

# ВИБІР МЕТОДУ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

І. М. ПЕРЦЕВ, І. В. КРАСОВСЬКИЙ, Г. П. ПІВНЕНКО

(Харківський фармацевтичний інститут)

## ПОВІДОМЛЕННЯ І

### І. М. С. Цвет — творець хроматографічного методу

Минає 60 років відтоді, як М. С. Цвет 21(8) березня 1903 р. доповів на засіданні біологічного відділення Варшавського товариства природознавців про основний принцип і техніку хроматографії. Його доповідь того ж року була надрукована в працях Товариства під назвою «Про нову категорію адсорбційних явищ і про застосування їх до біологічного аналізу». Отже, 1903 р.\* є датою виникнення нового фізико-хімічного методу аналізу, оснований на вибірній сорбції однієї або кількох речовин з розчину.

Хроматографічний метод, як і більшість визначених відкриттів, не відразу здобув загальне визнання. Його почали широко застосовувати тільки в 30-х роках, після того, як методом Цвета пощастило виділити у кристалічному вигляді  $\alpha$ - та  $\beta$ -каротин з сирого каротину (4), а також ксантофіли лутеїн і зеаксантин з яєчного жовтка (5) і, таким чином, продемонструвати препаративну цінність методу.

Тепер метод хроматографії переживає період незвичайно бурхливого розвитку і застосовується не тільки в препаративній лабораторній практиці, але чимраз більше проникає у промисловість.

Особливо великою є роль цього методу в неорганічній, органічній та біологічній хімії, а також у фізіології та медицині. Блискучим прикладом можуть служити дивовижні успіхи, досягнуті за останні 20—30 років у хімії вітамінів, гормонів, ензимів, в аналізі найскладніших природних штучних сумішей органічних речовин. Широке застосування хроматографічний метод одержав також і в фармацевтичному аналізі.

Проте останнім часом деякі американські й англійські вчені зробили спроби применшити заслуги Цвета у відкритті хроматографічного аналізу. М. М. Дубинін (6) і Б. Я. Свешніков (7) показали всю неспроможність і необґрунтованість цих тверджень. Іноземні вчені Гоппельшредер, Шейбен та ін. у кращому разі тільки реєстрували окремі факти, але не зуміли зрозуміти всього значення спостережуваних явищ і не створили нового наукового методу, яким є хроматографія. Честь створення її неподільно належить М. С. Цветові.

Для дальшого розвитку хроматографічного аналізу велике значення мали роботи, виконані в галузі адсорбції М. Д. Зелінським, М. О. Шиловим, М. М. Дубиніним, Л. К. Лепінь, К. В. Чмутовим, О. Н. Фрумкіним, М. Л. Чепелевецьким, Классоном, Вільсоном, Куном, Вінтерштейном, Мартіном, Сінджем та багатьма іншими дослідниками, які дали основний фактичний матеріал у цій галузі.

Тепер хроматографічний метод аналізу успішно конкурує з іншими методами фізико-хімічного дослідження, що застосовувалися раніше. В деяких випадках йому можна віддати перевагу навіть перед таким тонким методом, як спектральний.

Хроматографічний аналіз є тоншим порівняно з методами поділу сумішей, побудованими на різниці в тиску пари та розчинності. Методи, основані на цих властивостях (екстракція, перегонка, фракціонування, перегонка, осадження тощо), мають свої позитивні якості і вади (8). Так, екстракція дозволяє одержати дуже чисті продукти, але екстрагується порівняно обмежений асортимент речовин.

\* В іноземній літературі (1) датою створення хроматографічного методу неправильно вважають 1906 р., коли М. С. Цвет опублікував дві своїх роботи німецькою мовою (2, 3).



Перегонку можна практично використати для поділу більш-менш летких сполук, які досить сильно відрізняються пружністю парів.

Процес осадження придатний також не для всіх речовин, та й чистота одержуваних продуктів не завжди висока через ряд побічних процесів (співосадження та ін.), (9).

