

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА****М. С. ЦВЕТА****З. В. Жидкова**

«Советская наука с гордостью оглядывается на своё прошлое. Она видит в этом прошлом великие достижения, завоевание новых научных вершин, открытие научных истин, создание целых направлений в науке, начало важнейших разделов техники».

С. И. Вавилов *)

1. ВВЕДЕНИЕ

Среди физико-химических методов анализа за последнее время приобретает всё большее значение хроматографический адсорбционный метод анализа, основанный на избирательной адсорбции одного или нескольких веществ из раствора тем или другим адсорбентом. Преимущество этого метода перед другими физико-химическими методами состоит в том, что он применим в ряде случаев, когда другие методы фракционирования смеси оказываются бессильными. С его помощью можно отделить друг от друга вещества, очень близкие по составу и свойствам, даже при наличии их в очень малом количестве. Возможность разделения веществ, очень близких по составу и химическим свойствам, и составляет главную ценность хроматографического метода. Существенно отметить, что данный метод анализа требует также меньше времени и средств по причине сравнительной простоты необходимого технического оборудования.

Основоположником хроматографического адсорбционного метода анализа был русский учёный — ботаник Михаил Семёнович Цвет **),

*) Вестник Академии наук, № 5, стр. 5 (1948 г.).

**) Приводим краткие биографические данные о М. С. Цвете, взятые нами из статьи академика А. А. Рихтера и профессора Т. А. Красносельской, помещённой в Академическом издании СССР за 1946 г. (избранные работы М. С. Цвета)¹.

Михаил Семёнович Цвет родился 19 мая 1872 г. в Италии (г. Асти). Отец его, Семён Николаевич Цвет, был русский, мать, Мария Дороцка, — итальянка. Своё детство и юность Михаил Семёнович Цвет провёл во французской Швейцарии, где окончил Женевский университет, а затем вёл

впервые разработавший этот метод для выделения пигментов из зелёных листьев. До него пигменты выделялись из зелёных листьев путём сложной химической обработки, в результате чего экспериментатор получал продукты, по свойствам далеко отличные от свойств естественных пигментов в зелёном листе. Так, в лучшем курсе того времени по физиологии растений В. И. Палладина мы читаем: для разделения составных частей хлорофилла «по способу Ганзена спиртовую вытяжку хлорофилла разбавляют едким натром и нагревают до кипения на водяной бане около трёх часов» и т. д.

Отсюда следовали либо неправильные, либо примитивные выводы о составе хлорофилла, представляющего собой, по словам Дарвина, «одно из интереснейших веществ на земной поверхности». В том же курсе В. И. Палладина мы читаем: «Хлорофилл — азотистое тело, нерастворимое в воде, растворимое в спирте, эфире и масле. Зола спиртовой вытяжки хлорофилла содержит железо». Громадные трудности при изучении хлорофилла заключаются именно в его лёгкой изменчивости, требующей при извлечении его из растений применения исключительно нейтральных жидкостей.

Строение и состав хлорофилла удалось выяснить лишь в недавнее время, после разработки М. С. Цветом хроматографического адсорбционного метода анализа.

Самый метод, положенный в основу хроматографического анализа, выработан автором в результате кропотливой работы. Во вре-

исследовательскую работу в его лаборатории общей ботаники. В 1897 г. Цвет переезжает в Петербург и поступает на работу в СПб. биологическую лабораторию, за год до того основанную П. Ф. Лесгафтом, а затем в академическую лабораторию академика А. С. Фаминцына. 21 сентября 1901 г. при Казанском университете Цвет защищает свою диссертацию на степень магистра ботаники «Физико-химическое строение хлорофильного зерна». Позже Цвет переезжает в Варшаву, где получает должность сначала сверхштатного лаборанта, а затем ассистента и приват-доцента в Варшавском университете. С 1907 г. он — профессор ботаники и агрономии в Варшавском ветеринарном институте. После того как в 1908 г. Цвет был избран профессором ботаники и микробиологии в Варшавский политехнический институт, он в 1909 г. оставил работу в университете. В 1910 г. М. С. Цвет защищает в Варшавском университете докторскую диссертацию по ботанике на тему: «Хромофиллы в растительном и животном мире». В те годы, когда Цвет жил в Варшаве, он несколько раз ездил в Петербург и Москву для участия на съездах, где выступал с докладами. В 1900 г., по предложению И. П. Бородина, М. С. Воронина и Д. И. Ивановского, Цвет избирается членом СПб. общества естествоиспытателей; кроме того, он впоследствии был членом Варшавского общества естествоиспытателей. Цвет был хорошим лектором и с любовью относился к преподаванию в высших учебных заведениях. К работе в своей лаборатории он привлекал и студентов. В 1914 г. разразилась империалистическая война, и Цвет вместе с Варшавским политехническим институтом был эвакуирован из Варшавы в Нижний-Новгород (ныне г. Горький). Трудная жизнь в этот период подорвала и без того некрепкое здоровье М. С. Цвета. Он умер 26 июня 1919 г.

мена Цвета широко было известно, что из листьев растений с помощью лигроина нельзя извлечь полностью «зелёное вещество» (хлорофиллины). Многие авторы пытались это объяснить плохой растворимостью хлорофиллинов в лигроине. Цвет по этому поводу писал: «Экспериментальное расследование вопроса привело меня к следующему результату. Нерастворяемость большей части хлорофилловых пигментов из листьев в бензине и лигроине обуславливается не их нерастворимостью в этих жидкостях, а задерживающим действием молекулярных сил субстрата, то-есть адсорбционным поглощением»¹.

И далее он совершенно точно формулирует основы хроматографического метода: «Следовало ожидать тоже, что всевозможные порошкообразные вещества окажут адсорбционное действие на хлорофилловые пигменты в лигроиновых растворах, и возникала надежда, что систематическое изучение вопроса бросит некоторый свет на сущность адсорбционных явлений и позволит выработать на их основании новый метод физического отделения веществ».

Свои работы М. С. Цвет опубликовал в 1903 г. в «Трудах Варшавского общества естествоиспытателей» под заглавием «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу» и в ряде других работ более позднего времени¹.

Почти все современные приёмы хроматографического метода анализа были уже полностью разработаны и описаны Цветом ещё в те годы и этот метод по праву называется его именем. Даже при всём стремлении ряда иностранных учёных замолчать приоритет великого русского учёного в создании данного метода они всё же вынуждены признать его. Так Л. Цехмейстер⁴⁵ в статье, посвящённой истории и методике хроматографического анализа, пишет: «Нет никакого сомнения в том, что истинным изобретателем хроматографии во всех её важнейших чертах является Цвет».

Однако этот поистине выдающийся метод не получил широкой поддержки у современников его автора. До некоторой степени причиной этому послужил, быть может, неблагоприятный отзыв, данный знаменитым в то время немецким химиком Вильштеттером, работавшим много лет над исследованием хлорофилла. Было бы неправильно сказать, что метод вообще не был оценён — в 1911 г. русская Академия наук присуждает Цвету за его книгу «Хлорофиллы в растительном и животном мире» Большую премию имени А. П. Ахматова. Но после этого «Замечательный хроматографический метод профессора Цвета, который по значению справедливо сравнивается со спектральным анализом, был долго забыт на родине Цвета»^{*)}.

^{*)} С. И. Вавилов, Вестник Академии наук СССР, № 2, стр. 9 (1949 г.).

«Зерно», посеянное скромным русским учёным, дало «всходы» примерно только через 20 лет в классических работах Н. А. Шиловой², Л. К. Лепинь³, М. М. Дубинина⁴ и других по изучению динамики сорбции пареообразных веществ.

