

УДК 547.915.6 : 543.54

РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ЛИПИДОВ

А. Г. Верещагин

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1448
II. Хроматография с полярной неподвижной фазой	1449
1. Хроматография на колонках	1449
2. Хроматография на бумаге	1450
III. Обращенно-фазовая хроматография	1452
1. Общие закономерности обращенно-фазовой хроматографии	1452
2. Хроматография на колонках	1454
3. Хроматография на стеклянных пластинках	1456
4. Хроматография на бумаге	1457

I. ВВЕДЕНИЕ

Липиды природного происхождения обычно представляют собой смесь алифатических соединений различных классов, характеризуемых определенным числом полярных функциональных групп: —COOH, —OH, —NH₂ и др. Структурные различия между липидами внутри класса определяются только двумя показателями — числом метиленовых групп, а также числом и расположением двойных связей. Совокупность липидов, у которых один из показателей постоянен, а другой монотонно изменяется, образует гомологический ряд. Каждый класс может содержать несколько таких рядов. Их подробный анализ имеет большое теоретическое и практическое значение.

Смесь липидов разделяют на отдельные классы, используя адсорбционную хроматографию; разделения классов на гомологические ряды и разделения внутри рядов здесь, как правило, не происходит, поскольку различия между липидами в величине полярности, имеющиеся внутри класса, незначительны по сравнению с теми сдвигами полярности, которые вызываются функциональными группами. Однако даже такие относительно слабые различия оказываются вполне достаточными для разделения липидов внутри классов и гомологических рядов методом распределительной хроматографии*.

Открытая в 1941 г. Мартином и Синджем¹, распределительная хроматография нашла применение в области липидов только в 1948 г. в работах Рамсая и Паттерсона² и исследованиях Болдинга³. За прошедшие 17 лет распределительной хроматографии липидов было посвящено несколько сот научных публикаций и многочисленные работы обзорного характера⁴⁻¹⁹.

Тема настоящего обзора — применение различных видов распределительной хроматографии к анализу природных липидов. Теоретические

* Этот укоренившийся сейчас термин нельзя признать удачным, так как масса распределяется между твердой, жидкой или газовой фазами при любом хроматографическом разделении. Здесь и ниже мы имеем в виду систему двух жидких фаз — подвижной и неподвижной, которые не смешиваются между собой.

основы метода и особенности его аппаратуры подробно не рассматриваются; эти сведения можно найти в справочных руководствах^{9, 17}. Почти не затронуты исследования по хроматографии соединений жирного ряда с короткой цепью (до C₈), стероидов и других производных изопрена, а также весьма многочисленные работы, в которых готовые хроматографические методы применялись без каких-либо принципиальных изменений. Данный обзор охватывает наиболее существенные работы по распределительной хроматографии липидов, опубликованные до 1 марта 1964 г.

II. ХРОМАТОГРАФИЯ С ПОЛЯРНОЙ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗОЙ

Придерживаясь исторической последовательности, мы рассмотрим сначала системы, где неподвижная фаза более полярна, чем протекающий растворитель, хотя в настоящее время эти виды хроматографии применяются в области липидов значительно реже обращенно-фазовых систем (см. раздел III).

1. Хроматография на колонках

Хроматографию на колонках использовали для очистки, разделения и идентификации жирных кислот и других липидов.

Колонки с порошком целлюлозы служили для очистки фосфолипидов от пептидов и аминокислот. Липиды элюировали смесью хлороформа, бутанола и воды²⁰, хлороформа, этанола и воды (80 : 20 : 2,5)²¹ или хлороформа и метанола²². В системе хлороформ — метанол фосфолипиды выходили из колонки в следующем порядке: фосфатидные кислоты, Ф-холин (Ф=фосфатидил), сфингомиелин, Ф-этаноламин, Ф-серин, Ф-инозит²³. Фосфолипиды разделяли также ацетоном при —18°²⁴. Смесь метанола, гексана, воды и уксусной кислоты (30 : 50 : 5 : 1) применяли для фракционирования гидроксамовых производных «четных» C_{14–22}-насыщенных и C₁₈-ненасыщенных кислот. Гидроксаматы обнаруживали реакцией с Fe³⁺ и идентифицировали по точке плавления. Величина задержки возрастала с увеличением полярности; производные одинаковой полярности не разделялись. Преимуществом гидроксаматов перед исходными кислотами была их большая растворимость в неподвижной фазе²⁵.

В 1948 г. Рамсай и Паттерсон предложили силикагель в качестве носителя для распределительной хроматографии жирных кислот². Этот метод стандартизирован с C¹⁴-кислотами^{26, 27} и неоднократно применялся для разделения липидов^{28–33}. Силикагель для распределительной хроматографии суспендировали в нижней фазе системы^{2, 29, 30, 33} и под давлением заполняли колонку^{29–31, 33}. Пробу (3,3—3,8 мг липидов/г носителя)^{30, 33, 34} растворяли в верхней фазе и вносили в колонку. Растворитель (верхнюю фазу) пропускали со скоростью 0,6—1,2 мл/мин^{29, 30}. Кислоты разделяли в системах: фурфуриловый спирт — 2-аминопиридин (1 : 1)/гексан², 0,25 N NH₄OH в метаноле/изооктан²⁹, 0,2 N NH₄OH в смеси метилового эфира этиленгликоля и воды (9 : 1)/гексан³⁰, 0,3 N NaOH в CH₃OH/циклогексан³⁴; таким образом, жирные кислоты двигались по колонке в виде солей органических или минеральных катионов. Для разделения оксикислот служили системы 0,1 N NH₄OH в 95% метаноле/петролейный эфир³⁵ или метанол — гексан — ацетон (2 : 10 : 1)³⁶, а для дикарбоновых кислот — продуктов окислительного расщепления липидов — системы 0,2 N NH₄OH в смеси метилового эфира этиленгликоля и воды (9 : 1)/смесь гексана и дибутилового эфира (1 : 1)³⁰,

1 M цитрат Na, pH 5,4/хлороформ — бутанол³⁷ или метанол — вода — гексан — ацетон (7,7 : 1,9 : 77 : 34)³³. Продукты окисления триглицеридов смесью перманганат — периодат разделяли в системе 90% этанол/петролейный эфир³⁸. Нейтральные производные кислот фракционировали в системах цитрометан/петролейный эфир^{31,39} или 2-феноксиэтанол/гептан³². Время анализа на колонках с кремнекислотой достигало 20 час.³⁰ Для количественного определения отдельные фракции элюата титровали 0,05 N NaOH по фенолфталеину^{2,33} или феноловому красному³⁰. Силикагель можно пропитать индикатором до разделения; в этом случае кислоты мигрируют в виде окрашенных полос^{29,30}. Производные жирных кислот образуют окрашенные зоны на колонке при отсутствии индикаторов^{31,32,39}. В элюате содержалось 95—105% исходных липидов^{2,29,30,33}.

Липиды выходят из колонки в порядке возрастания полярности. «Четные» насыщенные C_{10–22}-одно- и двухосновные кислоты хорошо разделяются^{2,29,30,34,37}; для разделения C_{6–10}-дикарбоновых кислот достаточно различия на CH₂-группу³³. Рициновая и диоксистеариновая кислоты отделяются друг от друга и от других кислот^{35,36}. Продукты окисления глицеридов делились на фракции SSS+SSA и SAA+AAA, где S и A — ацилы насыщенных кислот и азелайновой кислоты³⁸. В ряду n-фенилазофенациловых эфиров C_{2–18}-насыщенных кислот³² и 2,4-динитрофенилгидразонов (2,4-ДНФГ) этих эфиров³¹ полностью разделялись гомологи, различающиеся на CH₂-группу. При помощи колонки по Рамсаю было проведено фракционирование гомологического ряда 2,4-ДНФГ C_{2–18}-жирных альдегидов³⁹. В согласии с основным уравнением Мартина для распределительной хроматографии¹, логарифм удерживаемого объема V_R этих соединений в колонке находился в линейной зависимости от длины цепи. Такая закономерность была использована для идентификации липидов^{28,29,40}.

Новый метод *кристаллизационной хроматографии* на колонке применяли для разделения триглицеридов насыщенных кислот. Латунную колонку заполняли стальной ватой с песком. Температура в нижней части колонки была на 20° ниже, чем вверху; среднюю часть терmostатировали. В верхнюю часть вносили смесь глицеридов, колонку заполняли ацетоном, а затем подавали гексан или четыреххlorистый углерод со скоростью 1—2,8 мл/мин. Высокоплавкие компоненты задерживались в колонке в виде кристаллов устойчивой β'-формы. Сначала выходил МММ-глицерид, затем ППП и ССС*. Эвтектическая смесь ПСП- и СПП-глицеридов не разделялась⁴¹.

2. Хроматография на бумаге

В ранних работах *жирные кислоты* убывающей полярности элюировали со старта водным метанолом или ацетоном; подбирая растворители, смесь кислот частично разделили на 2 или даже 3 компонента^{42–50}. Триглицериды⁴⁴ и полимеризованные липиды^{44,45,47} оставались на старте. Соли жирных кислот отделялись водой от других липидов⁴². Применяя петролейный эфир, эфир и дихлорэтилен, разделили смесь ди-, тетра- и гексабромстеариновой кислот, соответственно⁵¹. Ди-, тетра- и гексаокси-стеариновую кислоты, полученные окислением перманганатом ненасыщенных C₁₈-кислот, разделили в системе бутанол — этанол — вода — конц. NH₄OH (75 : 15 : 8 : 2)⁵². Жирные кислоты с сопряженными связя-

* М, П, С — ацилы миристиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот.

ми до разделения выдерживали в парах малеинового ангидрида; продукты диенового синтеза оставались на месте, а незамещенные кислоты двигались с фронтом 75—99% метанола^{45, 46}. Одно- и двухосновные кислоты С₂—12 (продукты окисления липидов) можно разделить в *N* NH₄OH в 78% этаноле⁵³. Чаще для такого разделения используют хроматографию гидроксамовых производных в водонасыщенном бутаноле или феноле; гидроксаматы обнаруживают с Fe³⁺^{54—58}.

Липиды кожи, сыворотки крови и спинномозговой жидкости, а также триглицериды растительных масел разделяли на несколько фракций в 99% метаноле^{59, 60}, смеси метанола с ацетоном⁶¹ или смеси длизобутилкетона, уксусной кислоты и воды (8 : 5 : 1)⁶². Растворителями для разделения фосфолипидов^{7, 11, 17} служили смесь хлороформа, метанола и воды (32 : 8 : 1)⁶³, смесь ацетона с метанолом, а затем водонасыщенный фенол⁶⁴, водный этанол⁶⁵, смесь лутидина с метанолом (3 : 2)⁶⁶, а при использовании анионообменной бумаги из аминоэтилцеллюлозы — смесь длизобутилкетона, уксусной кислоты и воды [8 : 5 : 1]⁶⁷. Эффективность разделения на необработанной бумаге обычно невелика. Смесь Ф-холина и сфингомиэлина отделялась от смеси Ф-этаноламина и Ф-серина⁶⁸. Последовательным проявлением двумя системами растворителей разделили Ф-холин, Ф-серин и Ф-этаноламин⁶⁴. В одномерной системе разделили насыщенные и ненасыщенные Ф- и лизо-Ф-холины⁶⁵. Ацетилирование NH₂-групп Ф-этаноламина приводит к его полному отделению от Ф-холина и сфингомиэлина⁶⁶. Более эффективное разделение наблюдалось на анионообменной бумаге; при 4° *R_f* составляли: Ф-инозит 0,29; сульфолипид 0,30; Ф-глицерин 0,42; дигалактолипид 0,49; Ф-этаноламин 0,58; Ф-холин 0,61; галактолипид 0,68; триглицериды 0,98⁶⁷.

Иногда жирные кислоты и другие липиды разделяют с неводной полярной фазой. Одноосновные С₄—14-ненасыщенные кислоты (10—100 мг) разделяли на бумаге, пропитанной алюмокалиевыми квасцами, используя смесь четыреххлористого углерода, метанола и конц. NH₄OH (81 : 18 : 1)⁶⁸. Те же кислоты в виде их 2,4-динитробензиловых эфиров разделяли с диметилформамидом в смеси циклогексана и углеводородов с т. кип. 190—220°⁶⁹. В системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5)/формальдегид разделялись глицерин, моно- и диглицериды стеариновой кислоты⁷⁰. Величина *R_f* была всегда пропорциональна длине цепи.

Фосфолипиды разделяли на бумаге с формальдегидом, где растворителем была смесь бутанола, уксусной кислоты и воды (4 : 1 : 5) или двухмерная система из той же смеси и нейтрального растворителя — тетрагидрофуран — длизобутилкетон — вода (45 : 5 : 6)^{71—73}. В кислом растворителе липиды располагались (от фронта) следующим образом: триглицериды, Ф-этаноламин + Ф-холин, лизо-Ф-холин, Ф-серин, Ф-инозит, лизо-Ф-инозит, гликолипид⁷¹; в нейтральной системе разделялись сфингомиэлин, Ф-холин, Ф-этаноламин, полиглицерофосфатид и цереброзид, а также лизо-Ф-холин и лизо-Ф-этаноламин^{72, 73}.