Дослідження вищевказаними методами часто приводить під час ходу процесу до зміни складу виучуваних речовин, тим часом як при хроматографічному методі хімічних змін практично не відбувається (10), а технічні прийоми його вражають своєю простотою і великою ефективністю в разі поділу органічних речовин, які мало відрізняються одна від одної своїми фізико-хімічними властивостями.

Найважливіші проблеми, розв'язувані за допомогою цього методу, такі (11):

- 1) поділ складної суміші на її компоненти;
- 2) визначення ступеня однорідності хімічних сполук; очищення від домішок;
- 3) виділення речовин з дуже різноманітних розчинів;
- 4) визначення ідентичності двох речовин і контроль технічних продуктів;
- 5) кількісне визначення одного або кількох компонентів складної суміші;
- 6) визначення молекулярної структури.

Тепер є дуже велика література з хроматографії, що належить здебільшого до методики роботи та практичного застосування методу (1, 10 — 16).

Це повідомлення присвячується питанню про вибір методу хроматографічного дослідження, який в літературі висвітлено дуже мало, а також стислій характеристиці різних методик.

Перш ніж починати хроматографічний поділ суміші перед кожним експериментатором виникає питання, який з усіх численних варіантів хроматографічного дослідження в даному конкретному випадку є найбільш придатним. Правильне розв'язання його має винятково важливе значення, бо заощадить час, який звичайно витрачається на безсистемні шукання методу хроматографічного поділу, і дасть можливість провести дослідження з максимальною простотою і з належною точністю.

Нам здається, що найбільш простими методами є ті, які дають можливість поділити компоненти суміші безпосередньо на хроматографічній колонці, не вимиваючи їх. Після поділу стовпця на відповідні зони визначають кожну речовину окремо.

Якщо це неможливо зробити, то доводиться вдатися до складніших способів — якісного і кількісного визначення компонентів суміші в процесі вимивання їх з хроматографічної колонки.

Цілком зрозуміло, що в окремих випадках може бути доцільнішим який-небудь спеціальний метод хроматографічного дослідження, що не належить до двох вказаних груп. Якщо не треба нагромаджувати чималу кількість речовин, а зробити тільки якісне і кількісне визначення їх, то найзручніше використати метод хроматопластинок і паперову хроматографію.

Ми вважаємо, що найбільш правильним з погляду методики є такий підхід до цього питання.

## 2. Аналіз хроматографічного стовпця

а) *Поділ забарвлених компонентів.* Найпростішим випадком хроматографічного аналізу є поділ забарвлених компонентів.

При хроматографуванні забарвлених речовин на адсорбенті білого кольору хроматограма, що утворилася, являє собою серію розташованих у певному порядку кольорових зон. Візуальне дослідження її дає орієнтовне уявлення про якісний склад досліджуваної суміші. Можна



виявити, наприклад, чи містить досліджуваний розчин одну речовину, чи суміш речовин.

Кількісне дослідження колонкової хроматограми досить утруднене. На практиці часто використовують спосіб, запропонований ще М. С. Цвєтом, який полягає в тому, що стовпчик адсорбенту виштовхують з колонки і розрізають на окремі частини, які відповідно кількісно аналізують на вміст речовин одним з фізичних або хімічних методів.

Кількісний аналіз хроматограм доцільно провадити лише тоді, коли можна здійснити цілковитий поділ суміші і хроматограма складається з серії окремих зон, що не перекриваються.

б) *Виявлення безбарвних речовин.* Великі утруднення виникають, коли доводиться мати справу з хроматограмами безбарвних речовин. У цьому разі виявляти зони можна кількома способами.

Емпіричний розтин колонки і послідовне вимивання окремих компонентів суміші. Окремо зібрані фракції розчину аналізують фізичним, хімічним або біологічним методом. Цей спосіб дуже копіткий, потребує багато часу й праці. Але, встановивши співвідношення між положенням на колонці і кількістю адсорбованого матеріалу, можна поділити безбарвні речовини майже так само точно, як і забарвлені.

Освітлення хроматографічної колонки ультрафіолетовим промінням.