Работы Куна, Винтерштейна и Ледерера⁵ по анализу каротинов подтвердили всё могущество данного метода.

За последнее десятилетие метод получил широкое распространение в органической и неорганической химии, в биохимии, медицине и в других науках и отраслях промышленности. Одновременно с внедрением данного метода для анализа или выделения тех или других продуктов ведётся разработка теории хроматографического анализа и различных методов его проведения. Сюда можно отнести работы М. М. Дубинина⁶, А. А. Жуховицкого⁷, Е. Н. Гапона^{8, 9}, Б. Н. Никольского¹⁰, М. А. Константиновой-Шлезингер¹¹, О. М. Тодеса¹², М. В. Радужкевич¹³, А. Н. Харина¹⁴ и др.

Большой материал, накопившийся по различным вопросам хроматографии, привёл к необходимости созыва совещания, которое состоялось в ноябре 1950 г. На совещании были отмечены новые направления в хроматографии (ионнообменная, осадочная и др.) и их широкое применение в различных областях народного хозяйства, а также большие успехи в синтезе поглотителей.

II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И МЕТОДИКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Классический способ хроматографического адсорбционного анализа, разработанный М. С. Цветом, основан на избирательном поглощении веществ из раствора каким-нибудь адсорбентом, в зависимости от соотношения значений коэффициентов адсорбции данных веществ на данном адсорбенте. Представим, что через слой адсорбента фильтруется раствор смеси изучаемых веществ, у которых коэффициенты адсорбции по отношению к данному адсорбенту различны. Отдельные компоненты раствора будут поглощаться в слое адсорбента поочередно, образуя зоны (или пояски) различной окраски, если данные вещества обладают характерной окраской в видимой области спектра (см. вклейку, рис. I, стр. 392). Вначале, в самом верхнем слое, адсорбируется компонента раствора с наибольшим адсорбционным сродством к данному адсорбенту; в самом нижнем слое адсорбируется компонента с наименьшим адсорбционным сродством. Между ними, сверху вниз, располагаются все другие компоненты в порядке уменьшения их адсорбционного сродства к адсорбенту.

Порядок поглощения данных компонент из данного раствора на данном адсорбенте является вполне определённым и не зависит от того, сколько раз и каким образом повторять фильтрование. Возьмём, например, раствор из трёх заранее известных компонент (веществ) *a*, *b*, *c* и пропустим этот раствор через адсорбент. Пусть

адсорбционное сродство компонент раствора уменьшается от a к b и к c , тогда порядок расположения зон A , B , C , в которых поглощаются соответствующие компоненты, будет таким, как показано на рис. 1. При последующей фильтрации раствора, состоящего из одной только компоненты a , зона, соответствующая данной компоненте (зона A), несколько расширится, что связано с увеличением адсорбированного количества добавленной компоненты, а зоны B и C , вытесняясь, переместятся вниз на соответствующую величину. При добавлении раствора, состоящего из одной только компоненты b , зона B , соответствующая данной компоненте, расширится, зона же A останется на прежнем месте; зона C переместится на величину увеличения зоны B и т. д. Одним словом, как говорил М. С. Цвет, «Каждый из членов адсорбционного ряда, обладая большим адсорбционным сродством, чем последующий, вытесняет его из соединения и в свою очередь вытесняется предыдущим».

Практически зоны, соответствующие отдельным компонентам пропускаемого через адсорбент раствора, в большинстве случаев перекрываются. Поэтому иногда трудно определить, где кончается зона поглощения одной компоненты и начинается зона другой. Чтобы получить чёткую хроматографическую картину, через адсорбент профильтровывают дополнительно какой-нибудь чистый растворитель, называемый в хроматографии «проявителем». Каждая зона под действием тока проявителя опускается вниз; перемещение каждой зоны тем больше, чем меньше адсорбционное сродство компоненты (соответствующей данной зоне) по отношению к данному адсорбенту. Возможен, однако, случай, когда не все зоны перемещаются под действием тока данного «проявителя». В этом случае приходится подбирать другие растворители-проявители, пока цель не будет достигнута. В результате «проявления» отдельные зоны обособляются друг от друга и в большинстве случаев между ними появляются белые промежутки (см. рис. 1). В некоторых случаях подобрать достаточно хороший «проявитель» не удаётся, и зоны в хроматограмме остаются тесно прилегающими друг к другу, без разделяющих их белых поясков.

Замена «проявителя» при получении хроматограммы ведёт иногда к обращению относительного расположения в ней зон. На рис. 2 приведён пример такого обращения зон при адсорбции смеси двух веществ (мета-нитро-фенола и пара-нитро-моноэтил-анилина) на силикагеле при проявлении хроматограммы лигроиновым раствором в первом случае — бензола, а во втором — эфира.

Аналогичное явление может наблюдаться также при изменении адсорбента и растворителя. Один из примеров этого описан Леро-

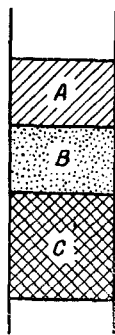
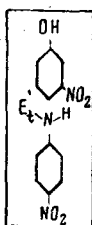


Рис. 1

зеном¹⁵, который изучал расположение зон двух веществ: ликопена $C_{40}H_{56}$ и криптоксантина $C_{40}H_{56}O$, при адсорбции их на разных адсорбентах; он обнаружил, что при адсорбции на окиси алюминия и на карбонате кальция зоны располагаются в последовательности: криптоксантин, ликопен; при адсорбции же на гидрате окиси кальция наблюдается обратная последовательность зон: ликопен, криптоксантин.

1) Бензал+лигроин



2) Эфир+лигроин

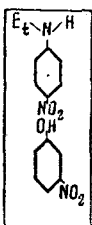


Рис. 2. Обращение относительного расположения зон при изменении растворителя.

заполнения трубки является способ, основанный на суспендировании адсорбента в нейтральном растворе. Заполнение трубки в этом случае ведётся обычно под небольшим давлением, для чего адсорбционная колонка при помощи пробки соединяется с колбой Бунзена (рис. 3)**).

*) При заполнении трубки сухим адсорбентом последний всыпают небольшими порциями и утрамбовывают при помощи металлического или стеклянного диска или корковой пробки, диаметр которых лишь немного меньше диаметра трубки. Но процесс такого заполнения очень кропотлив, а самое главное — редко даёт хорошие результаты; в большинстве случаев уплотнение адсорбента происходит неравномерно по высоте столбика, что приводит к различной адсорбционной способности адсорбента в различных участках столбика и к образованию так называемых «ложных зон».

**) Во время заполнения трубки и во время получения хроматограммы, если работа ведётся под давлением, необходимо следить, во избежание высыхания и связанного с этим растрескивания столбика, чтобы на поверхности адсорбента всегда находился растворитель или раствор. В противном случае в образовавшиеся трещины устремится поток раствора или растворителя; при последующем вливании процесс промывания или адсорбции будет нарушен, а хроматографическая картина испорчена.

Применяемые трубки могут различаться как по размерам, так и по форме, в зависимости от количества необходимого для опыта адсорбента; последнее же зависит от поставленной задачи. Для микрохимических работ употребляются трубки диаметром 1—2 мм, для спектроскопических — порядка 10 мм, для препаративных — ещё большего размера, вмещающие несколько килограммов адсорбента (рис. 4).

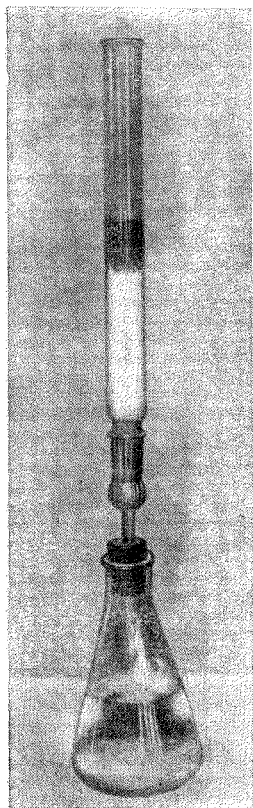


Рис. 3.

