

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – ЭКСПРЕСС МЕТОД АНАЛИЗА ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Кабиров Г.Ф., Кадырова Р.Г., Муллахметов Р.Р.

ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной
медицины имени Н.Э. Баумана»

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, метаболизм, яды.

Key words: thin-layer chromatography, metabolism, poisons.

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) – важный аналитический, физико-химический и микропрепаративный метод, который отличается простотой, высокой экономичностью и универсальностью. Тонкослойная (планарная) хроматография – оперативный метод хроматографии для анализа всех классов химических соединений, приобрела значение в качестве экспресс-метода анализа и широко используется в науке, промышленности, медицине, фармации, ветеринарии, в контроле загрязнений окружающей среды, в центрах Госсанэпиднадзора, стандартизации и метрологии и. т.д.[1–3].

В развитии современной тонкослойной хроматографии можно выделить следующие направления: инструментализация и автоматизация ТСХ на всех стадиях анализа; использование новых сорбционных материалов и элюентов; разработка новых способов и приемов хроматографирования. Перспективными считаются варианты: хроматографирование под давлением, в непрерывном потоке элюента, с управляемой газовой фазой (ТСХ-УГФ) [2, 4].

Исследования показали, что с помощью метода ТСХ можно получить важную информацию о характере метаболизма углеводов в биологических жидкостях при патологических состояниях организма [3]. Для ранней диагностики нарушений минерального обмена у животных предложен способ определения гексоз в сыворотке крови методом ТСХ [5].

Тонкослойная хроматография применяется в контроле лекарственных средств с целью использования их в терапевтической практике [6, 7] и ветеринарии [3].

Разделение и определение водорастворимых и жирорастворимых витаминов осуществляется методом ТСХ [3, 6, 8].

Хроматографические методы анализа являются надежным методом экспрессного контроля за содержанием в атмосфере и других объектах окружающей среды (а также продуктах питания) чрезвычайно токсичных

хлорсодержащих пестицидов и полихлорбифенолов, которые добавляют к ядохимикатам для усиления их действия [9].

Несмотря на все возрастающие усилия, направленные на ограничение применения некоторых хлорорганических пестицидов, в первую очередь персистентных и легко распространяющихся в окружающей среде хлорфеноксикарбоновых кислот и циклодиенов, их метаболиты и продукты фотолиза все еще обнаруживают в различных экологических системах и в организме человека.

Установлено, что в естественных условиях под действием УФ-облучения, высоких температур из хлорароматических соединений может образовываться

2, 3, 7, 8-тетрахлорбензодиоксин (диоксин), который является одним из самых сильных синтетических ядов ($LD_{50} 5 \cdot 10^{-5}$ г/кг) [10].

Для правильной токсикологической оценки пестицидов, установления остаточных их количеств в биологических объектах необходимы высокочувствительные, селективные методы анализа. В качестве таких методов могут служить хроматографические методы – ГЖХ, ТСХ [3], ВЭЖХ [11, 12].

Актуальными становятся также вопросы изучения токсических свойств новых лекарственных средств для ветеринарии и разработки эффективных методов их исследования [13].

В литературе имеется значительное число работ, посвященных обнаружению методом ТСХ пестицидов в различных пищевых продуктах, почве, воде, лекарственных растениях [3].

Определение содержания пестицидов в различных объектах включает несколько стадий:

– извлечение обнаруживаемых веществ (пестицидов) из проб органическими растворителями: диметилсульфоксидом из сливочного масла; гексаном из молока, овощей; петролейным эфиром из почвы; хлороформом из воды, кормов;

– очистка экстрактов;

– хроматографирование;

– определение R_F веществ и стандартов (пестицидов), нижний предел обнаружения – от 0,1 до 0,005 мкг.

Предложено [14] в тонкослойной (планарной) хроматографии использовать в качестве первичной основной величины удерживания не подвижность R_F , а новую величину – планарную подвижность R_p , которая для i -соединения определяется по уравнению:

$$R_{pi} = \frac{I_i}{L_i}; \text{ для стандартного соединения } (st),$$

$$R_{pst} = \frac{I_{st}}{L_{st}}$$

I_i , I_{st} – расстояние от линии старта до центра зоны i -го соединения и стандарта (st), соответственно. L_i , L_{st} – расстояние от центра зоны i -соединения и стандарта (st) до линии фронта подвижной фазы, соответственно. При этом величину относительного удерживания определяют по уравнению:

$$r_{ist} = \frac{R_{pst}}{R_{pi}},$$

которая идентична величине относительного удерживания (r_{ist}), используемой в колоночной хроматографии.