Для обнаружения липидов пользуются обычными реакциями (см. раздел III, 4, Д); так, фосфолипиды окрашивают фосфомолибденовой кислотой, хлористым оловом, нингидрином, реагентом Шиффа, перманганатом, иодом или нильским голубым^{64, 71}. Для нейтронного активационного анализа сухие хроматограммы 15 час. облучали в алюминиевом контейнере медленными нейтронами (5×10^{11} нейронов/cm²/сек). Полосы выдерживали неделю до полного распада короткоживущих изотопов, а затем экспонировали с рентгеновской пленкой или измеряли радиоактивность зон счетчиком Гейгера. Минимальное обнаруживаемое количество липидов (*z*) составляет 0,05 мкг Р/cm²^{74, 75}.

III. ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

1. Общие закономерности обращенно-фазовой хроматографии

До сих пор мы рассматривали хроматографию липидов в обычных распределительных системах, где неподвижной является более полярная фаза. Между тем для эффективного распределительно-хроматографического разделения неподвижной фазой должно служить такое вещество, где анализируемые компоненты имеют более высокую растворимость; в ходе хроматографического процесса эти соединения медленно элюируются большим объемом подвижной фазы, где они растворимы в меньшей степени. Поскольку липиды с более чем 10 атомами С мало растворимы в воде, но отличаются высокой растворимостью в неполярных веществах, для разделения липидов лучше применять системы, в которых неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная, а липиды располагаются на хроматограмме в порядке, обратном приведенному выше (см. раздел II) — так называемые «обращенно-фазовые» системы. Этот термин отражает историческое развитие хроматографии, поскольку системы с «нормальным» соотношением полярности отдельных фаз были разработаны раньше, чем обращенно-фазовая хроматография (см. раздел I), впервые использованная Болдингом в 1948 г. для разделения метиловых эфиров жирных кислот³, а затем развитая в работах Ховарда и Мартина⁷⁶, Кауфмана⁷, Иноэ⁵⁶, Шленка¹⁴, Ганстоуна⁷⁷, Бьюкенена⁷⁸ и др.

Расторимость липидов в неполярных фазах определяется взаимодействием между алифатическими цепями липидов и растворителя на основе сил Ван-дер-Ваальса, которые возрастают с увеличением длины цепи и ослабеваются под действием двойных связей. Транс-двойные связи в минимальной степени укорачивают цепь и влияют на силы Ван-дер-Ваальса не так значительно, как цис-связи, сильно сокращающие эффективную длину молекулы; это делает возможным разделение геометрических изомеров (см. раздел III, 4, Г). Появление двойной связи в цепи заметно увеличивает растворимость липидов в полярной фазе, благодаря возникновению дипольных взаимодействий.

Главное правило обращенно-фазовой хроматографии состоит в том, что в пределах одного класса появление двойной связи в алифатической цепи липида (на достаточном удалении от концов цепи) и укорочение цепи на две СН₂-группы обычно в одинаковой степени увеличивает значение хроматографической подвижности. Такая закономерность позволяет предвидеть относительную подвижность липидов, исходя из их состава, на основе константы полярности $K=100-m+2e$, где m — число атомов углерода, e — число двойных связей: липиды с одинаковой величиной K не отделяются друг от друга в обращенно-фазовых системах. Отклонения от этого правила наблюдаются редко (см. раздел III, 3; III, 4, Е).

Можно считать, что липиды равной полярности не отличаются друг от друга по величине коэффициента распределения α . Для экспериментального определения значения α жирных кислот в системе водный ацетон/парафиновое масло 2 мл кислоты растворяли в 0,5 мл неполярной фазы, смешивали с 0,5 г носителя (кизельгур) и прибавляли 5 мл водного ацетона. Систему уравновешивали при 35°, центрифугировали и пробы верхней фазы по 2 мл титровали А мл 0,001 N едкого кали в метаноле. К остатку прибавляли 5 мл 95% ацетона, который полностью элюирует кислоты из неполярной фазы, и пробы по 2 мл титровали Р мл щелочи. Величину α (соотношение концентраций кислоты в подвижной и неподвижной фазах) вычисляли по формуле $\alpha=AV/(6P-A)$, где V —

объем неполярной фазы. Точность определения T в %, которую находили по уравнению $T = 100 \cdot NE / (2A + 3P)/W$, где N — нормальность щелочи; W и E — вес и эквивалент кислоты, обычно составляла $100 \pm 5\%$. Откладывая в системе координат величину $\log_{10} 100a$ для различных жирных кислот против концентрации ацетона в растворителе, получили семейство параллельных прямых; для кислот одинаковой полярности эти прямые совпадали. Оптимальные условия разделения обеспечиваются при такой концентрации растворителя, когда a данной кислоты равен 0,16, а a следующего высшего гомолога 0,08⁷⁹.

Для математического описания обращенно-фазовой системы разделения пальмитиновой и стеариновой кислот были введены следующие обозначения: a' — коэффициент распределения кислот в условиях хроматографического разделения; p — число теоретических тарелок в колонке; a — номер фракции элюата, где каждая фракция имеет тот же объем, что и объем подвижной фазы в теоретической тарелке; E_a — фракция растворенного вещества, содержащаяся в элюате a ; V_m — объем подвижной фазы в колонке; v — объем каждого элюата в опыте; f — номер фракции элюата в опыте, которая содержит наибольшее количество растворенного вещества, считая от момента выхода фронта растворителя из колонки; E_{\max} — фракция растворенного вещества в элюате f ; $c = V_m/v$ — объем подвижной фазы в колонке, выраженный в виде числа фракций элюата в опыте; $A_e \{x\}$ — площадь нормальной кривой ошибки для аргумента $\{x\}$.

Рассматривалась колонка, содержащая p тарелок. Принимая, что каждая тарелка действует подобно делительной воронке в процессе противоточного распределения, количество растворенного вещества $T_{n,r}$ с коэффициентом распределения a в r -ой тарелке после n переносов определяли по формуле для противоточного распределения:

$$T_{n,r} = \frac{n!}{r!(n-r)!} \cdot \left(\frac{1}{\alpha' + 1} \right)^n \cdot \alpha'^r \quad (1)$$

После p переносов фронт растворителя достигает последней p -ой тарелки, а затем известное количество растворенного вещества E_{a+1} выходит из колонки с элюатом:

$$E_{a+1} = \frac{(p+a)!}{p! a!} \cdot \frac{(\alpha')^{p+1}}{(\alpha' + 1)^{p+a+1}} = \frac{p+a}{a(\alpha' + 1)} \cdot E_a \quad (2)$$

Фракция растворенного вещества в элюате достигает максимума, когда $\alpha' = p/a$. Отношение a/p эквивалентно общему объему элюата, который необходим для достижения максимума, выраженному в объемах подвижной фазы колонки:

$$1/\alpha' = a/p = fv/V_m \quad (3)$$

Используя уравнение (3) и данные положения и высоты каждого пика на экспериментальной выходной кривой, полученной с применением 67% ацетона в качестве растворителя, вычислили фактический коэффициент распределения a' для пальмитиновой (0,50) и стеариновой (0,22) кислоты. Деля величины a' на соотношение между жидкими фазами в колонке (2,5), получили истинные значения коэффициентов распределения a , равные соответственно 0,20 и 0,09, что хорошо согласуется с найденными экспериментально величинами 0,16 и 0,08.

Из уравнений (2) и (3) можно получить уравнение (4):

$$p = 2\pi(1 + \alpha') \cdot \left(\frac{E_{\max} \cdot V_m}{\alpha' \cdot v} \right)^2 = 2\pi f(f + c)(E_{\max})^2 \quad (4)$$

Уравнение (4) позволяет вычислить число тарелок p для каждой кислоты по положению и высоте максимума элюата на выходной кривой. Для пальмитиновой и стеариновой кислот величина p равнялась соответственно 70 и 114. Подставляя вычисленные значения α' и p в уравнение (2), построили теоретическую выходную кривую, которая удовлетворительно совпадала с кривой, полученной в эксперименте.

Процент загрязнения каждого пика веществом соседнего пика η определяли по уравнению нормальной кривой ошибки:

$$\eta = 100 \left(0,5 - A_\epsilon \left\{ \frac{\sqrt{p}(\sqrt{B} - \sqrt{A})}{\sqrt[4]{AB}} \right\} \right),$$

где $A = 1 + 1/\alpha'_A$ и $B = 1 + 1/\alpha'_B$. Таким образом, для достижения заданной чистоты фракций ($\eta > 0,2\%$) при отделении кислоты с $\alpha' = 0,50$ в обращенно-фазовой системе эффективностью $p = 100$ от другой кислоты значение α' последней не должно превышать 0,23. Можно видеть, что использованная авторами система обеспечивает практически полное разделение пальмитиновой ($\alpha' = 0,50$) и стеариновой ($\alpha' = 0,22$) кислот⁷⁹.

Математическая трактовка системы обращенно-фазовой хроматографии позволяет выбрать оптимальные условия состава растворителя и эффективности колонки для разделения смеси липидов.

2. Хроматография на колонках

A. Приготовление колонок. В 1950 г. Ховард и Мартин предложили использовать гидрофобный, обработанный парами диметилдихлорсилана целик в качестве носителя неподвижной фазы⁷⁶. Целик смешивали с нейтрализованным окисью алюминия⁷⁷ парафиновым маслом (1 : 0,8 по весу^{14, 80}, 1 : 1^{76, 81} или 1 : 1,4⁷⁷), суспендировали в подвижной фазе и вносили в колонку. Парафиновое масло можно заменить силиконовым (т. кип. 195—230°/0,25 мм)^{14, 81} или ацетилизованным касторовым маслом⁷⁷, изооктаном⁸², гептаном^{83, 84} или циклогексаном⁸⁵.

Порошок каучука после набухания в бензоле⁸⁶, петролейном эфире^{35, 87, 88} или ацетоне⁸⁹ служил одновременно и носителем, и неполярной фазой. К каучуку близко по свойствам полимеризованное с S_2Cl_2 соевое масло («фактис»)⁹⁰; по эффективности разделения фактис не уступает целиту с парафиновым маслом⁸⁴. Порошок полиэтилена после набухания в ацетоне^{91, 92} или полиэтилен на целите⁹³ служат для разделения не 3—8 раз подряд, как фазы, приведенные выше, а неограниченно долго. Применяли также целлюлозу, пропитанную парафиновым маслом⁹⁴, и нейлоновые нитки, на которых 2—6 мг кислот разделяли смесь ацетона, этанола и воды и обнаруживали бромкрезоловым зеленым⁹⁵.

B. Получение хроматограммы. Пробу, содержащую 1—10 мг каждого компонента для колонок диаметром 1—2 см^{76, 77, 84, 93, 96} или 150—250 мг смеси для более широких колонок^{14, 97}, вносят в виде раствора в подвижной^{76, 93} или неподвижной фазе^{14, 84, 96} в зависимости от растворимости липидов. Объем раствора должен соответствовать одной теоретической тарелке⁸⁴. Скорость пропускания подвижной фазы изменяется от 4—20^{85, 91, 93}, 35—60^{76, 84, 90, 98}, 120—180^{14, 99} и до 300 мл/час⁸³, причем при меньшей скорости эффективность колонки несколько возрастает⁸⁴. Температура разделения должна быть постоянной. Ненасыщенные кислоты обычно разделяют при 10°^{96, 98}, смеси кислот на колонках с каучуком и полиэтиленом — при 20—25°^{86, 92}, а колонки с парафиновым маслом поддерживают при 35°^{14, 76, 80, 99}. Элюат собирают автоматическим коллектором⁸⁷, и содержание липидов во фракциях учитывают гравиметрически^{35, 85} или титрованием 0,01 N едкого кали в метаноле по

бромтимоловому синему 76, 77, 80, 82, 92, 96, 99. В других случаях к элюату добавляют 2 объема воды и определяют показания нефелометра S и S_1 для пробы и стандарта. В пределах от 2 до 20 мкг зависимость между $\log_{10}(S/S_1)$ и массой липидов была линейной^{14, 81, 100}. Содержание глицеридов определяли колориметрически с гидроксиламином и Fe^{3+} ⁸⁴. Для непрерывной регистрации липидов на выходе колонки применили дифференциальный рефрактометр; площадь пиков хроматограммы не была пропорциональна массе⁹⁰. В элюате обнаруживали 97—103% исходных липидов^{35, 77, 80, 82, 89—91}. Чистота выделенных препаратов достигала 99—100%^{14, 83}.