Заводские установки рассчитаны на сотни килограммов и тонны адсорбента.

При выборе трубки учитываются, конечно, и адсорбционная способность адсорбента по отношению к исследуемому веществу и количество исследуемого вещества. Так, если вещество адсорбируется плохо, желательно иметь возможно более высокую и широкую трубку; но слишком широкие трубки применять нежелательно, так как получить хорошую хроматограмму в них труднее вследствие неравномерности распределения раствора по поверхности в момент его вливания в трубку. Иногда, при

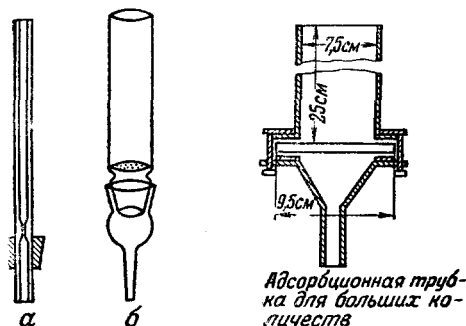


Рис. 4. Типы адсорбционных трубок.

наличии большого количества исследуемого вещества, во избежание слишком большого увеличения габаритов колонки работу проводят на нескольких трубках одновременно. Если есть необходимость в том, чтобы после получения хроматограммы разделить столбик адсорбента механически, сообразно полученным зонам, то чрезвычайно удобно пользоваться трубкой с притёртым шлифом¹⁶, показанной на рис. 4, б. Когда опыт бывает окон

чен, шлиф открывают и столбик адсорбента выталкивают из трубки вместе с перегородкой.

Существенное значение при хроматографическом анализе имеет выбор адсорбента. Адсорбентами могут служить любые порошкообразные вещества, не реагирующие с применяемым растворителем и не разлагающие адсорбируемые вещества. М. С. Цветом было испытано около 100 различных адсорбентов, но только немногие из них оказались пригодными. В качестве неорганических и минеральных адсорбентов могут служить следующие вещества: окись алюминия (Al_2O_3), окись кальция (CaO), гидрат окиси кальция ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) — гашёная известь, углекислый кальций (CaCO_3), окись цинка (ZnO), сернокислый кальций (CaSO_4), окись магния (MgO), франконит, силикагель, фуллерова земля, порошкообразный тальк. Из органических адсорбентов известны в применении: сахарный песок, инулин, молочный сахар, активированный уголь из каменного угля, костяной уголь.

Адсорбционная активность того или иного адсорбента по отношению к данному веществу может быть различной в зависимости от способа получения данного адсорбента и от наличия в нём адсорбированной влаги. Действительно, в зависимости от вышеуказанных условий изменяется удельная поверхность адсорбента, что является решающим фактором при физической адсорбции. Например, различные условия приготовления адсорбента могут привести к образованию различных величин пор его, а это приведёт к изменению его активной поверхности, так как последняя может быть выражена функцией

$$S = \int_{r_0}^{\infty} \varphi(r) dr,$$

где r_0 — наименьший радиус пор, проходимых для молекул вещества. Надо иметь в виду, что удельная поверхность, доступная для молекул одного вещества (например, воды), не обязательно совпадает с поверхностью, доступной для более крупных молекул (например, бензола). Что касается влияния влажности адсорбента, то с удалением адсорбированной влаги, при всех прочих равных условиях, увеличивается свободная активная поверхность адсорбента, т. е. увеличивается его адсорбционная активность по отношению к данному веществу.

Размеры частиц адсорбента несомненно влияют на его адсорбционную способность; поэтому адсорбент, которым заполняется трубка, не должен слишком раздробляться, ибо более мелкие частицы могут оказаться и более активными. Некоторые авторы рекомендуют применять в качестве адсорбентов мелкодисперсные порошки; например, Е. Ледерер¹⁷ указывает желательные размеры применяемых частиц адсорбента от 1,5 до 10 μ . Однако при такой величине частиц адсорбента очень сильно замедляется фильтрация

раствора, а поэтому наиболее благоприятная величина размера частиц лежит в пределах 40 — 60 μ . Применение частиц значительно большего размера приводит к расплывчатому виду хроматограммы.

Выбор того или иного адсорбента решается в конечном счёте экспериментом, но при предварительных опытах можно руководствоваться следующей закономерностью: адсорбенты основного характера адсорбируют вещества, обладающие кислотными свойствами, и наоборот.

Одним из наиболее употребительных адсорбентов при адсорбции как органических, так и неорганических веществ является окись алюминия, положительные свойства которой определяются не только её амфотерностью, но и сравнительно лёгкой регенерацией. Адсорбционную способность окиси алюминия можно повысить или ослабить.

Руггли и Иенсен¹⁸ описывают метод активации окиси алюминия путём трёхкратной промывки водопроводной водой. При этом адсорбент поглощает незначительное количество извести, отчего адсорбционная активность его повышается. Гельброн и Фиперс¹⁹ понижали активность окиси алюминия промыванием метанолом и последующей просушкой на воздухе.

Другим наиболее употребительным адсорбентом является силикагель. На адсорбционных свойствах силикагеля особенно сильно сказывается методика приготовления, в чём можно убедиться на основании работ М. О. Хармадарьяна и С. А. Капелевича²⁰, А. В. Киселёва²¹ и др.

Растворители выбираются по признакам наилучшего растворения исследуемых веществ и наименьшей адсорбируемости их адсорбентом. Наиболее распространёнными растворителями являются органические вещества: петролейный эфир, ацетон, сероуглерод, бензол, бензин, метанол, этанол, хлороформ и др. В неорганической химии очень широко употребляется в качестве растворителя вода. Иногда применяются смеси двух или нескольких растворителей.

В качестве «проявителей» берутся те же самые растворители. Выбор «проявителя» производится в большинстве случаев эмпирически.

В результате проведения всех этапов хроматографического адсорбционного анализа (фильтрации раствора через колонку и проявления её) мы получаем готовую хроматограмму. При этом, как описывает Цвет¹: «Подобно световым лучам в спектре, различные компоненты сложного пигмента закономерно располагаются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступными как качественному и количественному определению».

Отдельные компоненты хроматограммы или механически отделяются друг от друга, как было указано раньше, или постепенно

переводятся в фильтрат. После этого они анализируются тем или иным способом.

Для визуального просмотра состава вещества можно применять быстрый, так называемый «круговой» метод. Для этого необходимо иметь две стеклянные пластинки, в одной из которых в центре сделано отверстие диаметром 4—6 мм. Размер пластинок зависит от величины хроматограммы. Адсорбент насыпается на пластинку без отверстия и путём лёгкого покачивания пластинки в горизонтальной плоскости распределяется по ней приблизительно равномерным тонким слоем. Затем накладывается пластинка с отверстием; последняя при слабом нажиме на неё пальцами перемещается в горизонтальной плоскости по адсорбенту взад и вперёд. Таким способом удаляется воздух, имеющийся между пластинками и адсорбентом, и увеличивается равномерность распределения адсорбента между пластинками. Затем через отверстие при помощи пипетки вводится исследуемое вещество, которое (при равномерном уплотнении адсорбента) распространяется с одинаковой скоростью во всех направлениях от отверстия. При последующем «проявлении» мы получаем хроматограмму, где отдельные зоны расположены в виде концентрических кругов, как показано на рис. II (см. вклейку).