Якщо поділювані речовини флуоресціюють в ультрафіолетовому світлі, розташування зон у колонці можна побачити, опромінюючи її ультрафіолетовим промінням.

За допомогою ультрахіміоскопа \* спостерігають флуоресценцію речовин, збуджувану короткохвильовим ультрафіолетовим промінням, без застосування флуоресціюючих екранів. Використовуючи різну апаратуру для збудження флуоресценції досліджуваних речовин, треба добирати ультрафіолетове проміння з довжинами хвиль, які відповідають максимумам спектрів збудження флуоресціюючих речовин. Якщо потрібне ультрафіолетове проміння з довжиною хвилі  $\approx 365$  мμ, в хроматографічній практиці звичайно користуються ртутною лампою «ПРК-4» з світлофільтром Вуда.

Іноколи забарвлення хроматограми в ультрафіолетовому світлі інше, ніж при денному освітленні, завдяки чому можна ще точніше визначати розташування зон.

Тепер спостереження в ультрафіолетовому світлі є основним методом адсорбційного аналізу безбарвних циклічних вуглеводнів і багатьох інших речовин і цінним додатком під час контролю технічних продуктів і очищення їх від домішок.

Іноді в хроматографічній практиці можна поділити безбарвні речовини, нездатні до флуоресценції. У цьому разі до адсорбенту додають індикатор, який флуоресціює в ультрафіолетовому промінні. У тих місцях, де адсорбувалися речовини, флуоресценція не відбувається (гасіння флуоресценції), бо ультрафіолетове проміння не проходить до флуоресціюючої поверхні (18).

Є. М. Брумберг запропонував, поділяючи безбарвні речовини на колонці, додавати до адсорбенту невелику кількість порошку (люмінофору), здатного до флуоресценції під впливом ультрафіолетового проміння (19). При цьому відпадає потреба мати цілий набір світлофільтрів; крім того, цей варіант передбачає можливість вибору люмінофору, збуджуваного промінням потрібної довжини хвилі. Вводячи в колонку суміш кількох люмінофорів, які відрізняються кольором флуоресценції,

\* Ультрахіміоскоп, сконструйований Є. М. Брумбергом у лабораторії акад. С. І. Вавілова, набагато полегшує застосування ультрафіолетового проміння у хроматографічній практиці і докладно описаний у багатьох журнальних статтях і збірниках (17).



можна одержати чіткіші зони безбарвних речовин. Треба, щоб адсорбент не поглинав ультрафіолетового проміння таких довжин хвиль, які використовуються для збудження люмінофору, і люмінофор не повинен мати помітних адсорбційних властивостей.

Поглинання безбарвними речовинами спектра ультрафіолетової області. Аналіз провадять аналогічно описаному вище. Під час опромінення колонки ультрафіолетовим світлом на суцільному флуоресціюючому фоні помітні темні зони (20), які відповідають місцям адсорбованих речовин.

Цей метод дозволяє легко визначити місцезнаходження на хроматографічній колонці багатьох органічних сполук (фенолів, фенолкарбонових кислот, пуринових або піридинових основ, вітамінів, ароматичних амінокислот та інших речовин, які містять бензольні кільця, ланцюги конденсованих зв'язків або групи:  $-\text{NO}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $=\text{CO}$ ), що поглинають ультрафіолетове проміння.

Особливо зручно стежити за появою речовини, яка поглинає ультрафіолетове проміння, на виході з хроматографічної колонки (21). Для цього до нижньої частини колонки приєднують маленьку плоску камеру з кварцу з паралельними вікнами, яку вміщують між світлофільтром і флуоресціюючим екраном ультрахіміоскопа. Це пристосування дає змогу користуватися непрозорим в ультрафіолеті адсорбентом.

Поглинання ультрафіолетового проміння в хроматограмі можна також виявити за допомогою фотографування колонки в ультрафіолетовому промінні (19).

