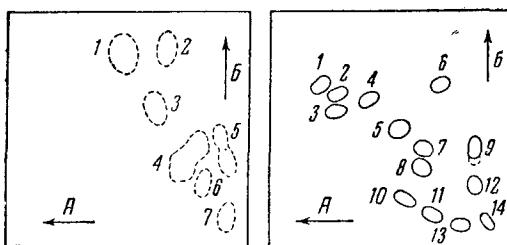


Рис. 13. Сравнение хроматограммы аминокислот на бумаге с хроматограммой на слое силикагель — гипс, полученных в одинаковых условиях.

Системы: А — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (6:2:2); Б — фенол — вода (75:25). Бумажная хроматограмма (налево): 1 — фенилаланин + изолейцин, 2 — пролин, 3 — тирозин, 4 — глицин + глутаминовая кислота, 5 — аргинин + лизин, 6 — аспарагиновая кислота, 7 — цистein.

Тонкослойная хроматограмма (направо): 1 — фенилаланин, 2 — изолейцин, 3 — тирозин, 4 — валин, 5 — аланин, 6 — пролин, 7 — глицин, 8 — серин, 9 — гистидин, 10 — глутаминовая кислота, 11 — аспарагин, 12 — аргинин, 13 — цистein, 14 — цистин

в абсолютном спирте. Чувствительность метода превосходит в 10 раз чувствительность бумажной хроматографии.

На рис. 13 сравниваются результаты двумерного разделения аминокислот методами бумажной и тонкослойной хроматографии на слое силикагель — гипс в одиних и тех же системах. Слева — 10 аминокислот на бумаге. Справа — 14 аминокислот на слое силикагель — гипс.

Недавно было описано¹³⁷ разделение тех же аминокислот с еще лучшими результатами на слое силикагель — гипс двумерным способом с применением в первом направлении системы хлороформ — метанол — 17% -ный аммиак (2:2:2), а во втором направлении, — примененной ранее системы фенол — вода (75:25).

Как при делении и идентификации аминокислот, так и N-(2,4-динитрофенил)-аминокислот и их 3-фенил-2-тиогидантонов^{51,30} тонкослойная хроматография доказала свое превосходство перед бумажной хроматографией. Оно состоит в экономии времени (продолжительность определения от 1 до 3 часов) и повышении чувствительности по меньшей мере в 10 раз.

На слое силикагель — гипс могут быть разделены динитрофениль-

Для обнаружения сухую пластинку (10 мин. 100°) опрыскивают свежеприготовленной смесью (50:3) двух растворов: 1) раствор 0,2% никидрина в 50 мл абс. спирта, 10 мл, уксусной кислоты и 2 мл 2,4,6-коллидина и 2) 1%-ный раствор $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ в аб-

ные производные (ДНФ) почти всех аминокислот белка как растворимые в воде и кислотах, так и не растворимые.

Идентификация растворимых в воде и кислотах дичитрофенил аминокислот была проведена⁵¹ в системе *n*-пропанол — 34% -ный аммиак (7 : 3). Для идентификации не растворимых в воде производных применялось 5 систем: I) толуол — пиридин — этиленхлоргидрин — 0,8 N аммиак (100 : 30 : 60 : 60); II) хлороформ — бензиловый спирт — уксусная кислота (70 : 30 : 3); III) хлороформ — трет.-амиловый спирт — уксусная кислота (70 : 30 : 3); IV) бензол — пиридин — уксусная кислота (80 : 20 : 2); V) хлороформ — метанол — уксусная кислота (95 : 5 : 1).

Лучшие результаты получены при двумерном разделении в тех же системах. Кроме того, в работе описаны результаты проточного способа разделения³⁰, который применен для полного разделения некоторых пар соединений, требующего удлинения пути продвижения разделяющей системы. В этом случае получены хорошие результаты разделения³⁰: 1) лейцина и изолейцина; 2) N-(2,4-динитрофенил)-лейцина N-(2,4-динитрофенил)-изолейцина + N-(2,4-динитрофенил)-норлейцина; 3) N-(2,4-динитрофенил)-валина + N-(2,4-динитрофенил)-норвалина; 4) N,N-ди-(2,4-динитрофенил)-тирофина + N,N-(2,4-динитрофенил)-лизина.

При одномерной хроматографии⁵¹ обычно еще хорошо обнаруживаются 0,1 μ г, при двумерном 0,5 μ г вещества и при дневном свете. Особой чувствительностью обладает обнаружение при помощи фотокопии в УФ-свете. При этом достаточно 0,1—0,2 μ г аминокислоты в смеси аминокислот. Чувствительность для одной кислоты 2×10^{-3} или 10^{-4} мкмоля (например, 0,02 μ г для ДНФ-серина). При нанесении ~100 μ г одной ДНФ-аминокислоты удавалось обнаружить примесь другой ДНФ-аминокислоты в количестве ~0,05%.