Растворителями при разделении липидов обычно служат водные растворы ацетона, насыщенные неполярной фазой. Для элюирования насыщенных кислот использовали следующие концентрации ацетона (в %): C₆ 30, C₈ 40, C₁₀ 50, C₁₂ 53, C₁₄ 58—60, C₁₆ 65—67, C₁₈ 70—73, C₂₀ 75—78, C₂₂ 80—83, C₂₄ 85—90^{14, 76, 77, 80, 89, 91, 96}. Растворитель для разделения триглицеридов кокосового масла представлял собой смесь ацетона, гептана и воды (5 : 1 : 0,629)⁸⁴, а для глицеридов льняного масла — 95% ацетон⁹⁰. Повышение концентрации воды увеличивает V_R и эффективность колонки^{76, 84}. Для разделения кислот и их производных применяли также смесь метанола с ацетоном (3 : 1)⁸⁶, 65—100% метанол^{82, 98}, 40—70% этанол⁹³, смесь ацетонитрила с метанолом (17 : 3)⁸³ и смесь уксусной и муравьиной кислот с водой (2 : 2 : 1)⁹⁴. Кислоты и их метиловые эфиры разделяли в системе ацетонитрил : вода (3 : 1)^{14, 81}. Применение водного этанола для фракционирования 2-моно- и 1,2-диглицеридов приводило к их переходу в устойчивые 1-моно и 1,3-ди-изомеры; в водном ацетоне миграции ацилов не наблюдалось⁸⁵.

В. *Разделение липидов.* Насыщенные *n*-жирные кислоты, различающиеся на CH₂-группу, хорошо разделяются и выходят из колонки в порядке убывания константы K ^{14, 76, 77, 80—82, 86, 87, 91}. По величине V_R лактобацилловая (11, 12-метилен-октадекановая) кислота совпадает со стеариновой кислотой⁸⁷. Ненасыщенные кислоты разделяются между собой, но не отделяются от насыщенных кислот с тем же значением K ^{8, 77, 83, 87, 99}.

Для качественного анализа смеси часть кислот гидрируют 24 часа с 5—20% Pd на угле^{77, 97, 101}; продукты гидрирования (насыщенные кислоты) хорошо разделяются на колонке^{8, 102—104}. Другую часть кислот расщепляют по двойным связям 5% перманганатом^{99, 104}, гидроксилируют надмуравьиной кислотой^{87, 105} или подвергают озонолизу в метил-ацетате при —40° в течение 5 мин.⁷⁷. Результаты одновременного определения исходных кислот и продуктов их гидрирования и окисления позволяют достаточно точно установить состав данной смеси⁷⁷. Так, олеиновая и петрозелиновая кислоты не разделяются в обращенно-фазовой системе, а возникшие при их окислении пеларгоновая и лауриновая кислоты в этой системе хорошо делятся⁹⁹.

Окси-, эпокси- и кетокислоты благодаря высокой полярности уходят далеко от обычных кислот и разделяются как в незамещенном виде^{76, 86—88, 99}, так и в виде ацетатов на колонках с ацетилированным касторовым маслом^{35, 77}. Оксистеариновая кислота по величине V_R совпадала с лауриновой кислотой^{35, 77}. Хлорфенациловые эфиры⁹³ и фториды жирных кислот⁹⁴ разделялись подобно незамещенным кислотам. На колонках с парафиновым маслом разделялись моно-, ди- и триглицериды⁸⁵, а также триглицериды, различающиеся между собой на 4 CH₂-группы или на 2 двойные связи; глицериды, отличающиеся на 2 CH₂-группы или на двойную связь разделялись не полностью⁸⁴. На колонке фактика метиловые эфиры, эфиры холестерина и триглицериды разделялись на фракции с одинаковой K ; величины $\log V_R$ находились в прямой линейной зависимости от числа атомов углерода в этих соединениях⁹⁰.

3. Хроматография на стеклянных пластинах

Хроматография в тонком слое адсорбента, закрепленном на стеклянных пластинах, получила сейчас весьма широкое распространение как метод адсорбционного разделения липидов. Одновременно пластиинки с кремнекислотой все чаще используются в хроматографии липидов в качестве носителя неполярной фазы.

Для разделения с *обращенной фазой* активированные пластиинки обрабатывали 10—15% ундеканом в петролейном эфире^{106—108}, 10% доде-каном в гексане¹⁰⁹, 5% тетрадеканом^{107, 108, 110—115}, 0,5%^{116, 117} и 10% парафиновым маслом^{118—120} или 5% силиконовым маслом в эфире^{110, 121}. Тяжелые масла не могут быть удалены с пластиинки нагреванием¹¹⁰. Разделение липидов и обнаружение отдельных зон выполняют методами, принятыми в тонкослойной хроматографии¹²².

Распределительная хроматография на пластиинках по своим результатам в общем не отличается от других видов обращенно-фазовой хроматографии; однако возможность работы в ультрамикромасштабе позволяет в ряде случаев достичь более высокой скорости и эффективности разделения. Пластиинки часто используют для двухмерной хроматографии: в одном направлении липиды разделяют на классы без нанесения неполярной фазы, а затем часть пластиинки пропитывают углеводородами, и липиды каждого класса разделяют на фракции различной полярности^{106, 109}.

Жирные кислоты C_{10-18} (0,5—20 мкг) разделяли смесью уксусной кислоты и ацетонитрила (1 : 1)^{107, 108} или 85% уксусной кислотой¹¹⁹ в течение часа. Для разделения кислот с одинаковой K в полярную фазу прибавляли 0,5% брома: при замещении ненасыщенных кислот их подвижность значительно повышалась^{108, 112}. Липиды одинаковой полярности можно разделить и *гидрированием*: кислоты на пластиинке опрыскивают 1—2% суспензией палладия, гидрируют H_2 в эксикаторе, промывают 5% HCl и разделяют с ундеканом^{108, 112, 119}. Насыщенные кислоты C_{18-34} разделяли в системе изопропанол — этанол — уксусная кислота — вода (8 : 3 : 4 : 1,3)/тетрадекан при 42° и определяли количественно с ацетатом Cu (см. раздел III, 4, Д, а)¹¹⁴. С 80% уксусной кислотой разделили C_{13-25} -2-метил-4-кетокислоты и C_{12-22} -оксикислоты¹¹¹. Растворителями для C_{12-34} -жирных спиртов служили 85% уксусная кислота или 90% ацетон^{114, 116}.

Метиловые эфиры кислот разделяли в смеси уксусная кислота — ацетонитрил — вода (2 : 14 : 5)¹²¹ или ацетон — ацетонитрил (7 : 10)¹⁰⁹. Насыщенные и ненасыщенные эфиры одинаковой полярности разделяли при 4—6° (см. раздел III, 4, Г) или в присутствии надуксусной кислоты (см. раздел III, 4, Е)¹²¹. Метиловые и этиловые эфиры с разным количеством двойных связей разделили на непропитанной пластиинке с кремнекислотой 4-кратным пропусканием смеси петролейного эфира с бензолом (4 : 1); затем пластиинку пропитывали парафиновым маслом и разделяли фракции, отличающиеся количеством атомов углерода. Метиловые эфиры отделялись от этиловых эфиров тех же кислот¹¹⁹. Аналогичным методом разделяли эфиры холестерина; растворителями служили метилэтилкетон — ацетонитрил (7 : 3)^{118, 119} или уксусная кислота — хлороформ (80 : 15)^{116, 117}.

Триглицериды разделяли смесью ацетон — ацетонитрил (4 : 1)^{107, 119} или уксусной кислотой¹¹⁷; за 35—100 мин. льняное масло делилось на 9, а масло сои — на 6 фракций. Разделения триглицеридов одинаковой полярности обычно не происходило. Однако подвижность глицеридов с одной и той же величиной K не всегда абсолютно одинако-

ва¹¹⁰. Многократное проявление пластинок одним растворителем с подсушиванием после каждого проявления приводит к разделению 1—2 мкг компонентов одинаковой полярности. Так, глицерид ЛелЕле отделяется от ЛалЛа, ЛЛЛ — от МММ, ООЛ — от МОО, ООЛ — от ППЛ, ОOO — от ПОО, ОOO — от ППП, ППО — от ППП и т. д.*. При 3-кратном проявлении удалось разделить смесь ОOO, ПОО, ППО и ППП глицеридов, а также отделить глицериды олеиновой от соответствующих глицеридов элаидиновой кислоты. Льняное масло разделяется при этом уже не на 9, а на 15 фракций, масло сои — на 13, арахиса на 12 и т. д.¹¹³. Таким образом, двойная связь триглицеридов компенсируется не точно 2 CH_2 -группами, как считали ранее, а приблизительно 2, 4 группами; с увеличением различия в числе двойных связей между липидами одинаковой полярности R_f более ненасыщенного компонента возрастает. Снижение молекулярного веса неподвижной фазы, неблагоприятное соотношение между компонентами пробы и повышение ее веса отрицательно сказываются на эффективности разделения глицеридов¹²³. Раствор 0,5% брома в смеси пропионовой кислоты с ацетонитрилом (3 : 2) вполне пригоден для разделения триглицеридов одинаковой полярности; применяют также описанный выше метод гидрирования^{108, 112}.

4. Хроматография на бумаге

A. Подготовка бумаги и нанесение неподвижной фазы. Для разделения пригодны такие сорта хроматографической бумаги, которые обладают достаточной прочностью во время промывания в воде¹⁷. Этим требованиям отвечают бумаги Ватман № 1^{15, 124—128}, № 3^{17, 129}, № 4^{124, .30}, Шлейхер и Шюль № 595^{3, 15}, № 598¹³¹, № 2040^b_{132, 133}, № 2043^b_{7, 17, 123, 134, 135}, № 2043^b *Mgl*^{136, 137}, Тойо № 2^{138, 139} и Машери Нагель № 214¹³⁴. Применяли также бумагу «Б» или «М» Ленинградской фабрики № 2^{140—145} или № 69 «Гознак»^{146, 147}; эти сорта менее удовлетворительны, чем перечисленные выше¹⁴⁴. Бумагу очищали промыванием 0,5—10% соляной кислоты^{144, 148}, 3% азотной кислоты¹⁴², 20% муравьиной кислоты¹⁴⁷, 95% уксусной кислоты¹²⁷, водным ацетоном¹⁴⁹, этанолом¹⁴⁸, эфиром^{127, 146, 148} или бензолом¹⁵⁰, отмывали водой, сушили при 90—120°^{125, 128, 130, 135, 144} и сохраняли над прокаленным хлористым кальцием^{136, 150}.

В ранних работах для придания бумаге гидрофобных свойств пытались превратить целлюлозу в ее эфиры. Для получения октадецилоксиметилового эфира бумагу обрабатывали 3 часа при 90° 0,5% хлоридом октадецилоксиметилпиридиния в толуоле¹⁵¹. Гидроксаматы кислот разделяли на бумаге, ацетилированной ацетангидридом в бензole при 70°^{152, 153} или пальмитилированной тем же способом¹⁰⁵. Эфиры целлюлозы не получили распространения в хроматографии, поскольку гидрофобную бумагу легче получить пропитыванием обычной бумаги высококипящими липофильными веществами.

Для разделения C_{10-20} -жирных кислот бумагу обычно пропитывают ундеканом, насыщенным подвижной фазой^{134, 139, 154—163}, отжимают 10—30 мин. фильтровальной бумагой под грузом 4 кг и выдерживают 10 мин. на воздухе^{137, 140, 144, 150, 156}. Оптимальное содержание ундекана равно 100—250 мг/г^{133, 136, 150, 164}. После разделения концентрация ундекана у фронта вдвое превышает исходную величину, а на старте падает почти до нуля. Стекание ундекана можно ослабить путем понижения его

* La, O, L, Le — ацилы лауриновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот.

исходной концентрации, применения гидрофобной бумаги в качестве носителя и горизонтального проявления хроматограммы. Если не пропитывать начальный участок полосы, то скорость подвижной фазы заметно возрастает¹⁵⁹. Ундекан можно удалить с бумаги при 80—95°.

Как правило, с уменьшением полярности разделяемых липидов приходится использовать неподвижные фазы с более высоким молекулярным весом и пониженной полярностью. Благодаря меньшей растворимости таких веществ в подвижной фазе эффективность разделения и предельный вес пробы возрастают; однако удаление фазы перед окрашиванием липидов становится невозможным. Для разделения насыщенных и ненасыщенных кислот и метиловых эфиров применяли 10% тетрадекан в петролейном эфире¹³⁵, 5—10% вазелиновое масло в бензole, эфире или четыреххлористом углероде^{141, 142, 145—147, 165, 166} или 10% смесь вазелинового и парафинового масел в бензоле^{141, 145}. На бумаге, пропитанной 5—15% парафиновым маслом ($d=0,885—0,890$) в бензоле, эфире и петролейном эфире, разделяли насыщенные кислоты от C_{20} и выше, а также триглицериды^{127—131, 148, 149, 167—174}. Пропитывают обычно протягиванием полосы через раствор или восходящим и горизонтальным насасыванием^{147, 170, 171, 175}. Неполярная фаза составляет 10—15% от веса бумаги¹⁶⁵.