III. АНАЛИЗ ОТДЕЛЬНЫХ ЗОН ХРОМАТОГРАММЫ, СООТВЕТСТВУЮЩИХ ОТДЕЛЬНЫМ КОМПОНЕНТАМ ИССЛЕДУЕМОЙ СМЕСИ

Как только хроматограмма получена, анализируются её отдельные зоны. За последнее время разработано несколько способов анализа компонент хроматограммы, которые могут быть рекомендованы.

1. Химический анализ отдельных компонент после выделения их в раствор или непосредственно на адсорбенте.

2. Спектрофотометрический, осуществляемый в двух вариантах:

- а) Один из способов анализа компонент, непосредственно в адсорбированном виде, состоит в определении спектрального поглощения адсорбированного вещества методом измерения диффузного отражения от чистого адсорбента и адсорбента с адсорбированным на нём веществом²². При сопоставлении двух пучков света мы можем судить о суммарном поглощении света адсорбированным веществом.

Однако полученные данные не дают точных значений величин коэффициентов поглощения вследствие специфики распространения света в мутной среде. Максимумы на спектральной кривой пропускания оказываются выраженными несколько слабее, — вещество будет казаться несколько белесоватей, чем в растворе. Общий же вид кривой пропускания сохраняется.

б) Другой вариант состоит в измерении поглощения исследуемых компонент, переведённых в раствор. Этот способ анализа обладает тем преимуществом, что может быть успешно проведён в случае небольшого количества вещества. Так, состав одного из красителей, являющегося сенсibilизатором, не был выявлен при всех попытках химического анализа. Хроматографическим путём было установлено, что данный краситель является сложным, так как хроматограмма его содержит пять колец (см. рис. 1). Правда,

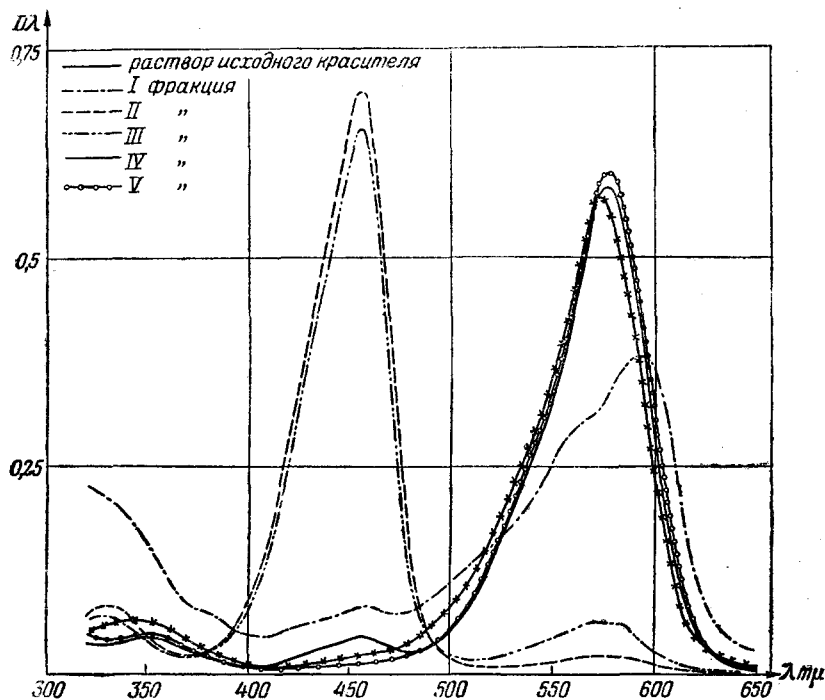


Рис. 5.

некоторые зоны хроматограммы содержат очень мало вещества, сообразно тому, что и в самом красителе его очень мало; как видно из рис. 1, такова самая верхняя зона (тёмная полоска). Однако спектрофотометрическим способом был проведён анализ всех компонент, включая и компоненту, соответствующую верхней зоне. На рис. 5 приведены кривые спектрального поглощения отдельных компонент. Отсчёт зон на хроматограмме ведётся сверху вниз.

3. За последнее время получил очень широкое распространение так называемый способ «жидкой хроматограммы». Он состоит

в наблюдении за процессом разделения путём непосредственного измерения концентрации раствора, вытекающего из колонки, для чего выходящий из колонки раствор поступает небольшими порциями в кювету. Измеренные в кювете концентрации раствора изображают графически как функцию объема раствора, прошедшего через адсорбент, или времени. Кривая, выражающая наблюдаемую зависимость, носит название «выходной кривой». Для бесцветных веществ концентрацию растворов определяют по измерению показателя преломления с помощью интерферометра. Такой метод анализа подробно описан С. Классоном²³.

IV. ФОРМЫ ПРОВЕДЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Если рассматривать те физико-химические факторы, которые лежат в основе хроматографического разделения веществ, то можно различать три основных вида хроматографического анализа: адсорбционный (молекулярная и ионообменная), распределительная и осадочная хроматографии.

За последнее время развитие хроматографического анализа шло в направлении создания новых форм его проведения, отличающихся по методу получения хроматограмм и по способу перемещения отдельных зон вдоль столбика адсорбента. Мы остановимся на характеристике отдельных форм проведения хроматографического анализа, получивших в настоящее время большее или меньшее распространение.

1. Адсорбционная хроматография

а) Анализ промыванием. После получения хроматограммы отдельные зоны её переводятся в раствор путём промывания каким-нибудь растворителем, а иногда и несколькими растворителями. При этом ширина зон увеличивается по мере перемещения, т. е. зоны как бы расплываются. Скорость перемещения зависит от адсорбционного сродства компонент хроматограммы, соответствующих данным зонам, по отношению к данному адсорбенту, от растворителя, служащего для промывания, и от температуры, при которой проводится опыт (температуры адсорбционной колонки). Может представиться такой случай, когда всевозможные подборы растворителя не приводят к полному извлечению зон в раствор, т. е. одна или несколько компонент исследуемого раствора адсорбируются адсорбентом настолько сильно, что зоны их невозможно сдвинуть с первоначального положения. В этом и заключается один из недостатков анализа промыванием. Чтобы всё же промыть сильно адсорбирующиеся зоны, приходится повышать температуру адсорбционного столбика, отчего адсорбционная способность адсорбента понижается и данные зоны начинают поддаваться вымыванию. Другой недостаток метода заключается в том, что при промывании расходуется очень большое количе-

ство растворителя. Но эти недостатки окупаются, так как при описываемом способе каждая компонента смеси выходит из колонки в чистом состоянии, что очень удобно для препаративных целей. По виду «выходной кривой» при анализе промыванием можно судить о неполном или полном разделении смеси. На рис. 6 показаны выходные кривые как для первого, так и для второго случаев. При полном разделении смеси концентрация растворённого вещества в кювете остаётся в течение всего опыта равной нулю, за исключением тех промежутков времени, когда через кювету проходят зоны хроматограммы; эти участки на графике

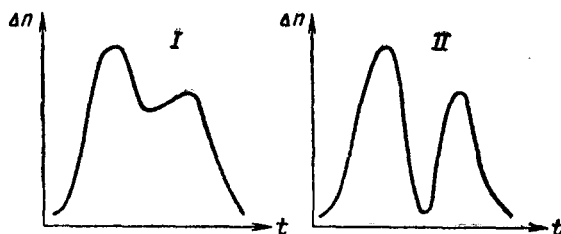


Рис. 6. Выходные кривые при анализе промыванием:
I — неполное разделение, II — полное разделение.

изображаются пиками. Площадь, расположенная под таким пиком, определяет количество вещества, находящегося в зоне.