Смеси 3-фенил-2-тиогидантонов (ФТГ) аминокислот могут быть легко разделены⁵¹ на слое силикагель — гипс как двумерной, так и одномерной хроматографией. Из 19 исследованных в работе ФТГ-аминокислот разделились 14. Остальные легко делятся с применением простой окислительной техники при помощи перекиси водорода или кислого гидролиза и последующего деления свободных аминокислот на тонком слое силикагеля.

Для обнаружения ФТГ-аминокислот применяли модифицированную хлортолидиновую пробу¹³³. Чувствительность проявления $3 \cdot 10^{-4}$ мкмоля, что составляет, например, 0,05 μ г для ФТГ-пролина.

Разделение аминов, аминокислот и адреналин — норадреналинов подробно изучено⁴⁵ как на нейтральном, так и буферном слое силикагель — гипс и на порошке целлюлозы в системе *n*-амиловый спирт — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). В этой работе описано разделение на силикагель — гипсе как на нейтральном слое, так и на буферном, фосфатном или ацетатном слоях следующих аминов: метиламин, этиламин, *n*-пропиламин, изоамиламин, кадеверин, путресцин, этаноламин, гистамин, тирозин, фенилэтиламин, бензиламин, триптамин. Для нейтральных слоев применялась система: 96% -ный этанол — 25% -ный аммиак (4 : 1), фенол — вода (8 : 3) или бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5).

На пластинках с фосфатным буфером Зеренсена (рН 6,8) хроматографирование проводилось в 10% -ном водном этаноле. На пластинках с ацетатным буфером деление проводили в системе бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). На нейтральных пластинах удалось лучше идентифицировать первичные и вторичные амины в виде 3,5-динитробензамидов в системе хлороформ — этанол (99 : 1).

Обнаружение проводилось раствором иода в хлороформе или раствором α -нафтиламина или обнаружением светом кварцевой лампы.

Интересным примером применения этого метода может служить разделение смеси адреналина и норадреналина. Во время хроматографии возможно окислительное разложение этих аминов, поэтому для его устранения при получении пластинок с фосфатным буфером было добавлено небольшое количество бисульфита натрия как антиоксиданта. При этом хроматографирование проводилось в 70%-ном этаноле. Пятна проявлялись опрыскиванием пластинки раствором иода в хлороформе и раствором феррицианида калия в фосфатном буфере и затем УФ-светом. Те же амины были также разделены на пластинке с тонким слоем целлюлозного порошка в системе n -амиловый спирт — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5).

Недавно описан¹³⁹ метод тонкослойного ионофореза и двумерный комбинированный метод тонкослойного ионофореза и хроматографии на стеклянной пластинке. При этом применялись слои: силикагель — гипс, кизельгур — гипс и окись алюминия — гипс для ионофорезного разделения аминов и аминокислот и силикагель — гипс для комбинированного ионофорезного и хроматографического разделения.

Для определения¹⁴⁰ аминокислот в полипептидах при помощи бумажной хроматографии необходимы количества вещества порядка 1 мкмоль (иногда 0,1—0,2 моля). Применение для этой цели тонкослойной хроматографии на слое силикагель — гипс позволяет работать с количествами ~0,01 мкмоля. Идентификация тиогиданттоина дипептида глицил-*L*-пролина (R_f 0,36) и тиогиданттоина припептида *L*-пролил-*L*-лейцилглицина (R_f 0,42) проводилась¹⁴⁰ в системе гептан — пиридин — этилацетат (5 : 3 : 2). Для получения хороших результатов необходимо соблюдать особые предосторожности для того, чтобы слой не насыщался влагой воздуха, что сильно отражается на значении R_f . Для обнаружения был применен крахмал — иод — азидный реагент: в начале пластинка опрыскивалась 0,5%-ным водным раствором крахмала, затем раствором иода и в конце раствором азода натрия. Нижняя граница определения 0,01 мкг тиогиданттоина пептида.

На слое силикагель — гипс удалось качественно и количественно разделить желчные кислоты природного происхождения¹⁴¹: лихохолевую, холевую, дезоксихолевую, хенодезоксихолевую и их пептидные производные, полученные синтетически, а именно: производные глицина — гликоконъюгаты и производные таурины — тауроконъюгаты. Разделение производилось в две ступени: свободные кислоты двигались с верхней фазой смеси толуол — уксусная кислота — вода (5 : 5 : 1), а конъюгаты оставались близ стартовой линии. Затем глико- и тауроконъюгаты делились в системе бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 1). При этом свободные кислоты передвигались к линии фронта. Обнаружение производилось раствором фосфорномolibденовой кислоты с последующим нагреванием в течение 5 мин. при 110°. Для спектрофотометрических определений применяли 65%-ную серную кислоту, которая одновременно служила для элюирования веществ с силикагеля. Количество вещества в смесях определяли путем сравнения коэффициентов экстинкции.

Производные нуклеиновых кислот разделялись на тонком слое целлюлозы¹⁴². Нуклеиновые основания и нуклеозиды были разделены дистиллированной водой. Нуклеотиды разделены в системе *n*-бутанол — ацетон — уксусная кислота — 5%-ный аммиак — вода (4,5 : 1,5 : 1 : 1 : 2). Обнаружение проводилось в УФ-свете. Чувствительность метода для

адениновых соединений $\sim 10^{-3}$ ммоля, для цитозиновых — несколько выше.