Бумага, пропитанная 10—30% латексом каучука, после набухания в ацетоне могла служить для разделения кислот и метиловых эфиров в системах метанол — ацетон (1 : 1) и 80% метанол — изооктан^{3, 168}. Применили также смесь 0,5% каучука и 30% нафталина в бензоле (4 : 1)¹⁷⁶. С тетралином и декалином разделяли 2,4-ДНФГ *p*-бромфенациловых эфиров («бромазоны»), 2,4-ДНФГ, ацетол- и ацетоксимеркуриметокси-(АОММО-) производные ненасыщенных метиловых эфиров, глицеридов и фосфолипидов^{138, 163, 177—184}, а также жирные кислоты¹⁸⁵.

Растительные масла применяли для пропитывания только в ранних работах^{124, 186, 187}; лишь касторовое масло при разделении оксистеариновых кислот по эффективности превосходит углеводородные фазы¹²⁶.

Из кремнийорганических соединений применяют силиконовое масло (1—5% Родорсил 240, Доу Корнинг 200, Тип-2 в циклогексане или эфире), мало растворимое в подвижных фазах^{49, 125, 139, 143}.

Концентрация неподвижной фазы в системе определяет длительность опыта: при содержании ундекана 150 мг/г анализ кислот занимает 1—2 часа, а при 600—700 мг/г движение полярной фазы прекращается¹⁸⁸. Если содержится 0,1% фазы, то насыщенные кислоты до C_{26} можно разделить без нагревания камеры¹⁸⁹. При снижении содержания фазы разности значений R_f (ΔR_f) возрастают; следовательно, обращенно-фазовая система является истинно-распределительной системой, где нет адсорбции^{16, 188}. Для воспроизводимости R_f содержание фазы по длине полосы должно быть равномерным⁵.

Б. Получение хроматограммы. Если содержание отдельных липидов в смеси мало, их надо препаративно выделить до разделения. Высшие $C_{20—36}$ -кислоты из воска концентрировали кристаллизацией с мочевиной¹⁴¹. Полиненасыщенные кислоты из рыбьих жиров фракционировали в виде Li-солей¹⁹⁰. Жирные кислоты из древесины отделяли хроматографией от смоляных кислот¹⁹¹. Спирты на бумаге, пропитанной едким кали, шли с фронтом толуола, а кислоты оставались на старте¹⁹².

На стартовую линию в 2—6 см от края^{78, 126, 147} наносят по 10—100 мкг каждого компонента^{7, 78, 141, 170, 174, 176} или 100—500 мкг смеси липидов^{15, 126—128, 134, 147, 161, 167, 193} в растворе хлороформа^{15, 78, 126}, спирта^{127, 167, 170}, эфира¹²⁸, ацетона^{146, 147} или бензола^{16, 179, 193} в виде полосы^{147, 193} или точек¹²⁶. Насыщенные $C_{20—30}$ -кислоты для предотвращения кристаллизации следует до разделения выдержать при 80—90°¹⁵. Ненасыщенные

сыщенные кислоты с сопряженными связями надо наносить сразу перед разделением во избежание полимеризации¹⁹⁴. Обычные ненасыщенные кислоты также разрушаются на бумаге при отсутствии растворителя¹²⁵.

Полосу выдерживают в парах подвижной фазы^{126, 137, 155, 195} и проявляют нисходящим^{78, 126, 128, 140, 164, 179}, восходящим^{141, 144, 146, 167, 176, 184, 196}, горизонтальным^{7, 188, 197} или круговым способами^{160, 161, 163, 173, 198}; последний метод обеспечивает препартивное разделение липидов (более 10 мг)¹⁷². Подвижная фаза обычно продвигается от старта на 20—35 см. Эффективность разделения возрастает, если верхней части полосы придать клиновидную форму по Маттиасу^{17, 132, 199}. Для быстрого анализа кислот применяют восходящую хроматографию в пробирках¹³⁷.

В. Подвижные фазы. Подвижная фаза должна обладать высокой полярностью и низкой летучестью, хорошо растворять липиды пробы и мало смешиваться с неполярной фазой. С увеличением полярности фазы ΔR_f возрастают, а растворимость липидов снижается. Если же уменьшить количество воды, то длительность и эффективность разделения снизятся. Подвижные фазы непременно содержат неподвижную фазу системы (80—90% от насыщения).

Уксусная кислота почти всегда присутствует в подвижной фазе. Система 90% уксусная кислота/ундекан разделяет C_{16-18} -насыщенные и ненасыщенные кислоты^{15, 16, 137, 140, 144, 156—158, 161, 163}¹⁹³, циклопентенил-жирные кислоты²⁰⁰ и жирные спирты¹⁹². Иногда 90% уксусную кислоту используют с парафиновым^{126, 173} и вазелиновым маслом¹⁴⁶. Для C_{20-34} -насыщенных кислот^{15, 126, 127, 129, 160, 174, 201, 202} и полиненасыщенных глицеридов^{132, 172, 198} применяют 95—100% уксусную кислоту, а для C_{10-14} -насыщенных кислот и C_{10-18} -окси-, -эпокси- и кетокислот^{15, 126, 127, 140, 157, 168, 202}, роданидов кислот²⁰³, моноглицеридов¹⁴³ и оксимов C_{8-18} -альдегидов — 50—75% уксусную кислоту²⁰⁴. Если в пробе содержатся C_{10-24} -жирные кислоты, используют разделение с градиентом концентрации уксусной кислоты от 50 до 90%; концентрацию C_t в момент време-

ни t вычисляют по формуле $C_t = C_0 \cdot e^{-\frac{v}{V} \cdot t}$, где C_0 — исходная концентрация кислоты; V — объем камеры смесителя; v — скорость поступления кислоты в камеру^{15, 170}. Применение муравьиной кислоты для разделения жирных кислот [98% уксусная кислота — 85% муравьиная кислота — вода (30 : 10 : 1)^{141, 142, 145, 147, 166} или 85% уксусная кислота — 88% муравьиная кислота (1 : 1)²⁰⁵] увеличивает эффективность разделения и компактность зон. Системы с ацетонитрилом или ацетоном хорошо растворяют липиды, увеличивают скорость разделения и ΔR_f и выдерживают температуру до 45°^{7, 15, 188}. Для кислот используют смеси уксусная кислота — ацетонитрил (5 : 7)¹⁹⁰, ацетон — уксусная кислота — вода (8 : 2 : 1)^{7, 16, 133, 188}, ацетон — уксусная кислота (3 : 1)¹⁶⁵, или 85% ацетон — 90% уксусная кислота (3 : 2)¹⁶⁴; для триглицеридов — ацетон — ацетонитрил (4 : 1)^{131, 150, 172}, ацетон — метанол (9 : 1^{128, 172} или 3 : 1¹³⁰); для АОММО-производных аллиловых эфиров насыщенных кислот и аллилуретанов высших спиртов, а также оксимов сложных дизифиров диоксиацетона — уксусная кислота — ацетонитрил (3 : 1)^{196, 204, 206}. Водные 80—98% растворы ацетона служили для разделения моно- и триглицеридов¹³⁴ и жирных кислот^{126, 207}.

Для разделения «бромазонов» и АОММО-производных ненасыщенных липидов и фосфолипидов применяли системы, содержащие метанол [метанол — уксусная кислота (30 : 1), 90% метанол — уксусная кислота (30 : 1)¹⁷⁹; метанол — уксусная кислота (5 : 1)^{139, 163, 178, 182}, 90% метанол — уксусная кислота (5 : 1)^{178, 181, 183}, 70% метанол — уксусная кислота (3 : 2)¹⁸⁴]. Насыщенные C_{20-36} -кислоты разделяли в системе метил-

ацетат — уксусная кислота — вода (5 : 20 : 2)^{139, 162}, 99,5% изопропанол — 96% этанол — уксусная кислота — вода (8 : 2,5 : 4 : 1,25)¹³⁵ или метанол — уксусная кислота — вода (5 : 4 : 1)¹⁶. Водный 75—95% метанол^{167, 176, 177} и этанол^{124, 186}, 55—65% изопропанол¹⁵⁶ и изопропанол — метанол — вода (11 : 5 : 4)²⁰⁸ в настоящее время почти не используют для разделения кислот вследствие низкой величины ΔR_f и возникающего здесь «взаиморастворения», когда зоны с малым содержанием липидов поглощаются более крупными соседними зонами¹⁹³. Смеси метанола с хлороформом 1 : 3²⁰⁵ или с тетрагидрофураном и четыреххлористым углеродом¹²⁵ и смесь уксусная кислота — хлороформ (16 : 3)²⁰⁹ применяли для разделения триглицеридов.

2,4-ДНФГ C_{8-18} -альдегидов разделяли в системе диметилформамид — формамид (5 : 2)/углеводороды с т. кип. 150—180°, а их АОММО-производные — в той же системе с тетралином^{7, 210, 211}.

Г. Температура разделения. Взаимное насыщение фаз и хроматографическое разделение обычно проводят при $20 \pm 2^\circ$. Повышение температуры увеличивает R_f и скорость разделения, но вызывает стекание неполярной фазы¹⁶. Охлаждение до 17° останавливает разделение насыщенных кислот, растворимость которых (в г/100 г уксусной кислоты) при 20 и 30° равна, соответственно: C_{10} 567, 8230; C_{12} 81,8, 297; C_{14} 10,2, 51,1; C_{16} 2,14; 8,11; C_{18} 0,12, 1,68^{159, 188}.

Падение растворимости с температурой используют для разделения насыщенных и ненасыщенных кислот одинаковой полярности. Насыщенные кислоты можно осадить до разделения из петролейного эфира при -20° ^{163, 212}. В системе ацетон — ундекан при -20° на старте остаются насыщенные кислоты C_{18} и выше, при -30° — C_{16} и выше, при -38° — C_{14} и выше, при -50° — C_{12} и выше, а кислоты, подвижные при данной температуре, разделяются между собой¹⁸⁸. После нанесения кислот полосу выдерживали при -30° , а затем проявляли 20 час. в системах: 1) ацетон — пропионовая кислота — вода (4 : 3 : 0,5)/ундекан при -30° или 2) 85% уксусная кислота — 85% муравьиная кислота — вода (10 : 10 : 1)/силиконовое масло при -10° . Насыщенные кислоты, начиная с C_{14} , были неподвижны^{15, 125, 188}. При двухмерной хроматографии в первом направлении применяют систему 2, а во втором — 93% уксусную кислоту при 20° ²¹³. При разделении *цис*-, *транс*-изомеров система 1 элюирует олеиновую кислоту, а элаидиновая кислота остается на месте^{18, 214}.

Для повышения растворимости C_{20-26} -насыщенных кислот температуру в камере приходится поднимать до 30° ^{7, 15, 125, 127, 188, 205}, для C_{24-28} — до $45-55^\circ$ ^{139, 145, 149, 173}, а для C_{26-34} — до $55-85^\circ$ ^{129, 135, 141, 174}.

Д. Обнаружение и количественное определение липидов. Окрашенные липиды, например «бромазоны» жирных кислот, можно сразу определить количественно при помощи фотометра¹⁸¹. Однако большинство липидов алифатического ряда бесцветны. Для их обнаружения и количественного определения применяют цветные реакции, даваемые карбоксильными, гидроксильными и другими группами, двойными связями и самой алифатической цепью.

а. Реакции карбоксильной группы. Жирные кислоты и другие кислые липиды легче всего определить неспецифической реакцией с индикаторами⁷: 0,2—0,4% бромтиловым синим в спирте, pH 8—8,3^{151, 168, 176}, бромфеноловым синим^{134, 215, 216} или бромкрезоловым зеленым¹⁷⁷, 0,05% крезоловым красным и крезолфталеином в 0,8% NaOH^{198, 217}, малахитовым зеленым¹⁸⁵, нильским голубым^{158, 217}, тимолфталеином и феноловым красным^{217, 218}. С пирогаллововым красным $\lambda=15$ мкг²¹⁹. Окраска кислот быстро выцветает. Данные титрования кислот 0,005 N NaOH по бромтиловому синему после их экстрагирования с бумаги совпадали с роданометрическими результатами^{134, 215}.

Гидроксамовые кислоты обнаруживали кислым 1,5—2% FeCl_3 в смеси этанола с бутанолом (1 : 4) в виде пурпурных зон^{152, 153}. По чувствительности эта реакция уступает реакции с индикаторами¹⁷⁶. Полученные с диазометаном-С¹⁴ метиловые эфиры жирных кислот количественно определяли путем сканирования радиоавтографа хроматограммы на микротометре МФ-4^{165, 220}.