б) Термическая десорбция. Эта форма хроматографического анализа основана полностью на сдвиге адсорбционного равновесия в сторону уменьшения его при повышении температуры и в сторону увеличения при понижении температуры. Самый процесс анализа состоит в следующем: после того, как раствор изучаемого вещества профильтрован обычным способом через колонку с адсорбентом, постепенно повышается температура последнего, вследствие чего изменяется его адсорбционное сродство по отношению к компонентам раствора, и отдельные зоны начинают перемещаться вдоль колонки. Повышать температуру колонки можно различными способами, например: обмотав колонку несколькими витками проволоки и постепенно повышая силу протекающего по ним тока или путём медленного изменения глубины погружения трубки с адсорбентом в холодильник или в печь.

в) Фронтальный анализ²³. Эта форма хроматографического анализа является самой простой. Обычно после того, как адсорбент в колонке смочен небольшой порцией чистого растворителя, через колонку начинают непрерывно профильтровывать раствор исследуемых веществ. Пока адсорбент не насытился дан-

ным веществом полностью, из колонки вытекает чистый растворитель (концентрация растворённого вещества при измерении выходной кривой равна нулю), но как только адсорбент насытится — концентрация резко возрастает. Выходная кривая для раствора

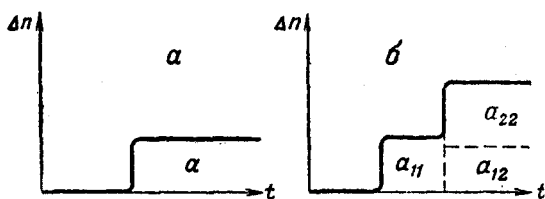


Рис. 7. Выходные кривые при фронтальном анализе: а — для одной компоненты, б — для двух компонент.

с одной компонентой имеет одну ступеньку, как показано на рис. 7, а, с двумя компонентами — две ступеньки (рис. 7, б). Первая ступенька содержит только первую компоненту в чистом виде, вторая — компоненту 1 и компоненту 2. Таким образом, мы не получаем в чистом виде «жидкой» хроматограммы для каждой компоненты, как это было при анализе промыванием. Однако если для каждой чистой компоненты известна изотерма адсорбции, то на основании выходной кривой может быть определён состав анализируемой смеси. Основное достоинство фронтального метода состоит в том, что он может быть применён в случае, когда вещество адсорбируется на адсорбенте необратимо или когда вещества очень мало отличаются друг от друга своей адсорбцией. Фронтальный метод был, например, широко применён при анализе смеси жирных кислот. Выходная кривая для одного из таких анализов показана на рис. 8.

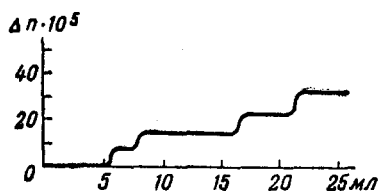


Рис. 8. Фронтальный анализ смеси жирных кислот.

ции, то на основании выходной кривой может быть определён состав анализируемой смеси. Основное достоинство фронтального метода состоит в том, что он может быть применён в случае, когда вещество адсорбируется на адсорбенте необратимо или когда вещества очень мало отличаются друг от друга своей адсорбцией. Фронтальный метод был, например, широко применён при анализе смеси жирных кислот. Выходная кривая для одного из таких анализов показана на рис. 8.

г) Вытеснительное проявление. Отличие данного метода от метода промыванием состоит в том, что после пропускания через колонку раствора анализируемой смеси через неё профильтровывают растворитель, к которому добавляют вещество, называемое в литературе «вытеснителем»; у последнего адсорбционное сродство по отношению к данному адсорбенту должно быть больше, чем у любой компоненты смеси. Таким образом, добавленное вещество («вытеснитель»), поглощаясь адсорбентом в самых верхних слоях его, перемещает все нижележащие слои вниз и вытесняет их из колонки в порядке их положения по вертикали. Все компоненты смеси получают при этом в чистом

состоянии и характеризуются соответствующей ступенькой в выходной кривой, как показано на рис. 9; высота и ширина пиков при предварительном калибровании позволяют определить качественный и количественный состав анализируемой смеси. При описываемой форме проведения хроматографического анализа возможно применение адсорбентов с большой адсорбционной способностью, или, как говорят, ёмких адсорбентов, так как перемещение осуществляется за счёт вытеснения. Это повышает эффективность процесса, ибо можно провести анализ большого количества веществ при наличии многих компонент. Однако могут быть случаи необратимой адсорбции, когда зоны не могут быть вытеснены ничем. В этом случае единственным пригодным методом оказывается фронтальный анализ.

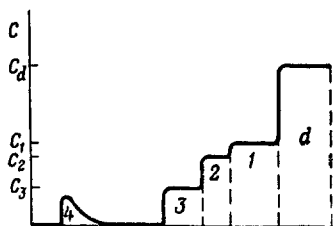


Рис. 9. Выходная кривая многокомпонентной смеси при вытеснительном проявлении.

д) Ионообменная хроматограмма. За последнее время в неорганической химии получила очень широкое распространение ионообменная хроматограмма, основанная на обмене ионов между раствором и ионообменным адсорбентом. Для осуществления этой формы хроматографии необходимо, чтобы применяемый адсорбент содержал ионы, способные к обмену на ионы компонент раствора; при этом никаких других реакций, кроме обменной адсорбции, не должно происходить. Подобные адсорбенты принято в литературе по хроматографии называть пермутентами. Расположение компонент смеси в адсорбционной колонке зависит от степени адсорбции их ионов данным адсорбентом, а выделение из колонки осуществляется обычным вымыванием. Эта форма хроматографии была успешно применена при разделении редких земель²⁴ и радиоактивных элементов²⁵.

На рис. 10 приведена выходная кривая при разделении элементов группы иттрия. Радиоактивность вытекающих из колонки растворов измерялась счётчиком Гейгера-Мюллера. Теория ионообменной хроматографии для различных случаев описана в трудах Е. Н. Гапона и Т. Б. Гапон⁸. Ими же была проведена работа по разделению ионов кобальта и никеля на специально приготовленном пермутите²⁸.

2. Распределительная хроматография

Эта форма хроматографического анализа, предложенная Мартином и Синджем в 1941 г.³³, получила за последнее время широкое распространение при анализе многих веществ. Она основана на различии в величине коэффициентов распределения компонент

смеси между двумя несмешивающимися растворителями. В начале анализа адсорбент в колонке пропитывают каким-нибудь растворителем, который называется «неподвижным», а затем через колонку пропускают раствор анализируемой смеси в другом

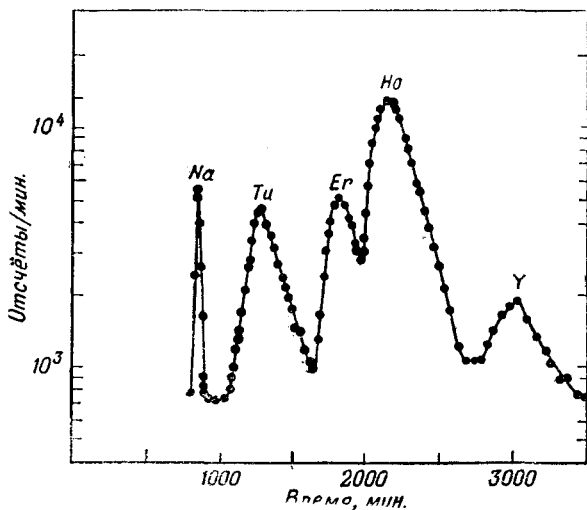


Рис. 10. Разделение группы иттрия.