Хроматография на слое силикагель — гипс была также применена для характеристики некоторых промежуточных продуктов при синтезе (*N*-метил-тиразин)₂-окситоцина¹⁴³. На том же слое осуществлялся контроль синтеза моделей аминоацилрибонуклеиновых кислот¹⁴⁴.

13. Алкалоиды

Применение тонкослойной хроматографии для быстрого анализа малых количеств алкалоидов особенно важно при исследовании лекарственных продуктов и в токсикологии.

Так, в 1960 г. на слое силикагель — гипс с фосфатным буфером Зеренсена⁴⁵ в системе хлороформ — этанол (8 : 1) были разделены алкалоиды, содержащие пуриновые группы: кофеин, теобромин и теофиллин. Хроматограмма опрыскивалась спиртовым раствором иода и иодистого калия (1 г J₂ и 1 г KJ в 100 мл этанола) и затем раствором 25%-ной соляной кислоты в 96%-ном этаноле (1 : 1). В той же работе описано разделение эргоалкалоидов на целлюлозном порошке, импрегнированном 20%-ным раствором формамида в ацетоне. Полученные результаты оказались лучшими, чем при анализе на бумаге. В этом случае был применен двуступенчатый способ разделения в системах: 1) бензол — гептан — хлороформ (6 : 5 : 3), 2) бензол — гептан (6 : 5).

Теми же авторами было разделено еще несколько групп алкалоидов⁴³: алкалоиды белладонны, алкалоиды *Rauwolfia*, алкалоиды опия и некоторые другие группы алкалоидов.

Алкалоиды белладонны разделялись на нейтральном или щелочном слое силикагель — гипс. На нейтральном слое — в системе диметилформамид — диэтиламин — этанол — этилацетат (1 : 1 : 6 : 12). На щелочном слое (2KOH) хроматографирование вели в системе 70%-ный этанол — 25%-ный аммиак (99 : 1).

Те же алкалоиды были разделены также на слое целлюлозы, пропитанном формамидом, двуступенчатым способом в системах: гептан — диэтиламин (500 : 1), пробег 15 см и бензол — гептан — хлороформ — диэтиламин (6 : 5 : 1 : 0,02), пробег 10 см.

Алкалоиды *Rauwolfia* были разделены на слое силикагель — гипс в системах: хлороформ — 96%-ный спирт (9 : 1) или метанол — метилэтилкетон — гептан (8,4 : 33,6 : 58,0). Те же алкалоиды делились на порошке целлюлозы, пропитанном 20%-ным раствором формамида в ацетоне, в системе гептан — метилэтилкетон (1 : 1) в атмосфере аммиака. Обнаружение пятен проводилось УФ-светом или трихлоруксусной кислотой и хлорным железом.

Разделение алкалоидов опия проводилось на нейтральном и щелочном слоях силикагель — гипс. На нейтральном слое применялась система хлороформ — этанол (9 : 1), на щелочном слое — система хлороформ — этанол (8 : 2). Осужденжен также анализ этих алкалоидов на слое целлюлозы, пропитанном формамидом, в системе бензол — гептан — хлороформ — диэтиламин (6 : 5 : 1 : 0,02) (обнаружение реагентом Драгендорфа).

Прочие алкалоиды: а) алкалоиды *Lobilia* хроматографировались на целлюлозе, пропитанной формамидом, в системе бензол — гептан — диэтиламин (1 : 6 : 0,02); б) *Helidonia* алкалоиды делились на слое силикагель — гипс в системе хлороформ — этанол (3 : 1). Перегоняющиеся с паром алкалоиды конин, анабазин, никотин и ареколин разделены на щелочном слое (2KOH) силикагель — гипс в системе хлороформ — этанол (8 : 2).

Таким образом, тонкослойная хроматография — наиболее быстрый метод анализа алкалоидов. Этот метод успешно применен⁴⁴ для систематического анализа алкалоидов. В результате обследования более 50 алкалоидов в 7 различных системах и растворителях было установлено по их поведению в этих системах, что их можно разделить на две группы. После установления к какой группе принадлежат исследуемые алкалоиды они анализируются в других, указанных в работе, системах и могут быть идентифицированы по таблице значений R_f и цветных реакций, приведенных в этой статье⁴⁴. Хроматографирование проводили на слоях силикагель — гипс, окись алюминия — гипс и на щелочном слое силикагель — гипс в 7 системах.

Обнаружение алкалоидов осуществлялось при интенсивном опрыскивании пластинок иодоплатинатным реагентом, приготовленным из равных объемов 0,3%-ного водного раствора платинохлористоводородной кислоты и 6%-ного водного раствора иодистого калия.

Методом тонкослойной хроматографии были успешно разделены на слое силикагель — гипс в системе метanol — метилэтилкетон — гептан (84 : 33,6 : 58), индолные алкалоиды¹⁴⁵ резерпин и ресциннамин. Количественное определение этих алкалоидов осуществлено спектрофотометрическим методом.