Обычно жирные кислоты определяют в виде солей тяжелых металлов⁷. Для получения солей Со полосу выдерживали в парах NH_3 , погружали на час в 0,03—2,5% ацетат Со⁵⁹, pH 5,8—6,0, содержащий 2—3 мкюри Со⁶⁰/мл, окрашивали сульфидом аммония и измеряли на гейгеровском счетчике с точностью 2,5%^{221, 222}. Одни соли Со⁵⁹ не пригодны⁴³.

Основной ацетат меди (II) используют чаще других солей⁷. Полосу погружают на 20 мин. в смесь насыщенного ацетата меди и воды (1 : 49), промывают водой, подкисленной уксусной кислотой, и обнаруживают бледно-зеленые зоны кислот¹⁸⁶. Для получения темно-буровой окраски ферроцианида меди применяют 1—1,5% ферроцианид калия ($z = 5 \text{ мкг}$)^{155, 156, 158, 167}. Если этот раствор подкислить, то соли переходят в свободные жирные кислоты. Таким образом, реакцию с ацетатом меди — ферроцианидом калия можно для повышения чувствительности проделать многократно¹⁸⁸. Под действием 5% хлорного железа ферроцианид меди дает голубые зоны $\text{FeCu}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ¹⁴⁶.

В реакции медных солей, обработанных парами амиака¹³³, с основным 0,03% спиртовым дитиооксамилом (рубеановой кислотой) $z = 0,1 \text{ мкг Cu}$ ^{126, 223, 224}. Применяя многократное окрашивание, обнаружили С_{30—36}-кислоты воска, способные разделяться только в очень малых количествах²²⁴. Этую же реакцию дают альд- и кетоксимы²⁰⁴.

Соли меди можно обнаружить по выделению кислорода и вспениванию с перекисью водорода и NH_4OH ($z = 5—10 \text{ мкг}$)²²⁵. Когда по бумаге движется раствор ацетата Cu, зона жирных кислот вызывает искривление фронта⁵⁹. Окраску медных солей жирных кислот усиливает 0,5% родамин В^{43, 49} и анилин — этиanol (1 : 1)¹³⁷.

Стехиометрическая реакция синтеза медных солей кислот от С₁₂ и выше часто используется для количественного определения. Для приближенной оценки измеряют площадь пятна T' и вычисляют количество кислоты C' по формуле $T' = k \log C' + b$, где для олеиновой кислоты $k = 182$, $b = 166$, а для линолевой $k = 134$, $b = 189$ ¹⁹³. Обычно количественное соотношение зон определяют фотоэлектрическим денситометром. Мимо 1-мм щели фотоэлемента протягивают окрашенные хроматограммы или их фотографии и отмечают поглощение света. Площадь пиков на кривой пропорциональна молярной концентрации кислот^{144, 146, 155, 223}. Для получения равномерного низкого фона светопоглощения необходимо очистить бумагу (см. раздел III, 4, А) и возможно полнее удалить неподвижную фазу, уксусную кислоту (без нагревания) и раствор медной соли, pH которого не должен превышать 5^{53, 126, 204, 226}. Если нельзя удалить с бумаги неполярную фазу, то кислоты с низкой K неполностью переходят в медные соли, и при расчете надо вводить поправку¹²⁶. Когда светопоглощение между пиками не возвращается к нулю, площадь для каждого компонента находят при помощи вспомогательных линий^{126, 227}. Закон Беера соблюдался от 1 до 60 мкг кислот^{126, 226}. Точность определения кислот, содержание которых выше 2%⁷, достигала $\pm 3\%$ ²²⁸.

Стехиометричность реакции доказали методом полярографии и колориметрии. Ионы меди элюировали 0,06—1 N H_2SO_4 . Линейность высоты, ступени на полярограмме от количества меди нашли для 1—7 мкг меди/мл^{227, 229, 230}. При колориметрии с 0,1 M тетраэтилтиурамдисуль-

фидом²³¹ или 0,001% дитизоном²³² закон Беера выполнялся от 10 до 30 мкг/мл. Точность обоих методов равна $\pm 5\%$ ^{230, 231}.

Соли серебра получали за 5—30 мин. в 1% амиачном нитрате серебра, избыток соли отмывали и фиксировали Ag разбавленной HCl¹⁸⁶. Для C₂₀—34-кислот раствор нагревали до 55—85°^{129, 174, 186}. Соли серебра окрашивали 10 мин. нагреванием до 140—150°^{129, 194}, сульфидами аммония^{167, 186} и натрия¹⁴⁷, сероводородом¹⁵⁶, фенилгидразином⁴³ и 0,03—0,5% *p*-диэтиламинобензилиденроданином^{43, 174, 233}. Точность денситометрии C₁₆—18-кислот на МФ-4 с дополнительным проектирующим объективом была достаточной¹⁴⁷; фотографии хроматограмм C₂₄—34-кислот сканировали на приборе МФ-2 с неудовлетворительным результатом¹⁷⁴. После озоления бумаги точность анализа 0,2—2 мкмоль серебра дитизоном составляла $\pm 5\%$ ²³³. Жирные кислоты можно также определить радиометрически²³⁴ с Ag¹¹⁰.

Соли ртути (0,1% ацетат Hg²⁺ и 0,5% уксусная кислота, 15 мин.) были устойчивее к гидролизу водой, чем соли меди, а фон бумаги был светлее. Соли окрашивали 0,2% *s*-дифенилкарбазоном^{78, 173}, окраску элюировали метанолом с толуолом (1:1) и измеряли при 530 мкм^{15, 173}. Радиометрическое определение²³⁴ — с Hg²⁰³.

Свинцовые соли (1—3% ацетат свинца, pH 5,3—5,7, 20—40°) окрашивали сероводородом, 1,5% сульфидом аммония или раствором 2 г сульфида натрия, 100 г нитрата аммония и 30 мл перекиси водорода в 1 л ($z=0,5$ мкг кислоты). При помощи свинца не обнаруживаются 2-окси-кислоты^{139, 164, 168}. После экстракции с бумаги 10%-ной азотной кислотой свинец определяли дитизоном при 520 мкм. Благодаря тщательной очистке бумаги, реактивов и кварцевой посуды от следов тяжелых металлов, достигалась удовлетворительная точность измерений¹⁴². Реакция кислот с нитратом висмута (при 70—80°) и сульфидом аммония по величине z не уступала реакции со свинцовыми солями^{127, 141, 148}.

б. *Реакции гидроксильной группы.* Вицинальные OH-группы моно-глицеридов и полиоксистеариновых кислот обнаруживали реакцией Шиффа 1% периодатом, сернистым газом и *p*-розалином ($z=10$ —20 мкг)⁷⁰ или раствором 35% буры, 0,8% иодистого калия, 0,9% борной кислоты и 3% крахмала (липиды давали белые пятна на синем фоне)⁵². Для радиометрического определения моно- и диглицериды ацетилировали (C¹⁴H₃CO)₂O²²⁰.

в. *Реакции двойной связи.* Ненасыщенные липиды обнаруживают путем окисления или замещения двойных связей. При окислении в 0,1—1% щелочном перманганате ненасыщенные липиды за 1,5—5 мин. образуют бурье пятна двуокиси марганца^{48, 132, 139, 141, 166}; кислый перманганат дает белые пятна на розовом фоне⁷. Денситометрические измерения окраски, полученной действием щелочного перманганата, проводились в отраженном свете; содержание жирных кислот, глицеридов и эфиров стеринов определяли по высоте²⁰⁹ или площади пиков с точностью 3—5%¹⁶⁶. Ненасыщенные кислоты окисляли периодатом натрия и 1% перманганатом калия и сканировали на микрофотометре²³⁵.

При озонировании полосу обрабатывали бисульфитом натрия, затем 20—60 мин. озоном и, наконец, реактивом Шиффа^{208, 236}.

Ненасыщенные липиды на влажной полосе без углеводородов или с силиконовым маслом дают в парах иода при разном pH^{125, 132, 150, 220} коричневые или желтые пятна. Окраску сканировали с синим фильтром²⁰⁵. Связанный двойными связями иод обнаруживали с 0,5—1% крахмалом в виде синих пятен на светлом фоне ($z=3$ —4 мкг)^{127, 128} или с 0,2 N нитратом серебра и фотографическим проявителем эйкобромом²³⁷. Бром и родан можно частично отщепить от двойных связей в

парах аммиака; Br^- обнаруживали с феноловым красным и хлорамином ($z=0,1 \text{ мкг}$)²³⁸, а CNS^- — с солями Fe^{3+} ²⁰³. Для радиометрического определения массы и иодного числа липидов использовали растворы и пары I^{131}Br ^{222, 234, 239, 240}.

Для замещения двойных связей *солей и эфиров* жирных кислот применяют также ацетат ртути (II) в метаноле^{7, 15, 229}.



АОММО-производные эфиров синтезируют до разделения^{178, 184, 196}; производные солей получают на бумаге в 2% ацетате двухвалентной ртути, содержащем 1% уксусной кислоты только после разделения²⁴¹. Связанную ртуть обнаруживают 0,1—0,2% спиртовым *s*-дифенилкарбазоном и парами аммиака^{78, 196}; сероводород окрашивает ртуть после ее вытеснения из производных парами хлористого водорода ($z=1 \text{ мкг линолената}$)^{184, 188}. Для количественного определения используют колориметрию с *s*-дифенилкарбазоном¹⁷⁸ или дитизоном¹⁹⁶, полярографию²²⁹ и денситометрию^{184, 196}. Кауфман использовал АОММО-производные для определения насыщенных и ненасыщенных кислот с одинаковой K , например пальмитиновой и олеиновой. Параллельные хроматограммы окрашивали ацетатами меди или ртути. Поскольку карбоксильная группа эквивалентна $1/2$ атому меди или ртути, а двойная связь — одному атому ртути, y (содержание насыщенной кислоты в %) вычисляли по формулам:

$$y = [(2e + 1 - x)/2e] \cdot 100; x = F_{\text{Hg}}^{\text{испр}}/F_{\text{Cu}}; F_{\text{Hg}}^{\text{испр}} = F_{\text{Hg}}(F_{\text{Cu}}^{\text{ct}}/F_{\text{Hg}}^{\text{ct}}),$$

где e — число двойных связей ненасыщенной кислоты, которая не отделяется от данной насыщенной кислоты; F_{Cu} и F_{Hg} — площади пиков неразделяющейся смеси насыщенной и ненасыщенной кислот при сканировании хроматограмм, окрашенных, соответственно, солями меди или ртути; $F_{\text{Cu}}^{\text{ct}}$ и $F_{\text{Hg}}^{\text{ct}}$ — площади для стандарта (стеариновой кислоты)²⁴¹.

Пары OsO_4 обнаруживают 5 мкг олеиновой и 2,5 мкг линолевой кислоты в виде серых пятен на светлом фоне^{7, 161}.

г. *Реакции алифатической цепи.* Ряд методов обнаружения липидов основан на селективной адсорбции липофильных красок и других веществ из водно-спиртовых растворов и на образовании соединений включения¹¹. Из флуоресцирующих красок обычно применяют 0,05% родамин Б⁷, который обнаруживает моно-, ди- и триглицериды и жирные спирты в виде белых пятен, флуоресцирующих синим, на розовом фоне ($z=2 \text{ мкг}$)^{7, 134, 192}. Под действием перманганата цвет пятен переходит в желтый¹³⁰. Окраску родамина усиливают нильским голубым, хинином, акридиновым оранжевым и т. д.^{43, 61, 242}. Родамин Б служил приближенному определению моноглицеридов по площади пятна^{134, 215}. Протопорфирин обнаруживает фосфолипиды, кислоты и глицериды в виде флуоресцирующих красных пятен на светлом фоне ($z=1 \text{ мкг}$)²⁴³.

Комплексы липидов с жировыми красителями, хорошо заметные в видимом свете, образуются только после удаления углеводородов с бумаги^{158, 167}. Испытывали судан IV³, масляный красный О⁶² и другие красители; лучшим оказался судан черный Б¹⁵⁰, который обнаруживает эфиры многоатомных спиртов и стеаринов, но, в отличие от родамина, не окрашивает эфиры одноатомных спиртов²⁴⁴. Ненасыщенные липиды лучше связывают судан, чем насыщенные; на прямом свету окраска переходит в розовато-бурую²⁴⁵. Растворы жировых красителей в 50% диацетине использовали для денситометрии глицеридов; пропитывание полосы па-

рафиновым маслом, а-бромнафталином и эмульгирующим веществом повышало точность измерений²⁴⁶. Липиды, благодаря их поверхностно-активным свойствам, можно обнаружить по изменению гидрофильности отдельных участков полосы после разделения. На бумаге с парафиновым маслом эфиры жирных кислот и сахарозы и триглицериды давали прозрачные пятна в воде и растворе едкого кали, соответственно^{132, 247}. Триглицериды можно омыть на бумаге 10—20% едким кали при 95°, а затем обнаружить солями меди. При полном омылении окрашивание суданом прекращается^{131, 150, 248, 249}.