растворителе, называемом «подвижным». Роль адсорбента при описываемой форме анализа сводится к тому, что он служит простым механическим носителем «неподвижного» растворителя; предполагается, что он никаким образом не взаимодействует с адсорбированным веществом. Таким требованиям отвечают не все адсорбенты. Только немногие из известных до сего времени могут быть успешно применены при распределительной хроматографии; к ним относятся: силикагель, целлюлоза и крахмал. Отдельные компоненты смеси из колонки вымываются с помощью подвижного растворителя. Таким образом был проведён анализ по разделению аминокислот, технического пенициллина²⁶ и других веществ на силикагеле и крахмале. Некоторые своеобразные черты обнаруживает распределительная хроматограмма на бумаге²⁷, поэтому мы остановимся на ней отдельно. Для проведения анализа достаточно иметь только небольшую полоску фильтровальной бумаги. Вблизи одного её конца наносится капля исследуемого раствора в «подвижном» растворителе; в качестве «неподвижного» растворителя служит вода, сорбированная волокнами бумаги. Затем полоска бумаги вносится в атмосферу, насы-

ценную парами воды и растворителя, и одним концом своим (вблизи которого нанесена капля раствора) приводится в соприкосновение с тем же, содержащим воду, раствором. Раствор под действием капиллярных сил начинает медленно передвигаться по полоске бумаги, и через несколько часов мы получаем на бумаге ряд пятен, расположенных по току растворителя и соответствующих (при полном разделении) числу компонент смеси. Но могут быть случаи, когда при применении одного только растворителя не происходит полного разделения смеси; в этом случае поворачивают полоску бумаги на 90° и другой её конец (вблизи которого находится капля) помещают в смесь другого растворителя с водой. Хроматограмма, полученная при проявлении одним растворителем, носит название односторонней, а при проявлении двумя растворителями (в двух взаимно перпендикулярных направлениях) носит название двухмерной. Каждая компонента в двухмерной хроматограмме характеризуется двумя координатами, величина которых устанавливается предварительными опытами с индивидуальными компонентами (рис. 11).

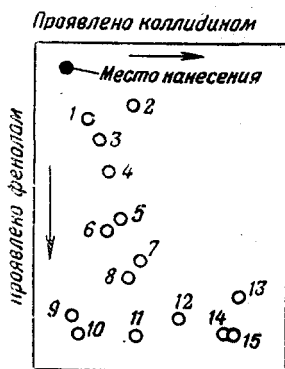


Рис. 11. Двухмерная рас-
пределительная хромато-
грамма на бумаге.

3. Осадочная хроматография

Многообещающий способ осадочной хроматографии, предложенный Е. Н. Гапоном и Т. Б. Гапон⁹, находится ещё в стадии развития, а поэтому область его применения пока что невелика. Осадочная хроматография основана на образовании осадков при пропускании раствора через колонку, для чего неактивный порошкообразный носитель тем или иным путём смешивают с твёрдым осадителем — реактивом, дающим с компонентами смеси труднорастворимые соединения. На основе проведённых исследований авторы делают вывод, что «любое вещество (осадитель), могущее взаимодействовать с раствором ряда других веществ (хроматографируемые вещества), нанесённое на любое высокодисперсное вещество (носитель), образует осадочную хроматограмму, если растворимости осадков различны». Последовательность образования осадков определяется величиной растворимости труднорастворимых соединений. Получаемые зоны для большинства осадочных хроматограмм разделяются резкими границами.

V. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕСЦВЕТНЫХ ВЕЩЕСТВ

Ещё Цвет указывал, что «адсорбционный анализ, применимый прежде всего для пигментов, распространяется и на бесцветные, то-есть „невидимо окрашенные“ вещества». Все вышеперечисленные формы получения хроматограмм для окрашенных веществ применимы и при работе с бесцветными веществами.

Трудность заключается только в фиксации, а следовательно, и в анализе отдельных зон хроматограммы, соответствующих отдельным компонентам исследуемого раствора. В настоящее время известно несколько способов анализа хроматограмм для бесцветных веществ:

1. Эмпирический способ. Этот способ является, пожалуй, самым примитивным из всех нижеописанных. Состоит он в следующем: исследуемый раствор профильтровывают через адсорбционную колонку, а затем, после проявления колонки «проявителем», столбик адсорбента выталкивают из трубки и, разрезав на несколько произвольных частей, переводят адсорбированные вещества в раствор. Отдельные вещества анализируются физическим или химическим методом.

2. Способ цветной реакции, осуществляемый в различных вариантах:

а) Превращение бесцветных веществ в окрашенные до хроматографического разделения. Существенный недостаток этого способа, как указывает М. М. Сенявин²⁹, заключается в том, что перевод бесцветных веществ в окрашенные связан с увеличением и усложнением их молекул, а это часто ведёт к уменьшению разлчия в адсорбируемости компонент разделяемой смеси и, тем самым, затрудняет хроматографическое разделение.

б) Получение цветной реакции с адсорбированными компонентами, или так называемый метод «кисти», предложенный Цехмейстером, Хольноки и Униели³⁰. Он состоит в нанесении мазка реактива на столбик адсорбента после его выгрузки из адсорбционной трубки. При этом реактив даёт различную окраску с адсорбированными компонентами хроматограммы. Так, для разделения α - и β -нафтолов в качестве реактива можно взять смесь растворов сульфаниловой кислоты и нитрита натрия, дающих для α -нафтола фиолетовую окраску, а для β -нафтола — оранжевую.

в) Получение цветной реакции с растворами компонент, вытекающих из колонки. Руггли и Иенсен¹⁸ разделяли сульфокислоты нафтола, адсорбируя их глинозёмом из водных растворов. При промывании водой указанные кислоты переходили в раствор последовательно одна за другой и могли быть установлены при помощи диазорастворов, дающих с этими кислотами различные красители.

3. Освещение хроматографической колонки ультрафиолетовым светом. Описываемый метод может быть применён:

а) когда адсорбированные вещества сами дают яркие полосы люминесценции при освещении ультрафиолетовым светом. При этом цвет люминесценции для одного и того же адсорбированного вещества может быть различным, в зависимости от выбора адсорбента³¹;

б) при применении адсорбентов, образующих сильно флуоресцирующую колонку. Способ позволяет обнаружить компоненты хроматограммы, обладающие способностью гасить флуоресценцию адсорбента и поэтому проявляющиеся в виде тёмных зон³².

4. Способ цветной трансформации. Этот способ разработан Е. М. Брумбергом^{34,35} и основан на том, что большинство веществ, бесцветных в видимой области, имеют в ультрафиолетовой области сильные полосы поглощения, т. е. являются «окрашенными» в той области спектра, которая не воспринимается нашим глазом. Одна из областей применения данного способа — распределительная хроматограмма на бумаге. Заключается такой способ в следующем. После того, как получена распределительная хроматограмма какого-нибудь вещества на бумаге, как показано на рис. 11, она фотографируется в ультрафиолетовых лучах.

В силу избирательности поглощения различных компонент в ультрафиолетовой области спектра пятна, образованные различными компонентами, дадут изображения с различной степенью почернения. При этом картина, получаемая при фотографировании в лучах различной длины волны, будет различной. Фотографирование проводится в лучах трёх различных длин волн, и полученные снимки проектируются на одно место экрана с помощью трёх проекторов, перед каждым из которых устанавливается светофильтр, пропускающий один из трёх основных цветов: красный, зелёный и синий (можно и другие светофильтры, но вполне фиксированные при проведении данного анализа). Если все три изображения совмещены, то на экране получаем цветное пятно, цвет и оттенок которого соответствует только данной компоненте и будет различным для различных компонент исследуемой смеси. Выбор трёх длин волн при съёмке определяется характером поглощения компонент исследуемого вещества. Данный способ можно, однако, упростить, если заменить его простым проектированием пятна, освещённого тремя длинами волн из ультрафиолетовой области спектра, на флуоресцирующий экран, состоящий из стеклянной пластинки, на которую со стороны рассматриваемого объекта нанесены три тонких слоя флуоресцирующих веществ, возбуждающихся данными длинами волн. Е. М. Брумбергом сконструирован специальный прибор (ультрахе-

мископ) для проведения хроматографического анализа описанным методом. Подробное описание метода см.⁴⁶.