Описано также разделение алкалоидов опиума¹⁴⁶ на тонком щелочном слое окиси алюминия (рН 5) в системе этанол — *n*-бутанол — вода в различных соотношениях. Разделение тех же алкалоидов проведено также на слое силикагель — гипс в метаноле³⁹. Кроме того, при помощи этого метода¹⁴⁷ были обнаружены в алкалоидной фракции семян *Rivea corymbosa* алкалоиды: эргин и изоэргин.

14. Птеридины

Как известно, птеридины — представители группы фолиевой кислоты, имеют большое физиологическое значение и служат важными факторами обмена веществ в организме. В работах по синтезу этих соединений часто величина R_f приводится как важная физическая константа. Многие птеридины с трудом делятся на бумаге. При применении для этой цели тонкослойной хроматографии были получены результаты¹⁴⁸, которые не удавалось получить ранее на бумаге. Хроматографирование проводили на слое силикагель — гипс или окись алюминия — гипс. Были исследованы нейтральные, щелочные и кислые системы и растворители (всего 24). В работе¹⁴⁸ приведены значения R_f для 14 птеридинов.

Разделение производили в системах: диметилформамид — вода (190 : 10) 1%-ная, 5%-ная и 10%-ная лимонная кислота; 5%-ная яблочная кислота и 5%-ная винная кислота. Для леукоптерина, 6-метил-изоксантоптерина, 7-метилксантоптерина, изоксантоптерина, ксантоптеринкарбоновой кислоты и ряда аминоксиптеридинов разделение проводилось в аммиаке различных концентраций (от 1% до 25%) и некоторых других системах. Обнаружение осуществлялось УФ-светом. Нижняя граница чувствительности этого метода 1 $\mu\text{г}$.

15. Гетероциклические соединения

Недавно описано¹⁵ разделение небольших количеств смесей индольных производных на слое силикагель — гипс в пересыщенной камере при 20° в темной комнате. Для обнаружения хроматограмм применялись два реагента: 1) реагент Ван Урка, раствор *p*-диметиламинобенз-

альдегида в смеси 50 мл 25%-ной соляной кислоты и 50 мл 96%-ного этанола и 2) реагент Прохазки (раствор 10 мл 35%-ного формальдегида, 10 мл 25%-ной соляной кислоты и 20 мл 96%-ного этанола) с последующим нагреванием при 100° и обнаружением в УФ-свете.

Реагент Прохазки очень чувствителен и позволяет в некоторых случаях обнаруживать присутствие 0,005 мг вещества.

На незакрепленном слое окиси алюминия II/III активности в системе бензол — ацетон (1 : 1) были разделены²¹ следующие гетероциклические соединения: изомерные N-бензоил или N-ацетилдекагидроинололы (4 изомера); различные 4-фенилпиперидолы-4, N,O-диацетилдекагидроинололы-4, а также цианоэтилциклогександионы-1,3. Изомерные O-ацетилдекагидроинололы-4 были разделены на том же слое в системе ацетон — метанол (3 : 1). (Обнаружение парами иода и УФ-светом.)

16. Некоторые другие случаи применения тонкослойной хроматографии

Описан еще ряд случаев применения тонкослойной хроматографии для разделения и идентификации различных соединений и их смесей. Границы применения этого метода непрерывно расширяются. Имеются примеры анализа некоторых углеводородов, спиртов, кислот, органических перекисей, нитросоединений, красителей, а также неорганических соединений и др.

На тонком слое силикагель — гипс в петролейном эфире разделены азулен и кадален^{5,7} в системе гексан — этилацетат (9 : 1), хамазулен, хамазуленовый спирт и кислоты азуленового сесквитерпена и прозаулена.

Производные антрацена¹³ могут быть легко разделены в системе бензол — метилацетат — 80%-ная муравьиная кислота (4 : 4 : 2) или лучше¹⁴, в системе бензол — этилформиат — муравьиная кислота (75 : 24 : 1) и обнаружены 2,5%-ным раствором KOH в метаноле и в УФ-свете с длинной волной.

На незакрепленном слое окиси алюминия разделен ряд ацетиленовых карбинолов и отвечающих им гликолов в системе бензол — эфир (2 : 3). Пятна обнаруживались парами иода и УФ-светом¹⁴⁹.

На слое силикагель — гипс в системах: бензол — метанол — уксусная кислота (45 : 8 : 4) и бензол — диоксан — уксусная кислота (90 : 25 : 4)¹⁵⁰ идентифицированы двухосновные кислоты: щавелевая, малоновая, янтарная, глутаровая, адипиновая, пимелиновая, корковая, азелаиновая и себациновая. Для обнаружения пластинку предварительно сушили 1 час при 120° и опрыскивали подкисленным лимонной кислотой раствором бромфенола. На том же слое в первой системе разделены фумаровая (R_f 0,23) и малеиновая (R_f 0,07) кислоты и проявлены подщелоченным содой раствором перманганата.