Альфа-циклогексстрин, связанный липидами по типу реакций включения, не окрашивается парами иода, давая белые пятна на синем фоне. Ди- и триглицериды, не образующие соединений включения, надо предварительно гидролизовать панкреатином на бумаге^{125, 220}. Реакцию включения использовали для денситометрии триглицеридов и метиловых эфиров кислот²⁰⁵.

E. Разделение липидов. В обращенно-фазовой системе разделяются гомологи с отличием на CH_2 -группу, а для рядов с одинаковой длиной цепи — на свободную или замещенную двойную или тройную связь, окси- или кетогруппу и т. д. До настоящего времени разделили гомологические ряды нормальных насыщенных C_{10-36} -жирных кислот, «четных» и «нечетных»^{78, 127, 141, 201}, моно-, ди-, три- и полиненасыщенных C_{11-28} -кислот^{126, 141, 157, 190}, моно- и диацетиленовых кислот¹²⁶, циклопентенил-ненасыщенных кислот²⁰⁰, C_{14-24} -n-2-оксинасыщенных кислот¹²⁷, C_{30} -миколевых кислот¹⁶⁹, окси-, диокси- и кетонасыщенных и ненасыщенных кислот^{126, 158, 177, 202}, C_{14-26} -2-метил-4-кетонасыщенных кислот²²², ди-, тетра- и гексабромидов стеариновой кислоты¹⁵⁸, аддуктов малеинового ангидрида с кислотами, содержащими сопряженные двойные связи²¹⁶, 2,4-ДНФГ C_{2-22} -нормальных насыщенных кислот, «четных» и «нечетных»¹⁷⁸, «бромазонов» C_{2-26} -нормальных насыщенных и ненасыщенных кислот, альдегидов и кетонов и их АОММО-производных^{139, 178, 182}, АОММО-производных ненасыщенных кислот¹⁷⁹ и аллиловых эфиров C_{20-30} -насыщенных кислот¹⁹⁶, C_{10-18} -насыщенных и ненасыщенных спиртов¹⁹² и их аллилуретанов²⁰⁶, АОММО-производных аллилуретанов C_{10-30} -насыщенных и ненасыщенных спиртов²⁰⁶, 2,4-ДНФГ C_{8-18} -насыщенных и ненасыщенных альдегидов и их АОММО-производных²¹⁰, оксимов C_{8-18} -сложных эфиров диоксиацетона и высших альдоксимов²⁰⁴, эфиров насыщенных и ненасыщенных кислот с одно- и многоатомными алифатическими и ароматическими спиртами²⁴⁴, моно-, ди- и триглицеридов одной кислоты или разных кислот^{125, 134, 162, 205, 208}, триглицеридов синтетического^{125, 132, 144, 162, 183, 205} и природного происхождения, содержащих остатки C_{8-24} -насыщенных и ненасыщенных кислот^{128, 130-132, 134, 150, 162, 183}, а также АОММО-производных глицеридов¹⁸³.

Туберкулостеариновая и нонадекановая кислоты совпадают по R_f ; следовательно, разветвление цепи на подвижность не влияет^{126, 200}. Если двойная связь достаточно удалена от концов цепи, действует правило полярности (см. раздел III, 1). Двойная же связь рядом с карбоксильом не изменяет R_f : так, 2-октадеценовая и стеариновая кислоты не разделяются между собой¹²⁶. Циклическое или рядовое²⁰⁰, изолированное или сопряженное¹²⁶, *цис*- или *транс*-положение двойной связи^{126, 157} не влияет на подвижность. Замена двойной связи в цепи тройной связью увеличивает R_f ^{126, 157}. Полярность OH-группы выше, чем у CO-группы, поэтому 12-окси- и 12-кетостеариновые кислоты отделяются друг от друга¹²⁶. В ряду окси- и кетокислот приближение функциональной группы к карбоксильу вызывает снижение хроматографической подвижности^{158, 202}.

АОММО-производные Ф-холинов разделяли на 5 фракций различного кислотного состава, причем с увеличением R_f ненасыщенность ацилов возрастала¹⁸². Ф-холины сои гидрировали и омыляли на бумаге для изучения кислотного состава²⁵⁰.

Если члены разных гомологических рядов совпадают по величине K и значению R_f , то для разделения таких липидов надо либо элиминировать ненасыщенные компоненты, либо сместить равновесие полярности в смеси насыщением двойных связей гидрофильными или гидрофобными заместителями. Перед хроматографированием жирные кислоты разделяли на насыщенные и ненасыщенные старыми методами Твитчелла и Бертрама^{7, 155}, кристаллизацией медных солей из этанола¹⁸⁶ или кристаллизацией кислот из 55% ацетонитрила²⁵¹. Ненасыщенные компоненты обнаруживали и определяли параллельным разделением исходных и окисленных 1% основным перманганатом липидов^{126, 141}. Для полного разрушения ненасыщенных кислот во время разделения применяли подвижную фазу уксусная кислота — муравьиная кислота — перекись водорода (9 : 1 : 1 или 6 : 1 : 1) при 37°, содержащую надмуравьиную кислоту; насыщенные кислоты в этой фазе не окислялись⁷⁸.

При гидроксилировании перманганатом и роданировании двойных связей R_f кислот возрастали, а при галоидировании бромистым иодом — снижались^{252, 253}. Подвижность ненасыщенных кислот увеличивалась после бром-ацетокси- и бром-метоксилирования с N-бромсукцинидом, а также после образования АОММО-производных «бромазонов» этих кислот. Диастереоизомеры бром-ацетокси- и метокси-производных полиненасыщенных кислот образуют по 2 зоны на хроматограмме^{136, 139, 254}. Жирные кислоты с одинаковым R_f разделяли путем гидрирования двойных связей с образованием соответствующих насыщенных кислот более низкой полярности^{15, 125}. В одних случаях кислоты разделяли до и после гидрирования с окисью палладия на сульфате бария в этаноле¹⁹⁷ или с окисью платины по Адамсу в уксусной кислоте¹²⁶. Если в липидах существует пальмитолеиновая кислота, то гидрируют не общую смесь кислот, а фракцию, содержащую пальмитолеиновую, миристиновую и линоловую кислоты; продукты гидрирования разделяют повторно^{191, 224, 255}. В других случаях гидрирование проводили непосредственно на бумаге (см. раздел III, 3), а затем разделяли гидрированные и негидрированные смеси^{256—259}. Для определения линоленовой и α -элеостеариновой кислот, совпадающих по R_f , получают аддукты элеостеариновой кислоты с малениновым ангидридом в присутствии иода, смесь кислот гидрируют и разделяют повторно^{260, 261}. Карбонильные группы липидов восстанавливают раствором борогидрида натрия в тетрагидрофуране²⁶². Для определения кислот одинаковой полярности применяли также низкотемпературную хроматографию (см. раздел III, 4, Г) и реакцию двойных связей с солями ртути (см. раздел III, 4, Д, а).

Таким образом, правило полярности вносит значительные трудности в проведение анализа липидов. С другой стороны, расшифровка сложных смесей, например смесей триглицеридов, где фракция определенной полярности может содержать 6, 7 и более компонентов, подчас сильно облегчается благодаря тому, что липиды известного строения приурочены к данной хроматографической зоне на основе строгой закономерности.

Обращенно-фазовые системы почти не применяются для фракционирования смеси липидов на классы: различия в полярности столь велики, что разделение в какой-либо одной системе становится невозможным (см. раздел I). Кроме того, липиды из различных классов, характеризуемые различными значениями K , часто совпадают по величине R_f . Так, олеиловый спирт не отделяется от миристиновой кислоты, а диглицериды

накладываются на зону стеариновой кислоты^{192, 208}. Для сопоставления классов по абсолютной величине полярности ввели понятие «всеобщей» константы полярности K_{bc} . Системой отсчета служил гомологический ряд эфиров одноатомных спиртов и алифатических «четных» нормальных кислот: значения K_{bc} и K у них совпадали. Для липидов другого гомологического ряда K_{bc} равна величине K того вещества системы отсчета, которое имеет одинаковое с этим липидом значение R_f . Инкремент i , т. е. разность между K_{bc} и K данного липида, постоянен для определенного ряда. Аддитивная величина i зависит от числа CH_2- , $\text{COOH}-$, OH -групп, двойных или сложноэфирных связей, положения функциональных групп и других факторов. Для триглицеридов значение i равно 14, для сложных эфиров ненасыщенных кислот 12, для 2-оксикислот 10, для сложных эфиров ароматических спиртов 2 и т. д. Такая абсолютная шкала полярности весьма полезна для идентификации липидов по их принадлежности к конкретному гомологическому ряду^{202, 244}.

Можно видеть, что подвижность липидов при разделении зависит от их состава. Связь величины R_f в различных системах с параметрами молекулы описывали эмпирическими уравнениями: $R_f = 1,42 + (-0,062) m$; $R_f = 1 \cdot 671 - 0,1326 m + 0,0028 m^2$; $R_f = 1,50 - 0,0625 m$ для насыщенных жирных кислот или $R_f = 1,42 - (-0,062) \cdot (m - 2)$; $R_f = 1,57 - 0,06 m$ для ненасыщенных кислот^{124, 133, 195}. Зависимость значений R_f от m жирных кислот или их *p*-фенилазофенациловых эфиров была линейной^{32, 201}. Для триглицеридов такой зависимости не обнаружили¹⁵⁰. Величина R_f C_{18} -ненасыщенных кислот была линейной функцией числа двойных связей в цепи¹³⁴.

* * *
*

В настоящее время методы распределительной хроматографии широко используются для разделения липидов природного происхождения. Однако не все эти методы равноценны.

Хроматография на колонках с полярной неподвижной фазой применима для анализа отдельного гомологического ряда алифатических соединений или их полярных производных; для разделения смеси нескольких рядов липидов нужны более современные методы. Анализ липидов на бумаге с полярной неподвижной фазой сейчас отнесен другими видами хроматографии, намного превосходящими его по эффективности разделения. Известный практический интерес может представить применение этой методики к анализу продуктов окисления липидов и к разделению фосфолипидов; следует использовать пропитанную органическими гидрофильными фазами (формальдегид, формамид) или ионообменную бумагу.

Значительно шире распространены обращенно-фазовые системы, которые применяют в колоночной хроматографии для препаративного выделения липидов, в частности липидов с кислородсодержащими функциональными группами в цепи. Не требуя сложного и дорогого оборудования, этот метод позволяет получить в мягких условиях несколько граммов чистого препарата с достаточно высоким выходом. Для аналитического разделения этот вид хроматографии менее пригоден, поскольку для работы нужно несколько десятков mg материала, а сами рабочие операции довольно трудоемки⁸.

Обращенно-фазовая хроматография на стеклянных пластинках в последнее время все чаще используется для аналитического разделения. При сочетании ее с высокоэффективными методами тонкослойной хроматографии, в особенности с разделением на силикагеле, пропитанном

нитратом серебра, липиды определенного класса можно охарактеризовать по величине *t* и *e* по одной пластинке. Возможности препаративного выделения и количественного определения липидов здесь, по-видимому, более ограничены, хотя недавно и появились указания на работы подобного рода¹²³.

Ведущее положение среди других распределительно-хроматографических методов исследования липидов продолжает сохранять обращенно-фазовая хроматография на бумаге. Изменяя состав неподвижной и подвижной фаз, температуру, длительность опыта и другие факторы, сравнительно быстро находят оптимальные условия разделения конкретной смеси липидов. По быстроте разделения (несколько часов) и чувствительности обнаружения липидов (доли микрограмма) хроматография на бумаге в ряде случаев приближается к тонкослойной и газо-жидкостной хроматографии. Для идентификации липидов имеется богатый арсенал качественных реакций, проводимых непосредственно на бумаге. Аналитическое разделение хорошо сочетается с денситометрическим количественным определением и автографическим измерением радиоактивности отдельных зон.

Простота и воспроизводимость разделения — одно из главных преимуществ хроматографии на бумаге: анализ может быть выполнен без значительных затрат труда и денег в каждой лаборатории, оснащенной минимально необходимым оборудованием и реагентами. Данный метод не только очень удобен для быстрой оценки состава отдельных фракций элюата хроматографической колонки, но и сам по себе может быть использован в препаративной технике для выделения липидов в количестве 1—50 мг.