Флуоресцентні способи хроматографії дуже чутливі. Чутливість ця значно збільшується при зростанні яскравості джерела світла і збільшенні відповідності між довжинами хвиль проміння, що використовується для збудження флуоресценції хроматограми, і спектрами поглинання флуоресціюючих речовин (17).

Основним недоліком флуоресціюючого способу аналізу хроматограм є його обмежена застосовність, бо флуоресціюючих речовин і флуоресціюючих реакцій значно менше, ніж кольорових.

Вимірювання діелектричних сталей. Аналіз хроматограм безбарвних речовин можна здійснювати вимірюванням діелектричних сталей окремих ділянок хроматографічної колонки (22). Проте цей метод поки що не набув великого поширення, мабуть, через технічну складність.

Методи кольорових індикаторів. Невидимі зони можна виявляти проявленням хроматограми спеціально добрими індикаторами, які дають кольорові реакції з досліджуваними речовинами. Цей спосіб придатний тоді, коли візуальне спостереження за поділенням компонентів досліджуваної суміші, а також в ультрафіолеті виключене через те, що компоненти не забарвлені і не здатні до флуоресценції.

Якщо встановлено можливість поділу досліджуваної суміші безбарвних речовин, то виявляти зони можна поза хроматографічною колонкою. Для цього на неушкоджену поверхню виштовхнутого з трубки стовпчика адсорбенту, що містить проявлену хроматограму, наносять пензликом \* поздовжні смуги відповідного індикатора, який дає кольорові реакції з речовинами, що входять до складу суміші. Цей метод дає можливість зберегти речовини незмінними для кількісного визначення або інших препаративних цілей. Проте істотною вадою його є те, що він не дозволяє стежити за поділом суміші речовин у колонці.

У багатьох випадках, аналізуючи безбарвні речовини, обробляють відповідним реактивом не досліджувану суміш речовин, а адсорбент. Так, наприклад, Мартін і Сіндж (23), поділяючи амінокислоти, насичу-

\* Відповідний реагент (індикатор) можна наносити на стовпчик адсорбенту пульверизатором, зробленим із скла.



вали адсорбент індикатором, який змінював своє забарвлення залежно від рН середовища, і візуально спостерігали розташування амінокислот у хроматографічній колонці. Добираючи відповідний індикатор, слід звертати увагу, щоб він адсорбувався сильніше, ніж перша-ліпша речовина досліджуваної суміші.

Дальший за складністю метод той, за яким безбарвні речовини, що їх треба піддати хроматографічному аналізу, перетворюють на забарвлені і пропускають через колонку у вигляді відповідних похідних. Його часто використовують для поділу альдегідів (20, 23, 24), кетонів, спиртів та інших сполук, що є представниками того самого гомологічного ряду і мають майже однакові властивості. Цей метод дозволяє візуально спостерігати хроматографічний поділ досліджуваної суміші. Недолік його полягає в тому, що перетворення безбарвних речовин в забарвлені пов'язане із збільшенням молекул, що істотно зменшує відмінність в адсорбованості компонентів аналізованої суміші і тим самим утруднює хроматографічний поділ.

Рідше застосовується запропонований М. С. Цветом метод «вставних пігментів», який полягає у додаванні в досліджувану суміш невеликої домішки забарвленої речовини, що займає за своєю адсорбованістю проміжне положення між поділюваними компонентами і служить орієнтиром під час проявлення і розрізування колонки.

**Примітка.** Механічний поділ колонки на частини, які містять окремі речовини, автори цієї роботи провадили розрізуванням виштовхнутого стовпчика адсорбенту ланцетом або ж послідовним вийманням зон з колонки загнутим шпателем.

Як у першому, так і в другому випадках ми поділяли колонку на окремі куски відповідно до окремих забарвлених або флуоресціюючих зон, що робили у світлі кварцевої лампи.

### 3. Осадова хроматографія

Осадову хроматографію розробили Є. Н. Гапон, Т. Б. Гапон та Н. М. Беленька (25).

Досі осадову хроматографію застосовували лише для поділу іонів. Проте вона можлива і для сумішей неелектролітів, бо і в цих випадках при різній розчинності утворюваних осадів з'являється осадова хроматограма.