Те же кислоты, начиная от щавелевой и кончая себациновой, разделены¹⁵¹ на слое силикагель — гипс в системе 96%-ный спирт — вода — 25%-ный аммиак (100 : 12 : 16). В той же работе описано разделение различных алифатических и ароматических кислот: лимонной, винной, фталевой, терефтальевой, бензойной, *p*-толуиловой совместно с фосфорной кислотой. Для обнаружения применялся бромкрезоловый зеленый.

Органические перекиси и перекиси кислот были разделены¹⁵² на пластинках силикагель — крахмал в системе четыреххлористый угле-

род — ацетон (2 : 1). Обнаружение — раствором иодистого калия или смесью $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ и KSCN .

На слое силикагель — крахмал ¹⁵³ разделен и идентифицирован ряд β -дикарбонильных соединений в системе бензол — этилацетат (7 : 3). (Обнаружение пятен — парами иода).

Некоторые растительные природные красители^{17, 18} разделены на незакрепленном слое окиси алюминия. В этих работах применялись системы *n*-бутанол — этанол — вода в различных соотношениях. На слое силикагель — гипс разделялись краски⁷ ряда судановой зеленой.

На слое силикагель — гипс в системах: гексан — этилацетат (85 : 15), (1 : 1), бензол — эфир (17 : 3), бензол — пиридин (1 : 1) и бензоле разделены различные ароматические нитросоединения и амины, азо-, азокси- и гидразосоединения¹⁵⁴. Для обнаружения пятен пластиинки опрыскивались смесью 5%-ного раствора KOH в ацетоне (2 : 1) или 10%-ным раствором SnCl_2 в концентрированной соляной кислоте. Пятна нитросоединений обычно проявляются после опрыскивания и нагревания или же после нагревания и последующего опрыскивания пластиинки концентрированными H_2SO_4 и HNO_3 (1 : 1). В последнем случае обнаружаются также и нитроамины.

Тонкослойная хроматография на слое силикагель — крахмал применена¹⁵⁵ для определения мепробамата крови (дикарбомата 2-метил-2-*n*-пропил-1,3-пропандиола) в системе абс. этанол — циклогексан (15 : 85). (Обнаружение концентрированной серной кислотой).

Тонкослойная хроматография применялась также для исследования лекарственных препаратов^{29, 156–162} и клинического анализа¹⁶³.

Описано разделение и идентификация на тонком слое силикагель — гипс неорганических соединений — ртути висмута, кадмия, свинца, меди, железа, цинка, кобальта, марганца, хрома, никеля и алюминия¹⁶⁴. Этот метод применяли для разделения и идентификации U^{VI} и Ga^{III} в смесях катионов¹⁶⁵. Кроме того, описано хроматографическое разделение и идентификация катионов щелочной группы Li^+ , Mg^{+2} , Na^+ , K^{+166} и галоидных анионов F^- , Cl^- , Br^- и J^{-167} .

Недавно описан¹⁶⁸ анализ кислот фосфора: орто- и пирофосфорных, фосфористой и фосфорноватистой.

В этом обзоре показано развитие метода тонкослойной хроматографии как на закрепленном слое адсорбента, так и на незакрепленном, начиная с 1938 г. по настоящее время.

Хроматографирование на тонком слое адсорбента — простой, и быстрый метод, конкурирующий с методом бумажной хроматографии и в ряде случаев превосходящий его по своей чувствительности в 10—20 раз.

Этот метод быстро распространяется и находит широкое применение почти во всех областях органической химии. Он может служить не только для разделения смесей веществ и идентификации отдельных соединений, но и для проверки их чистоты.

Применение тонкослойной хроматографии очень удобно для анализа фракций, полученных при хроматографировании на колонке и для контроля течения химических реакций в органическом синтезе. В сочетании с газо-жидкостной хроматографией этот метод позволяет иногда решать задачи, недоступные другим методам разделения веществ.