Таким образом, обращенно-фазовая распределительная хроматография на бумаге вполне пригодна для анализа классов и гомологических рядов липидов несложного состава. В целях расшифровки многокомпонентных природных смесей липидов и идентификации отдельных соединений этот метод необходимо сочетать с адсорбционной и газо-жидкостной хроматографией, спектроскопией и другими современными методами анализа липидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. J. P. Martin, Biochem. Soc. Sympos., 3, 4 (1950).
2. L. L. Ramsay, W. Patterson, J. Assoc. Offic. Agric. Chem., 31, 441 (1948).
3. J. Boldingh, Experientia, 4, 270 (1948).
4. G. H. Catravas, Oléagineux, 9, 21 (1954).
5. F. B. Shorland, Annual Rev. Biochem., 25, 101 (1956).
6. R. T. Holman, in D. Glick (ed.), Methods of Biochemical Analysis, vol. IV, N. Y., Interscience, 1957, стр. 99.
7. H. P. Kaufmann, Analyse der Fette u. Fettprodukte, Springer, Berlin, 1958.
8. J. F. Mead, in H. M. Sinclair (ed.), Essential Fatty Acids, Butterworths, L., 1958.
9. J. Asselineau, in E. Lederer (ed.), Chromatographie en chimie organique et biologique, т. I, стр. 441, Masson, Paris, 1960.
10. E. Klenk, H. Debuch, Annual Rev. Biochem., 28, 39 (1959).
11. Č. Michalec, Č. Soběslavský, Chem. listy, 53, 1170 (1959).
12. K. Fontell, R. T. Holman, G. Lambertsen, J. Lipid Res., 1, 391 (1960).
13. G. Rouser, A. J. Bauman, N. Nicolaides, D. Heller, J. Amer. Oil Chem. Soc., 38, 565 (1961).
14. H. Schlenk, J. Gellerman, Там же, 38, 555 (1961).
15. C. V. Viswanathan, B. Meega Bai, U. Sitarama Acharya, Chromatog. Rev., 4, 160 (1962).
16. Ю. К. Шапошников, В. Б. Берлина, Ю. В. Водзинский, Гидролизн. и лесохим. пром., 15, 15 (1962).
17. К. Мацек, Ч. Михалец, в кн.: И. И. Хайс, К. Мацек, Хроматография на бумаге, ИЛ, М., 1962, стр. 230.
18. M. C. Williams, R. Reiseg, J. Amer. Oil Chem. Soc., 40, 237 (1963).
19. А. И. Триппель, Хроматография жиров, Госторгиздат, М., 1963.

20. C. H. Lea, D. N. Rhodes, Biochem. J., **54**, 467 (1953).
21. R. H. Smith, Там же, **57**, 130 (1954).
22. J. Westley, J. J. Wren, H. K. Mitchell, J. Biol. Chem., **229**, 131 (1957).
23. T. Shimojo, A. Yokoyama, K. Ohno, J. Biochem., **51**, 293 (1962).
24. F. D. Collins, V. L. Shotlander, J. Lipid Res., **1**, 352 (1960).
25. J. Davenport, Chem. and Ind., **1955**, 705.
26. W. Lossow, I. L. Chaikoff, Arch. Biochem. Biophys., **57**, 23 (1955).
27. W. Lossow, I. L. Chaikoff, J. Biol. Chem., **230**, 149 (1958).
28. H. Van Duin, Biochim. biophys. acta, **10**, 198 (1953).
29. H. J. Nijkamp, Analyt. chim. acta, **10**, 448 (1954).
30. V. Zbinovskiy, Analyt. Chem., **27**, 764 (1955).
31. H. Ng, A. Webb, R. Kerpner, Там же, **28**, 1975 (1956).
32. R. Kerpner, A. Webb, R. King, A. Bond, Там же, **29**, 1162 (1957).
33. D. Chobanov, Докл. Болг. АН, **14**, 155 (1961).
34. G. Fenech, Atti soc. pelorit. sci fis. mat. e natur., **1**, 27 (1955).
35. P. Desnuelle, M. Burnet, Bull. Soc. chim. France, **1956**, 268.
36. D. Chobanov, A. Popov, I. Mitzev, C. r. Acad. Bulg. Sci., **14**, 463 (1961).
37. M. H. Chahine, E. Cousins, R. Feuge, J. Am. Oil Chem. Soc., **35**, 396 (1958).
38. C. G. Youngs, Там же, **38**, 62 (1961).
39. H. van Duin, Biochim. biophys. acta, **12**, 489 (1953).
40. H. van Duin, Там же, **9**, 580 (1952).
41. M. vanden Tempel, P. De Bruyne, A. P. J. Mank, Rec. trav. chim., Pays-Bas, **81**, 1075 (1962).
42. H. P. Kaufmann, J. Budwig, E. Duddekk, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **53**, 285 (1951).
43. H. P. Kaufmann, J. Budwig, Там же, **53**, 390 (1951).
44. H. P. Kaufmann, J. Budwig, C. W. Schmidt, Там же, **53**, 408 (1951).
45. H. P. Kaufmann, J. Budwig, C. W. Schmidt, Там же, **54**, 10 (1952).
46. H. P. Kaufmann, J. Budwig, C. W. Schmidt, Там же, **54**, 73 (1952).
47. H. P. Kaufmann, J. Budwig, Там же, **54**, 348 (1952).
48. J. Asselineau, Bull. Soc. chim. France, **1952**, 884.
49. P. Savary, Bull. Soc. chim. biol., **36**, 927 (1954).
50. P. M. Мирзакаримов, А. М. Якубов, Докл. АН УзССР, **1958**, № 3, 29.
51. J. Moretti, J. Polonovski, Bull. Soc. chim. France, 1954, 935.
52. K. Winsauer, Mikrochim. acta, **1957**, 480.
53. A. Seher, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **58**, 401 (1956).
54. K. Fink, R. M. Fink, Proc. Soc. Exptl Biol. Med., **70**, 654 (1949).
55. Y. Inouye, M. Noda, J. Agric. Chem. Soc. Japan, **18**, 294 (1950).
56. Y. Inouye, M. Noda, Там же, **24**, 295 (1951).
57. Y. Inouye, M. Noda, Там же, **25**, 161 (1951).
58. Y. Inouye, M. Noda, Там же, **25**, 491 (1952).
59. H. P. Kaufmann, A. Szakall, J. Budwig, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **53**, 406 (1951).
60. H. P. Kaufmann, J. Budwig, Там же, **54**, 156 (1952).
61. H. P. Kaufmann, J. Budwig, C. W. Schmidt, Там же, **55**, 85 (1953).
62. W. C. Curtis, J. H. Seipel, J. Neurochem., **6**, 318 (1961).
63. T. H. Bevan, G. Gregory, T. Malkin, A. Poole, J. Chem. Soc., **1951**, 841.
64. A. Amelung, P. Böhm, Ztschr. physiol. Chem., **298**, 199 (1954).
65. F. M. Huennekens, D. J. Hanahan, M. Uziel, J. Biol. Chem., **206**, 443 (1954).
66. G. V. Marinetti, E. Stotz, Biochim. biophys. acta, **21**, 168 (1956).
67. R. O. Mumma, A. A. Benson, Biochem. Biophys. Res. Comm., **5**, 422 (1961).
68. A. Holasek, K. Winsauer, Monatsh. Chem., **85**, 796 (1954).
69. J. Chuřáček, Microchim. acta, **1961**, 65.
70. B. F. C. Clark, J. Chromatogr., **5**, 368 (1961).
71. H. Wagner, L. Hörrhammer, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **62**, 1115 (1960).
72. H. Wagner, Там же, **63**, 1119 (1961).
73. H. Wagner, J. Hözl, A. Lissau, L. Hörrammer, Biochem. Z., **339**, 34 (1963).
74. E. H. Strickland, A. A. Benson, Arch. Biochem. and Biophys., **88**, 344 (1960).
75. F. Nakayama, R. Blomstrand, Acta chem. scand., **15**, 1595 (1961).
76. G. A. Howard, A. J. P. Martin, Biochem. J., **46**, 532 (1950).
77. F. D. Gunstone, P. J. Sykes, J. Sci. Food and Agric., **12**, 115 (1961).
78. M. A. Buchanan, Anal. Chem., **31**, 1616 (1959).
79. F. D. Gunstone, P. J. Sykes, J. Chem. Soc., **1960**, 5050.
80. G. A. Garton, A. R. Lough, Biochim. biophys. acta, **23**, 192 (1957).
81. J. Gellermann, H. Schlenk, Experientia, **15**, 387 (1959).
82. F. Vandenhuevel, D. Vatcher, Anal. Chem., **28**, 838 (1956).
83. Ø. S. Privett, E. C. Nickell, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 189 (1963).

84. B. C. Blank, E. G. Hammond, Там же, **40**, 575 (1963).
85. P. Savary, P. Desnuelle, Bull. Soc. chem. France, **1954**, 936.
86. J. Boldingh, Rec. trav. chim., Pays-Bas, **69**, 247 (1950).
87. K. Hofmann, Chao-Ling Yuan Hsiao, D. B. Henis, C. Panos, J. Biol. Chem., **217**, 49 (1955).
88. Н. И. Погоянкина, В. П. Ржехин, Маслоб.-жир. пром., 1963, № 8, 7.
89. J. van de Kamer, N. Piakaag, A. Bolssens-Frankena, C. Couvee-Ploeg, J. van Ginkel, Biochem. J., **61**, 180 (1955).
90. J. Hirsch, J. Lipid Res., **4**, 1 (1963).
91. T. Green, F. O. Howitt, R. Preston, Chem. and Ind., **1955**, 591.
92. V. Tišler, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **60**, 95 (1958).
93. A. C. Kibrick, S. Skupper, Analyt. Chem., **31**, 2057 (1959).
94. R. J. Hall, J. Chromatog., **5**, 93 (1961).
95. S. H. Mai, Federat. Proc., **10**, 388 (1951).
96. M. Silk, H. Hahn, Biochem. J., **56**, 406 (1954).
97. J. F. Mead, J. Biol. Chem., **227**, 1025 (1957).
98. M. Matic, Biochem. J., **68**, 692 (1958).
99. W. M. L. Crombie, R. Comber, S. Boatman, Там же, **59**, 309 (1956).
100. A. Arcus, Anal. Chem., **31**, 1618 (1959).
101. G. Popjak, A. Tietz, Biochem. J., **56**, 46 (1954).
102. W. Kapitel, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **58**, 91 (1956).
103. J. F. Mead, D. R. Howton, J. Biol. Chem., **229**, 575 (1957).
104. A. Lough, G. Garton, Biochem. J., **67**, 345 (1957).
105. J. Asselineau, Chim. anal., **39**, 375 (1957).
106. H. P. Kaufmann, Z. Makus, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **62**, 1014 (1960).
107. H. P. Kaufmann, Z. Makus, T. H. Khoe, Там же, **63**, 689 (1961).
108. H. P. Kaufmann, T. H. Khoe, Там же, **64**, 81 (1962).
109. Л. Д. Бергельсон, Э. В. Дятловицкая, В. В. Воронкова, Изв. АН СССР, ОХН, **1963**, 954.
110. H. P. Kaufmann, Z. Makus, B. Das, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **63**, 807 (1961).
111. H. P. Kaufmann, Young Su Ko, Там же, **63**, 828 (1961).
112. H. P. Kaufmann, Z. Makus, T. H. Khoe, Там же, **64**, 1 (1962).
113. H. P. Kaufmann, B. Das, Там же, **64**, 214 (1962).
114. H. P. Kaufmann, B. Das, Там же, **65**, 398 (1963).
115. H. P. Kaufmann, C. V. Viswanathan, Там же, **65**, 607 (1963).
116. Č. Michalec, Z. Kolman, M. Šulc, J. Meštan, J. Chromatog., **9**, 237 (1962).
117. C. Michalec, Nature, **193**, 63 (1962).
118. H. P. Kaufmann, Z. Makus, F. Deicke, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **63**, 235 (1961).
119. H. P. Kaufmann, C. V. Viswanathan, Там же, **65**, 538 (1963).
120. H. P. Kaufmann, C. V. Viswanathan, Там же, **65**, 925 (1963).
121. D. C. Malins, H. K. Mangold, J. Amer. Oil Chem. Soc., **37**, 576 (1960).
122. А. А. Ахрем, А. И. Кузнецова, Усп. химии, **32**, 823 (1963).
123. H. P. Kaufmann, H. Wessels, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **66**, 13 (1964).
124. V. Kobrle, K. Zahradník, Chem. listy, **48**, 1189 (1954).
125. H. Schlenk, J. L. Gellerman, J. A. Tillotson, H. K. Mangold, J. Amer. Oil Chem. Soc., **34**, 377 (1957).
126. P. E. Ballance, W. M. Crombie, Biochem. J., **69**, 632 (1958).
127. V. Skipski, S. Arfin, M. Rapport, Arch. Biochem. and Biophys., **87**, 259 (1960).
128. E. H. Steiner, A. R. Bonar, J. Sci. Food and Agric., **12**, 247 (1961).
129. S. Fíker, V. Hajek, Chem. listy, **52**, 549 (1958).
130. H. Grynpberg, H. Szczepanska, M. Beldowitz, Oléagineux, **17**, 875 (1962).
131. H. P. Kaufmann, H. Schnurbusch, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 523 (1959).
132. H. P. Kaufmann, Z. Makus, Там же, **61**, 631 (1959).
133. A. Cucurachi, A. Strusi, Ann. sperim. agrar., **1960**, 14, Suppl. CLVII.
134. M. Jáky, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 6 (1959).
135. H. P. Kaufmann, B. Das, Там же, **63**, 614 (1961).
136. A. Jovtscheff, A. Popoff I. Micev, S. Spassow, Там же, **65**, 913 (1963).
137. G. Gorbach, C. Weber, Там же, **65**, 989 (1963).
138. D. Watanabe, S. Kochi, Repts. Fac. Engng Yamanashi Univ., **1956**, 121.
139. O. Hirayama, Y. Inouye, J. Agric. Chem. Soc. Japan, **35**, 135, 138 (1961).
140. А. И. Триппель, Изв. высш. учи. завед., пищ. техн., **1958**, № 4, 156.
141. Е. К. Алимова, Г. Д. Болгова, О. И. Пустовойтова, Биохимия, **25**, 773 (1960).
142. Е. К. Алимова, А. Т. Астафатурьян, Э. А. Эндакова, В. А. Степанова, Ж. аналит. химии, **18**, 769 (1963).