5. Измерение диэлектрической постоянной. Этот способ был предложен Г. В. Троицким⁸⁶ и состоит в измерении диэлектрической постоянной непосредственно вдоль колонки с помощью кольцеобразного конденсатора, соединённого с колебательным контуром генератора. Конденсатор надёт на колонку и может вдоль неё перемещаться.

6. Метод жидкой хроматограммы, описанный нами в настоящей статье несколько ранее.

VI. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АДСОРБЦИОННОГО МЕТОДА АНАЛИЗА

Этот метод может быть применён к анализу многих объектов, где процесс адсорбции не приводит к химическому изменению вещества. Мы не можем здесь рассмотреть все случаи его применения, а поэтому, разделяя их по целевому назначению*), ограничимся лишь некоторыми примерами.

1. Определение степени чистоты индивидуальных продуктов и очистка от примесей

Важно отметить, что при определении степени чистоты вещества можно утверждать, что вещество надёжно чистое, если при хроматографическом анализе с несколькими растворителями на нескольких адсорбентах вещество оказалось однородным, ибо, как указывает Цвет, «совершенно невероятно, чтобы адсорбционные изотермы двух веществ изменялись вполне одинаково при всех вариациях среды и адсорбента». В качестве примера определения степени чистоты вещества можно привести произведённый нами анализ кристаллического фиолетового красителя в ацетоновом растворе на окиси алюминия. В результате было выявлено, что данный краситель, по названию которого можно было думать, что он совершенно чист, обнаруживал в хроматограмме три кольца, т. е. содержал в качестве примеси два вещества, образующие два узких кольца в верхней части колонки. Спектрофотометрическая характеристика этих фракций показана на рис. 12. М. В. Пронина³⁷ применила данный метод для полного удаления семикарбазонов из растворов их в маслах при выделении альдегидов и кетонов из фракции сланцевого дёгтя. Другие методы, например метод многократной кристаллизации при охлаждении, не давали желаемого результата. Автор³⁷ указывает, что способ хро-

*) Подобное разделение было проведено многими авторами, в частности в статье Б. Я. Свешникова¹.

матографического анализа на силикагеле может применяться к дёгтевым, нефтяным и другим продуктам, в которых семикарбазоны хорошо растворимы. Ю. Ю. Лурье и Н. А. Филиппова.³⁰

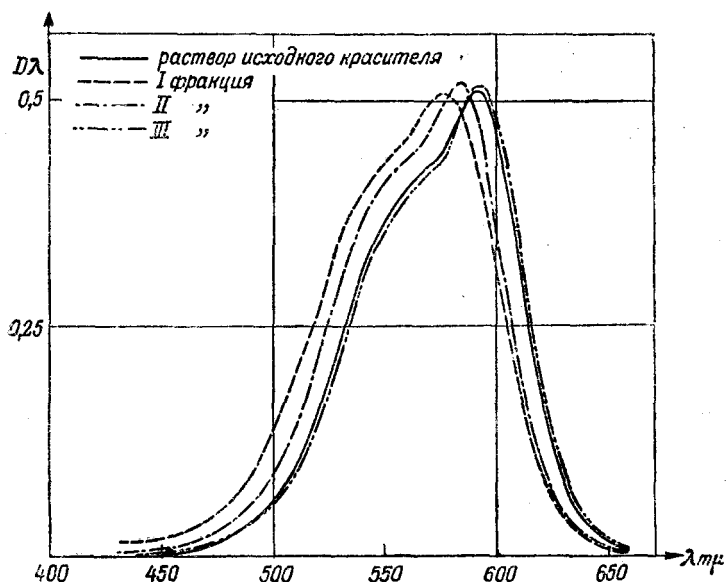


Рис. 12.

применили этот же метод для определения серы, фосфора и мышьяка в никеле и меди.

2. Разложение сложной смеси на компоненты и анализ отдельных компонентов

С этой целью адсорбционный анализ был впервые применён Ковальским³⁸ к гликогенам*) печени и мышц кролика, собаки, морской свинки, белой крысы и лягушки. Хроматограммы, полученные на карбонате кальция при проявлении дистиллированной водой и раствором иода, содержали от 2 до 11 колец. В результате анализа было установлено, что гликогены представляют собой сложные смеси индивидуальных химических веществ — полисахаридов гликогенного типа.

В различные периоды года и при различных функциональных состояниях организма гликогены давали ряд изменений в хроматограмме, выражающихся в том, что отдельные зоны её претерпевали количественные изменения.

*) Гликоген (животный крахмал) — сложный углевод, в виде которого в теле человека или животного откладываются запасы углеводов.

Хроматографический метод при анализе сложной смеси может с успехом заменить другие виды анализа: кристаллизацию, дистилляцию или сублимацию, а в некоторых случаях он просто бывает единственным.

Так, при определении алкалоидов в тинктуре белладонны обычно количественно находится вся сумма алкалоидов и только качественно — наличие того или иного из них.

Хроматографическим методом на колонке с силикагелем из водно-спиртового раствора белладонны при проявлении и последующей промывке колонки спиртом были выделены в отдельные фракции атропин, скополамин и гиациамин; они количественно определены методом люминесцентного титрования³⁹.

3. Выделение веществ из весьма разбавленных растворов

Этот случай имеет большое значение при определении вещества из смеси, если данное вещество находится в последней в ничтожной концентрации.

Так, при соответствующей обработке корней и стеблей *Cinchona* получается хинет (смесь извлеченных алкалоидов) с содержанием хинина в среднем около 4—6%. Так как хинет представляет собой смесь изомерных и близких к хинину соединений, то процесс выделения хинина из хинета является сложным и трудоёмким. Однако хроматографическим методом на колонке SiO_2 , приготовленного специальным образом, эта задача решается в течение часа⁴⁰.

4. Испытание и контроль продуктов⁴¹

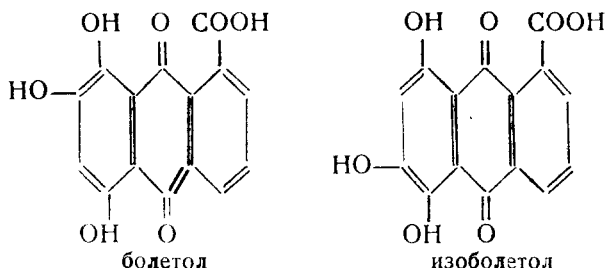
Хроматографический метод анализа, применённый с такой целью, носит чисто аналитический характер и находит применение преимущественно при анализе пищевых, фармацевтических и других продуктов. Для целей практического контроля даже не требуется получения хроматограммы, с помощью которой можно было бы установить точный химический анализ, а достаточно получить такую хроматограмму, с помощью которой можно было бы обнаружить возможные фальсификации (например, фальсификация вин, масел).

Для некоторых объектов отклонение от нормы замечается легко с помощью ультрафиолетового света.

5. Определение молекулярной структуры

Особенно ценным этот метод является для разделения как структурных, так и геометрических изомеров, а также для выяснения связи между адсорбционной способностью органических веществ и строением молекулы. Например, на окиси алюминия

можно разделить болетол и изоболетол⁴³. Эти вещества представляют собой изомеры, отличающиеся только положением гидроксильной группы:



Адсорбционная способность для некоторых линейных полициклических соединений возрастает с увеличением числа бензольных колец, т. е. более окрашенные соединения находятся наверху колонки⁴³.