Тонкослойная хроматография на незакрепленном слое адсорбента несомненно найдет широкое применение для preparативных целей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цвет. Ber. deitsch. botan. Ges., **24**, 316, 384 (1909).
2. Н. А. Иэмайлова, М. С. Шрайбер, Фармация, **1938**, № 3, 1.
3. J. E. Meinhard, N. F. Hall, Anal. Chem., **21**, 185 (1949).
4. J. G. Kirchner, J. Miller, G. J. Keller, Anal. Chem., **23**, 420 (1951).
5. E. Stahl, Pharmazie, **11**, 632 (1956).
6. E. Stahl, Chemiker Ztg., **82**, 323 (1958).
7. E. Stahl, Parfümerie u. Kosmetik, **39**, 564 (1958).
8. E. Stahl, Arch. Pharmaz., **292/64**, 411 (1959).
9. E. Stahl, Pharmaz. Rdsch., **1**, 1 (1959).
10. E. Stahl, Arch. Pharmaz., **293/65**, 531, (1960).
11. E. Stahl, U. Kaltenbach, J. Chromatog. **5**, 351 (1961).
12. E. Stahl, U. Kaltenbach, Там же, **5**, 458 (1961).
13. E. Stahl, Ztschr. anal. Chem., **181**, 303 (1961).
14. E. Stahl, P. J. Schorn, Ztschr. physiol. Chem., **325**, 263 (1961).
15. E. Stahl, H. Kaldevey, Там же, **323**, 182 (1961).
16. E. Stahl, Ang. Chem., **73**, 646 (1961).
17. M. Mottier, M. Potterat, Anal. Chim. Acta, **13**, 46 (1955).
18. M. Mottier, Mitt. Lebensmitt. u. Hyg., **47**, 372 (1956).
19. V. Černý, J. Joska, L. Lábler, Collect. czech. chem. Commun., **26**, 1658 (1961).
20. S. Hěrmánek, V. Schwartz, Z. Čekan, Там же, **26**, 1669 (1961).
21. E. A. Mistryukow, Там же, **26**, 2071 (1961).
22. Z. Procházka, Chemické listy, **55**, 975 (1961).
23. E. Demole, I. Chromatog., **1**, 24 (1958).
24. E. Demole, Там же, **6**, 2 (1961).
25. Z. Michalec, Chemické listy **55**, 953 (1961).
26. H. Weicker, Klin. Wschr., **37**, 763 (1959).
27. K. Huhnstock, H. Weicker, Там же, **38**, 1249 (1960).
28. E. Mutschler, H. Rochelmeier, Arch. Pharmaz., **292/64**, 449 (1959).
29. E. Nürnberg, Там же, **292/64**, 610 (1959).
30. M. Brenner, A. Niederwieser, Experientia, **17**, 237 (1961).
31. W. L. Stanley, S. H. Vannier, J. Assoc. Office, Agr. Chemists, **40**, 582 (1957).
32. S. H. Vannier, W. L. Stanley, Там же, **41**, 432 (1958).
33. W. L. Stanley, Там же, **42**, 643 (1959).
34. L. H. Вруант, Nature, **175**, 556 (1955).
35. А. А. Ахрем, А. И. Кузнецова, ДАН, **138**, 591 (1961).
36. Н. К. Кочетков, И. Г. Жукова, И. С. Глуходед, ДАН, **139**, 608 (1961).
37. Л. Д. Бергельсон, Э. В. Дятловицкая, В. В. Воронкова, ДАН, **141**, 84 (1961).
38. M. Barbier, H. Jäger, H. Tobias, E. Wyss, Helv. Chim. Acta, **42**, 2440 (1959).
39. G. Machata, Microchem. Acta, **1960**, 79.
40. R. H. Reitsema, Anal. Chem., **26**, 960 (1954).
41. A. Seher, Die Nahrung **4**, 466 (1960).
42. G. Pastuska, Ztschr. anal. Chem., **179**, 427 (1961).
43. K. T. Teichert, E. Mutschler, H. Rochelmeier, Dtsch. Apoth. Ztg. **100**, 477 (1960).
44. D. Waldi, K. Schnackerz, F. Munter, J. Chromatog., **6**, 61 (1961).
45. K. T. Teichert, E. Mutschler, H. Rochelmeier, Dtsch. Apoth. Ztg., **100**, 283 (1960).
46. H. P. Kaufmann, Z. Makus, B. Das. Fette Seifen, **63**, 807 (1961).
47. H. P. Kaufmann, Там же, **63**, 828 (1961).
48. M. Brenner, A. Niederwieser, G. Pataki, A. R. Fahmy, Experientia **18**, 101 (1962).
49. H. Brockmann, H. Schodder, Ber., **74**, 73 (1941).
50. S. Hěrmánek, V. Schwarz, Z. Čekan, Collect. czech. chem. Commun., **26**, 3170 (1961).
51. M. Brenner, A. Niederwieser, G. Pataki, Experientia, **17**, 145 (1961).
52. M. Brenner, G. Pataki, Helv. Chim. Acta, **44**, 1420 (1961).
53. E. Hecker, Chimia, **8**, 229 (1954).
54. J. Blattná, J. Davidek, Experientia, **17**, 473 (1961).
55. H. Brockmann, Ber., **80**, 81 (1947).
56. J. G. Kirchner, J. M. Miller, R. G. Rice, J. Agr. Food Chem., **2**, 1031 (1954).
57. A. Seher, Microch. Acta, **1961**, 308.
58. J. S. Matews, A. L. Pereda, V. O. Aguillera P., J. Chromatog., **9**, 331 (1962).
59. W. L. Stanley, S. H. Vannier, B. Gentili, J. Assoc. Office Agr. Chemists., **40**, 282 (1957).