Осадова хроматографія має перед іншими методами хроматографічного аналізу ряд переваг (26): зони, що утворюються, являють собою, як правило, осади тільки одного компонента; вони розділені різкою межею без ніякого переходу через проміжну зону; іноді між зонами осадів утворюються зони чистого адсорбента, що ще більше гарантує і спрощує повноту їх кількісного поділу; особливий інтерес для виділення з колонки утворених осадів має промивання розчинником, який добре розчиняє один з осадів і не розчиняє другий.

Галузь застосування осадової хроматографії поки що невелика. Але описані в літературі експерименти дають можливість припустити, що цей вид хроматографії має великі перспективи.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Л. Цехмейстер, Хроматография, Сб. статей под ред. акад. М. М. Дубинина, М., 8 (1948). — 2. M. Tswett, Ber., 24, 316 (1906). — 3. M. Tswett, Ber., 24, 384 (1906). — 4. R. Kuhn, E. Lederer, Ber., 64, 1349 (1931). — 5. R. Kuhn, A. Winterstein, E. Lederer, Z. physiol. Chem., 197, 141 (1931). — 6. М. М. Дубинин, Предисловие к сб., див. посилання 1. — 7. Б. Я. Свешников, Природа, 9, 65 (1951). — 8. Д. И. Рябчиков, М. М. Сенявин, ЖАХ, 8, 195 (1953). — 9. Н. А. Руднев, ЖАХ, 8, 3 (1953). — 10. Е. Н. Гапон, Т. Б. Гапон, Вступительная статья к книге «Хроматографический метод разделения ионов», ИЛ, М., 1949, 9. — 11. Б. Я. Свешников, Приложение к книге М. С. Цвета «Хроматографиче-



ский адсорбционный анализ», изд. АН СССР, 1946, 236. — 12. Ф. М. Шемякин, Э. С. Мицеловский, Д. В. Романов, Хроматографический анализ, М., 1955. — 13. В. В. Рачинский, Т. Б. Гапон, Хроматография в биологии, М., 1953. — 14. М. М. Сенявин, Усп. хим., 18, 183 (1949). — 15. Н. А. Фукс, Усп. хим., 18, 206 (1949). — 16. Г. К. Никонов, Тр. ВИЛАРа, М., 9, 1959, 400. — 17. Е. М. Брумберг, Исследования в области хроматографии, М., 1952, 127. — 18. J. W. Sease, J. Am. Chem. Soc., 70, 3630 (1948). — 19. Е. М. Брумберг, Хроматография (сб. статей), изд. Ленинградского университета, 1956, 87. — 20. А. Ф. Луковников, Тр. комиссии по аналитической химии, 6(9), изд. АН СССР, М., 1955, 191. — 21. Е. М. Брумберг, И. Н. Бережная и др., ДАН СССР, 74, 747 (1950). — 22. Г. В. Троицкий, Биохимия, 5, 375 (1940). — 23. A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, Biochem. J., 35, 1358 (1941). — 24. A. Baeyer, Ber., 27, 448 (1894). — 25. Е. Н. Гапон, Т. Б. Гапон, И. М. Беленькая, ДАН СССР, 60, 401 (1948). — 26. В. В. Рачинский, Т. Б. Гапон, Хроматография в биологии, М., 1953, 17.

Надійшла 2.VII 1962 р.

## ВЫБОР МЕТОДА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

*И. М. ПЕРЦЕВ, И. В. КРАСОВСКИЙ, Г. П. ПИВНЕНКО*

### СООБЩЕНИЕ I

#### РЕЗЮМЕ

Работа посвящается вопросу выбора метода хроматографического анализа, а также краткой характеристике различных методик анализа хроматограмм при использовании колонковой и осадочной хроматографии.

Указывается на некоторые преимущества хроматографического метода анализа перед другими методами (экстракция, перегонка, осаждение и пр.). Отмечаются наиболее важные проблемы, которые можно решить, используя этот метод.

---