143. И. К. Сарычева, М. Н. Варгатик, О. В. Уткина, Н. А. Преображенский, ЖХХ, **30**, 1048 (1960).
144. В. А. Высоцкий, Э. Я. Попова, Маслоб.-жир. пром., **1961**, № 9, 21.
145. Н. В. Сергеева, Науч. докл. высш. школы, биол. н., **1963**, № 2, 157.
146. А. А. Фомин, Н. А. Федоров, Ю. Н. Касаткин, Вопр. мед. химии, **9**, 76 (1963).
147. Н. В. Воробьев, Маслоб.-жир. пром., **1963**, № 11, 23.
148. Е. К. Алимова, Г. Д. Болгова, Биохимия, **22**, 568 (1957).
149. W. M. Connors, W. K. Voak, Tobacco Sci., **7**, 4 (1963).
150. H. P. Kaufmann, Z. Makus, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **63**, 125 (1961).
151. R. G. Baker, Biochem. J., **54**, XXXIX (1953).
152. F. Micheel, H. Schweppen, Mikrochim. acta, **1954**, 53.
153. F. Micheel, H. Schweppen, Angew. Chemie, **66**, 136 (1954).
154. Y. Inouye, M. Noda, J. Agric. Chem. Soc. Japan, **26**, 634 (1952).
155. H. Wagner, L. Abisch, K. Bernhard, Helv. chim. acta, **38**, 1536 (1955).
156. H. P. Kaufmann, W. Nitsch, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **56**, 154 (1955).
157. H. P. Kaufmann, W. Nitsch, Там же, **57**, 473 (1955).
158. H. P. Kaufmann, W. Nitsch, Там же, **58**, 234 (1956).
159. H. P. Kaufmann, E. Mohr, Lab. scient., **6**, 41 (1958).
160. E. Leibnitz, W. Herrmann, W. Hager, G. Heinze, R. Kaiser, O. Mittelstaedt, H. Moll, H. Schlieff, J. prakt. Chem., **4**, 244 (1957).
161. A. Nowotny, O. Lüderitz, O. Westphal, Biochem. Z., **330**, 47 (1958).
162. O. Hirayama, Y. Inouye, J. Agric. Chem. Soc. Japan, **35**, 367, 372, 441 (1961).
163. M. Noda, O. Hirayama, J. Japan. Oil Chem. Soc., **10**, 24 (1961).
164. J. Zajic, L. Forman, Sb. Vysoke skoly chem.-technol. Praze. Potravin. technol., **5**, 192 (1961).
165. Б. П. Смирнов, Р. А. Попова, Р. А. Нисканен, Биохимия, **25**, 368 (1960).
166. И. Г. Борисова, Е. В. Будницкая, Там же, **28**, 497 (1963).
167. P. Ceccaldi, P. Wegman, J. Biez-Charreton, Bull. Soc. chim. biol., **36**, 415 (1954).
168. B. Ashley, U. Westphal, Arch. Biochem. and Biophys., **56**, 1 (1955).
169. J. Pokorný, Rozhl. tuberk. a nemocech plícních, **16**, 484 (1956).
170. F. Franks, Analyst, **81**, 384 (1956).
171. T. Barnabas, J. Barnabas, Naturwiss., **44**, 281 (1957).
172. H. P. Kaufmann, H. Wessels, C. V. Viswanathan, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **64**, 509 (1962).
173. C. V. Viswanathan, B. Meera Bai, J. Chromatog., **6**, 264 (1961).
174. V. Wollrab, M. Streibl, Coll. Czechoslov. Chem. Commun., **28**, 1895 (1963).
175. J. Spiteri, Bull. Soc. chim. biol., **36**, 1355 (1954).
176. B. Л. Пустовалов, Биохимия, **20**, 730 (1955).
177. Y. Inouye, M. Noda, J. Agric. Chem. Soc. Japan, **27**, 50 (1953).
178. Y. Inouye, M. Noda, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, **19**, 214 (1955).
179. Y. Inouye, M. Noda, O. Hirayama, J. Amer. Oil Chem. Soc., **32**, 132 (1955).
180. Y. Inouye, O. Hirayama, M. Noda, J. Japan. Oil Chem. Soc., **5**, 16 (1956).
181. Y. Inouye, O. Hirayama, M. Noda, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, **20**, 197, 200 (1956).
182. Y. Inouye, M. Noda, Arch. Biochem. and Biophys., **76**, 271 (1958).
183. Y. Inouye, M. Noda, J. Agric. Chem. Soc. Japan, **33**, 452 (1959).
184. G. Schmidt, Naturwiss., **45**, 41 (1958).
185. K. Röth, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **59**, 418 (1957).
186. G. Nunez, J. Spiteri, Bull. Soc. chim. biol., **35**, 851 (1953).
187. J. Horáček, V. Kobrle, Dermatol. Wochenschr., **132**, 1053 (1953).
188. H. P. Kaufmann, E. Mohr, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **60**, 165 (1958).
189. D. K. Chowdhury, R. N. Mukherjee, Nahrung, **7**, 111 (1963).
190. T. Miyakawa, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 850 (1959).
191. H. P. Kaufmann, R. Guldenkennig, Там же, **63**, 353 (1961).
192. H. P. Kaufmann, H. Kohlmeier, Там же, **57**, 231 (1955).
193. M. Jáky, Там же, **58**, 721 (1956).
194. H. P. Kaufmann, R. K. Sud, Там же, **62**, 160 (1960).
195. F. Baykut, S. Baykut, Rev. Fac. Sci. univ. Istanbul. Ser. C22, 267 (1957).
196. H. P. Kaufmann, J. Pollerberg, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **39**, 815 (1957).
197. H. P. Kaufmann, A. A. Karabatur, Nahrung, **2**, 61 (1958).
198. Z. Kwapniewski, J. Sliwiok, Riv. ital. sostanze grasse, **40**, 11 (1963).
199. H. P. Kaufmann, M. Aparicio, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 768 (1959).
200. H. P. Kaufmann, M. M. Deshpande, Там же, **60**, 645 (1958).
201. H. P. Kaufmann, Z. Makus, Там же, **62**, 153 (1960).
202. H. P. Kaufmann, Young Su Ko, Там же, **64**, 434 (1962).
203. W. Awe, B. Grote, Там же, **60**, 806 (1958).

204. H. P. Kaufmann, H. Hennig, Там же, **63**, 908 (1961).
 205. J. Gellerman, H. Schlenk, Experientia, **12**, 342 (1956).
 206. H. P. Kaufmann, G. Kessen, Hoppe-Seylers' Ztschr. physiol. Chemie, **317**, 43 (1959).
 207. R. Chayen, E. M. Lindsay, J. Chromatog., **3**, 503 (1960).
 208. A. Holasek, J. Fries, Mikrochim. acta, **1957**, 469.
 209. D. Halama, Č. Michalec, J. Chromatog., **12**, 374 (1963).
 210. H. P. Kaufmann, H. Kirschneck, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 750 (1959).
 211. H. P. Kaufmann, H. Kirschneck, Там же, **61**, 1119 (1959).
 212. M. Jáky, Nahrung, **4**, 1123 (1960).
 213. Č. Michalec, Biochim. et biophys. acta, **28**, 212 (1958).
 214. V. Komán, E. Kománová, Chem. zvesti, **15**, 496 (1961).
 215. M. Jáky, Elelm. ipar, **11**, 148 (1957).
 216. D. K. Chowdhury, Nahrung, **4**, 17 (1960).
 217. Z. Kwapniewski, J. Sliwiok, Tłuszcze i Środki Piorace, **5**, 296 (1961).
 218. Z. Kwapniewski, J. Sliwiok, Nahrung, **6**, 410 (1962).
 219. Z. Kwapniewski, J. Sliwiok, Riv. Ital. sostanze grasse, **40**, 181 (1963).
 220. H. K. Mangold, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 877 (1959).
 221. H. P. Kaufmann, J. Budwig, Там же, **53**, 69 (1951).
 222. R. Otto, Atompraxis, **7**, 209 (1961).
 223. J. Gracian, E. Vioque, M. Maza, Nature, **184**, 1941 (1959).
 224. H. P. Kaufmann, H. Schnurbusch, Z. E. Schoeb, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **62**, 1 (1960).
 225. H. P. Kaufmann, J. Budwig, Там же, **52**, 555 (1950).
 226. H. J. M. Hansen, Acta chem. scand., **17**, 139 (1963).
 227. A. Seher, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **58**, 498 (1956).
 228. A. Seher, Там же, **61**, 855 (1959).
 229. H. P. Kaufmann, Там же, **58**, 492 (1956).
 230. H. P. Kaufmann, M. Deshpande, Там же, **60**, 537 (1958).
 231. M. Novak, V. Hromadková, Nahrung, **3**, 1060 (1959).
 232. A. Hlynaczak, J. Susa, T. Toczyński, A. Horbacewicz, Biochem. Ztg., **334**, 357 (1961).
 233. O. Perilä, Acta chem. scand., **10**, 143 (1956).
 234. M. Jáky, K. Kaffka, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **62**, 682 (1960).
 235. H. Sulser, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., **50**, 275 (1959).
 236. J. Fries, A. Holasek, H. Lieb, Mikrochim. acta, **1956**, 1722.
 237. J. Barrollier, Naturwiss., **44**, 428 (1957).
 238. W. Awe, B. Grote, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 1 (1959).
 239. H. P. Kaufmann, J. Budwig, Там же, **53**, 253 (1951).
 240. M. F. Abdel-Wahab, A. El Kinawi Saad, Ztschr. analyt. Chem., **184**, 40 (1961).
 241. H. P. Kaufmann, H. Schnurbusch, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **60**, 1046 (1958).
 242. H. P. Kaufmann, J. Budwig, Там же, **54**, 7 (1952).
 243. L. L. Sulya, R. R. Smith, Biochem. Biophys. Res. Commun., **2**, 59 (1960).
 244. H. P. Kaufmann, B. Grothues, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **63**, 1021 (1961).
 245. H. Kutt, D. Lockwood, F. McDowell, Stain Technol., **34**, 203 (1959).
 246. K. Talluto, R. Benerito, W. Singleton, Anal. Chem., **30**, 1059 (1958).
 247. H. P. Kaufmann, G. Walther, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 782 (1959).
 248. H. P. Kaufmann, Z. Makus, Hoppe-Seylers Ztschr. physiol. Chemie, **377**, 39 (1959).
 249. H. P. Kaufmann, F. J. Büscher, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **62**, 1141 (1960).
 250. H. P. Kaufmann, H. Wessels, Там же, **62**, 1020 (1960).
 251. M. Aparicio, Grasas y aceites, **12**, 109 (1961).
 252. V. Kobrle, K. Zahradník, Chem. listy, **48**, 1703 (1954).
 253. H. P. Kaufmann, M. Arens, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **60**, 803 (1958).
 254. A. Jovtscheff, A. Popoff, C. r. Acad. Bulg. Sci., **13**, 319 (1960).
 255. H. P. Kaufmann, Z. E. Schoeb, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **63**, 609 (1961).
 256. H. P. Kaufmann, D. K. Chowdhury, Chem. Ber., **91**, 2117 (1958).
 257. D. K. Chowdhury, K. S. Chandra, S. Mukherji, Nahrung, **3**, 252 (1959).
 258. N. Yamamoto, T. Miyakawa, Bull. Govt. Industr. Res. Inst. Osaka, **12**, 319 (1961).
 259. N. Yamamoto, T. Miyakawa, J. Japan. Oil Chem. Soc., **10**, 200 (1961).
 260. D. K. Chowdhury, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 924 (1959).
 261. D. K. Chowdhury, K. S. Chandra, B. K. Mukherji, Nahrung, **4**, 230 (1960).
 262. H. P. Kaufmann, H. J. Hennig, Mikrochim. acta, **1961**, 333.