60. H. Wagner, Fette Seifen, **63**, 1119 (1961).
61. J. M. Miller, J. G. Kirchner, Anal. Chem., **24**, 1480 (1952).
62. W. Winkler, E. Lunau, Pharm. Ztg., **104**, 1407 (1959).
63. C. H. Brieskorn, E. Wenger, Arch. Pharmaz., **293/65**, 26 (1960).
64. E. Stahl, L. Trennheuser, Там же, **293/65**, 826 (1960).
65. J. G. Kirchner, J. M. Miller, Ind. Eng. Chem., **44**, 318 (1952).
66. J. M. Miller, J. G. Kirchner, Anal. Chem., **25**, 1107 (1953).
67. M. Ito, S. Wakamatsu, H. Kawahara, C. A. **48**, (1954), 3640b.
68. M. Ito, S. Wakamatsu, H. Kawahara, C. A. **48**, (1954), 13172d.
69. R. H. Reitsema, J. Am. Pharm. Assoc., **43**, 414 (1954).
70. E. Demole, C. r. **243**, 1883 (1956).
71. E. Demole, E. Lederer, Bull. Soc. Chim. France, **1958**, 1128.
72. C. H. Brieskorn, E. Wenger, Arch. Pharmaz., **293/65**, 21 (1960).
73. R. Jaspersen-Schib, Pharm. Acta Helv., **36**, 141 (1961).
74. M. Ito, J. Chem. Soc. Japan, **78**, 172 (1957).
75. H. J. Petrowitz, Angew. Chem., **72**, 921 (1960).
76. G. Gogrif. Pharmazie, **12**, 38 (1957).
77. R. Tschesche, F. Lampert, G. Snatzke, J. Chromatog., **5**, 217 (1961).
78. R. Tschesche, A. Kumar, Sen Gurti, Ber., **93**, 1903 (1960).
79. A. F. Thomas, J. M. Müller, Experientia, **16**, 62 (1960).
80. E. Stahl, H. D. Wulff, Naturwiss., **47**, 114 (1960).
81. K. Onoe, J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sec. **73**, 377 (1952).
82. J. Labat, A. L. Montes, Annales Asoc. quim. Argentina, **41**, 166 (1953).
83. F. Furukawa, C. A., **54**, 4107f (1960).
84. J. H. Dhont, C. de Rooy, Analyst, **86**, 74 (1961).
85. M. J. D. van Dam, G. J. de Kleuver, J. G. de Heus, J. Chromatog., **4**, 26 (1960).
86. M. van Dam, Bull. Soc. Chem. Belg., **70**, 122 (1961).
87. H. P. Kaufmann, Z. Makus, F. Doiné, Fette Seifen, **63**, 235 (1961).
88. H. Danielsson, Acta Chem. Scand., **15**, 245 (1961).
89. R. Neher, A. Wettstein, Helv. Chim. Acta, **43**, 1628 (1960).
90. R. Tschesche, G. Snatzke, Ann., **636**, 105 (1960).
91. H. Metz, Naturwiss., **48**, 569 (1961).
92. М. Барбье, С. И. Завьялов, Изв. АН СССР, ОХН, **1960**, 1309.
93. H. Struck, Mikroch. Acta, **1961**, 634.
94. R. Tschesche, W. Freytag, G. Snatzke, Ber., **92**, 3053 (1959).
95. K. Egger, Ztschr. anal. Chem., **182**, 161 (1861).
96. H. K. Mangold, Fette Seifen, **61**, 877 (1959).
97. H. K. Mangold, D. C. Malins, J. Am. Oil Chem. Soc., **37**, 383 (1960).
98. D. C. Malins, Там же, **37**, 576 (1960).
99. H. P. Kaufmann, Z. Makus, Fette Seifen, **62**, 1014 (1960).
100. H. P. Kaufmann, Z. Makus, T. H. Khoe, Там же, **63**, 689 (1961).
101. H. P. Kaufmann, G. Walter, Там же, **61**, 782 (1959).
102. L. J. Morris, R. T. Holman, K. Fontell, J. Am. Oil. Chemists. Soc. **37**, 323 (1960).
103. L. J. Morris, R. T. Holman, K. Fontell, J. Lipid Research, **2**, 68 (1961).
104. H. K. Mangold, R. Kammerreck, Chem. and Ind., **1961**, 1032.
105. E. H. Gruger, J. K. D. C. Malins, E. J. Ganglitz, J. Am. Oil Chem. Soc. **37**, 214 (1960).
106. E. J. Gauglitz, D. C. Malins, Там же, **37**, 425 (1960).
107. D. C. Malins, Chem. and Ind., 1359 (1960).
108. J. A. Williams, A. Sharma, L. J. Morris, R. T. Holman, Proced. Soc. Exp. Biol. Med., **105**, 192 (1960).
109. H. Jatzkewitz, E. Mehl, Ztschr. physiol. Chem., **320**, 251 (1960).
110. H. Jatzkewitz, Там же, **320**, 134, (1960).
111. H. Wagner, Fette Seifen, **62**, 1115 (1960).
112. E. Klenk, W. Geilin, Hoppe Seyler's. Ztschr. Phys. Chem., **323**, 126 (1961).
113. G. Wagner, Pharmazie, **10**, 302 (1955).
114. R. L. Lyman, A. L. Livingston, E. M. Bickoff, A. N. Booth, J. Org. Chem., **23**, 756 (1958).
115. G. Pastuska, Ztschr. anal. Chem., **179**, 355 (1961).
116. M. Barbier, J. Chromatogr., **2**, 649 (1959).
117. R. Bravo, F. Hernandez, Там же, **7**, 60 (1962).
118. W. L. Stanley, S. H. Vannier, J. Am. Chem. Soc., **79**, 3488 (1957).
119. R. A. Bernhard, Nature, **182**, 1171 (1958).
120. T. Akarawa, I. Uritani, Arch. Biochem. Biophys., **88**, 150 (1960).
121. L. Hörrhammer, H. Wagner, B. Lay, Pharmazie, **15**, 645 (1960).
122. J. Davidek, Z. Procházka, Collect. czech. chem. Commun., **26**, 2947 (1961).
123. A. Winterstein, Angew. Chem., **72**, 902 (1960).