В ряду жирных кислот адсорбционная способность увеличивается с числом двойных связей. Так, мы имеем следующий ряд по возрастающей адсорбируемости: стеариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая кислоты⁴⁴.

Хроматографический метод анализа особенно бурно развивается за последнее время; границы применения и усовершенствования его всё время раздвигаются.

В данной статье мы не ставили задачей охватить всё богатство материала, накопившегося в настоящее время, и ограничились кратким обзором, с указанием небольшого списка работ по различным отделам хроматографии.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. М. С. Цвет, Классики науки, Изд. АН СССР (1946).
2. Н. А. Шилов, Б. В. Некрасов, ЖРХО **60**, 103 (1928). Полный список работ Н. А. Шилова напечатан в Журнале «Успехи химии» за 1948 г.
3. Л. К. Лепинь, Ж. общ. хим. **1**, 388 (1931); Ж. физ. хим. **5**, 276 (1934).
4. М. М. Дубинин, ЖРХО **62**, 683, 1627, 1829 (1930); Ж. общ. хим. **1**, 289 (1931).
5. R. Kuhn, A. Winterstein und E. Lederer, Zeits. f. physiol. Chem. **197**, 141 (1931).
6. М. М. Дубинин, Ж. прикл. хим. **4**, 283 (1931).
7. А. А. Жуховицкий, Ж. физ. хим. **10**, 412 (1937); А. А. Жуховицкий, Я. Д. Забежинский, Д. С. Соминский, Ж. физ. хим. **13**, 308 (1939).
8. Е. Н. Гапон, Ж. общ. хим. **3**, 144, 153, 159, 660, 667 (1933); А. Н. Иванов, Е. Н. Гапон, Ж. физ. хим. **15**, 659 (1941); Е. Н. Гапон, Ж. физ. хим. **15**, 665 (1941); Ж. физ. хим. **20**, 297 (1946); Е. Н. Гапон, Т. Б. Гапон, Усп. хим. **17**, 452 (1948).

9. Е. Н. Гапон, Т. Б. Гапон, ДАН **60**, 401 (1948); ДАН **60**, 118, 817 (1948).
10. Б. Н. Никольский, Ж. физ. хим. **5**, 266 (1934); Б. Н. Никольский, В. И. Парамонова, Усп. хим. **8**, 1535 (1939).
11. М. А. Константинова-Шлезингер, Н. А. Горбачёва, Ж. аналит. хим. **3**, 213 (1948).
12. О. М. Тодес, Я. М. Биксон, ДАН **75**, 727 (1947).
13. М. В. Радужкевич, ДАН **57**, 471 (1947).
14. А. Н. Харин, П. Н. Протасов, Ж. физ. хим. **22**, 1219 (1948); А. Н. Харин, Л. М. Войтко, Ж. прикл. хим. **22**, 835, 1191, 1237 (1949).
15. A. L. Le Rosen, J. Am. Chem. Soc. **64**, 1905 (1942).
16. L. Zechmeister u. L. Cholnoky, Ann. d. Chem. **516**, 30 (1935).
17. E. Lederer, Bull. Soc. Chem. **5**, 897 (1939).
18. P. Ruggli, P. Iensen, Helv. Chem. Acta **18**, 625 (1935); **19**, 64 (1936).
19. Heilbron, Phipers, Biochem. J. **29**, 1369 (1935).
20. Хармадарьян М. О., Капелевич С. А., Ж. хим. промышл. **7**, 1484 (1930).
21. А. В. Киселёв, Ж. физ. хим. **13**, 452 (1949).
22. Т. П. Кравец, Х. Л. Песькина, З. В. Жидкова, Изв. АН СССР (сер. физич.) **14**, 493 (1950).
23. S. Classon, Arkiv. Kem. Min. Geol. **15A**, 9 (1941).
24. B. H. Ketelle, G. E. Boyd, J. Am. Chem. Soc. **69**, 2800 (1947).
25. E. H. Torkins, I. K. Кнум, W. E. Сohn, J. Am. Chem. Soc. **69**, 2769 (1947).
26. R. R. Goodall, A. A. Levi, Analyst **72**, 277 (1947).
27. Williams, Kirby, Science **107**, 481 (1948).
28. Т. Б. Гапон, Е. Н. Гапон, Ж. анал. хим. **4**, 131 (1949).
29. М. М. Сенявин, Усп. хим. **18**, 183 (1949).
30. L. Zechmeister, L. Cholnoky, Unjhelyi, Bull. Soc. Chem. biol. **18**, 1885 (1936).
31. A. Winterstein, K. Shön, Zeits. f. physiol. Chem. **230**, 139 (1934).
32. G. W. Sease, J. Am. Chem. Soc. **69**, 2242 (1947).
33. A. J. Martin, K. Z. Synge, Biochem. J. **35**, 1368 (1941).
34. Е. М. Брумберг, ДАН **25**, 473 (1939); Изв. АН СССР (сер. физич.) **6**, 32 (1942).
35. Е. М. Брумберг, И. Н. Бережная, В. В. Дуткинский, С. Е. Мануйлов, ДАН **74**, 747 (1950); Е. М. Брумберг, С. А. Гершгорин, ДАН **69**, 801 (1949).
36. Г. В. Троицкий, Биохимия **5**, 375 (1940).
37. М. В. Пронина, Зав. лабор. **14**, 1493 (1948).
38. В. В. Ковальский, Биохимия **13**, 131 (1948).
39. В. С. Краснова, Ж. прикл. хим. **18**, 284 (1945).
40. В. С. Краснова, Ж. прикл. хим. **18**, 86 (1945).
41. И. К. Козлов, Пробл. питания **7**, 26 (1938).
42. Kogl, Deijs, Ann. d. Chem. **545**, 23 (1935).
43. Winterstein, Vetter, Zeits. f. physiol. Chem. **230**, 169 (1934).
44. Trappe, Biochem. Zeits. **305**, 150 (1940); **306**, 316 (1940); **307**, 97 (1941).
45. Сборник статей по хроматографии (под редакцией М. М. Дубинина), № 1, 9 (1949).
46. Е. М. Брумберг, УФН **42** (1951).

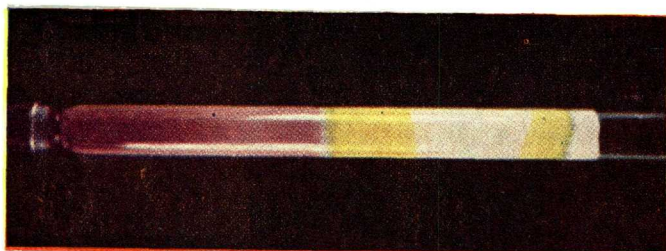


Рис. I.

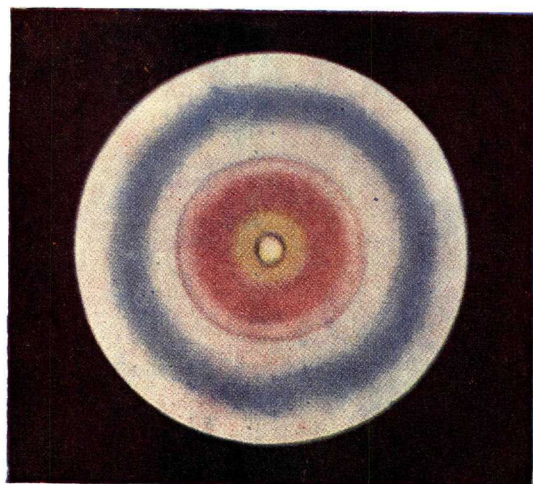


Рис. II.