124. A. Winterstein, B. Hegedüs, *Chimia*, **14**, 18 (1960).
 125. A. Winterstein, B. Hegedüs, *Ztschr. physiol. Chem.*, **321**, 97 (1960).
 126. A. Winterstein, A. Studer, R. Rüegg, *Ber.*, **93**, 2951 (1960).
 127. O. Isler, R. Rüegg, P. Schudel, *Chimia*, **15**, 208 (1961).
 128. K. Fontell, R. T. Holmann, G. Lambertsen, *J. Lipid Res.*, **1**, 391 (1960).
 129. H. Gänshirt, M. Malzacher, *Naturwiss.*, **47**, 279 (1960).
 130. A. Scher, *Fette Seifen*, **61**, 345 (1959).
 131. O. E. Schultz, D. Strauss, *Arzneimitt. Forsh.*, **5**, 342 (1958).
 132. J. W. C. Peereboom, *J. Chromatog.*, **4**, 323 (1960).
 133. R. G. W. Spickett, *Chem. and Ind.*, **1957**, 561.
 134. J. Bäumler, S. Rippstein, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1163 (1961).
 135. M. Mottier, *Mitt. Gebbiefe Lebensmitt u. Hyg.*, **49**, 454 (1958).
 136. M. Brenner, A. Niederwieser, *Experientia*, **16**, 378 (1960).
 137. A. H. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki, M. Brenner, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 2022 (1961).
 138. M. Brenner и другие, *Helv. Chim. Acta*, **40**, 1497 (1957).
 139. C. G. Honegger, Там же, **44**, 173 (1961).
 140. E. Charbulier, B. Baether, J. Rabinoowitz, Там же, **43**, 1871 (1960).
 141. H. Gänshirt, F. W. Koss, K. Morianz, *Arzneimittel Forsh.*, **10**, 943 (1960).
 142. K. Randerath, H. Stuck, *J. Chromatog.*, **6**, 365 (1961).
 143. R. L. Huguenin, R. A. Boissanas, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 213 (1961).
 144. H. G. Zachaus, W. Karaus, *Ber.*, **93**, 1630 (1960).
 145. F. Schlemmer, E. Link, *Pharm. Ztg.*, **104**, 1349 (1959).
 146. A. Mariani, O. Mariani-Marelli, P. Ж. Биол. (1960), N 16, 22200; *Rend. Inst. super. sanità*, **22**, 759 (1959).
 147. A. Hofman, H. Tseherter, *Experientia*, **16**, 414 (1960).
 148. B. J. R. Nicolaus, *J. Chromatog.*, **4**, 384 (1960).
 149. А. А. Ахрем, А. И. Кузнецова, Ю. А. Титов, И. С. Левина, Изв. АН СССР, ОХН, **1962**, 657.
 150. H. J. Petrowitz, G. Pastuská, *J. Chromatog.*, **7**, 128 (1962).
 151. D. Braun, H. Greenep, Там же, **7**, 56 (1962).
 152. K. Marugama, *J. Chem. Soc. Japan Pure Chem. Sect.*, **77**, 1496 (1956).
 153. М. Барбье, Л. П. Виноградова, С. И. Завьялов, Изв. АН СССР, ОХН, **1961**, 162.
 154. F. Furukawa, C. A., **52**, 13364 (1958).
 155. A. Fiori, M. Marigo, *Nature*, **182**, 943 (1958).
 156. S. Grüner, W. Spaich, *Arch. Pharmaz.*, **287**, 243 (1954).
 157. H. Lieblich, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **99**, 1246 (1959).
 158. H. Gänshirt, A. Malzacher, *Arch. Pharmaz.*, **293/65**, 925 (1960).
 159. H. Gänshirt, K. Mariantz, Там же, **293/65**, 1065 (1960).
 160. H. Lieblich, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **100**, 393 (1960).
 161. R. Fischer, H. Lauther, *Arch. Pharm.*, **294/66**, 1 (1961).
 162. M. Frahm, A. Gottesleben, K. Soehring, *Arzneimit. Forsch.*, **11**, 1008 (1961).
 163. G. Machata, *Wiener Klin. Wschr.*, **71**, 301 (1959).
 164. H. Seiler, M. Seiler, *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1939 (1960).
 165. H. Seiler, M. Seiler, Там же, **44**, 939 (1961).
 166. H. Seiler, W. Rothweiler, Там же, **44**, 941 (1961).
 167. H. Seiler, T. Kaffenberger, Там же, **44**, 1282 (1961).
 168. H. Seiler, Там же, **44**, 1753 (1961).

Институт органической химии
АН СССР
им. Н. Д. Зелинского