Количественное определение веществ (пестицидов) осуществляется по площади пятен на хроматограмме, путем сравнения с пятнами стандартов. Для сканирования пятен предлагается видеоденситометр «Сорбитол» [2, 3].

Тонкослойная хроматография пестицидов успешно осуществляется на сорбентах: силикагель, окись алюминия. Для хлорированных веществ удобным сорбентом является окись алюминия, пропитанная нитратом серебра. Часто пользуются готовыми хроматографическими пластинками силуфол УФ₂₅₄, выпускаемыми зарубежными фирмами [3].

В нашей стране пластины для ТСХ выпускают на полимерной (лавсановой) подложке ПТСХ-П и алюминиевой подложке ПТСХ-АФ – пластины «Сорбофил» [2].

Для хроматографического разделения пестицидов в качестве элюентов применяют малополярные (или средней полярности) системы растворителей. Ввиду того, что к пестицидам относятся соединения самой разной природы, описано значительное количество различных реагентов для их обнаружения (проявления) на хроматографических пластинках. Для хлорорганических пестицидов часто пользуются нитратом серебра в смеси с азотной кислотой или аммиаком, флуоресцентными реактивами (родамином В). Идентификацию фосфорорганических пестицидов проводят реагентами: иодом, нитратом серебра в смеси с бромфеноловым синим, *o*-динитробензолом. Удобно опрыскивание (или пропитка) сорбента флуоресцентными реактивами. Разделенные на хроматограмме вещества также детектируются при рассмотрении пластинки в УФ-свете (УФ₂₅₄ или УФ₃₆₅) [3].

Приведены величины R_F некоторых хлорорганических пестицидов (табл.1) [3, 6].

1. Величина R_F хлорорганических пестицидов [3]

Пестицид	Элюент	Величина R_F	
		На окиси алюминия	На силикагеле
Гексахлорбензол	Гексан	0,90	–
Альдрин	Гексан	0,83	0,68
ДДЭ	Гексан	0,78	0,66
	Гексан-ацетон (6:1)	0,87	–
Гептахлор	Гексан	0,76	0,65
<i>o, n'</i> -ДДТ	Гексан	0,67	0,54
<i>n, n'</i> -ДДТ	Гексан	0,61	0,50
	Гексан-ацетон (6:1)	0,75	–
Линдан	Гексан	0,34	0,20
ДДД	Гексан	0,30	0,40
	Гексан-ацетон (6:1)	0,62	–
Метоксихлор	Гексан	0,15	–
	Гексан-ацетон (6:1)	0,60	–
Кельтан	Гексан	0,05	–
	Гексан-ацетон (6:1)	0,40	–
	Бензол	0,44	–
Тедион	Гексан	0,03	–
	Гексан-ацетон (6:1)	0,55	–
Эфирсульфонат	Гексан	0,00	–
	Гексан-ацетон (6:1)	0,45	–
Диктал	Гексан-ацетон (2:1)	0,90	–

Из таблицы 1 следует, что в указанной системе растворителей разделение эффективнее идет на окиси алюминия.

Шесть изомерных гексахлорциклогексанов (из которых эффективен только γ -изомер) подвергли разделению на силиуфол в системе растворителей: петролейный эфир – четыреххлористый углерод (1 :1); гексан; циклогексан-хлоро

форм (8 : 2); гептан-пропанол-2 (10 : 0,5) [6].

Целый ряд веществ удалось разделить простой или двумерной хроматографией в гептане, содержащем 0,3 % этанола. Силуфол удобен для разделения изомеров гексахлорциклогексана и гексахлорбензола. Для элюирования служил *n*-гептан для обнаружения – смесь нитрата серебра и 2-феноксидэтанол. При применении силикагеля, пропитанного 5 % жидким парафином, элюировали 96 %-ным этанолом. Хорошо разделялись α -, β -, γ -, и δ -изомеры гексахлорциклогексана и гексахлорбензола.

Для разделения ДДТ в присутствии полигалогенированных дифенилов использовали двумерное элюирование в *S*-образной камере. В первом направлении элюировали гептаном, во втором смесью – гептан-ацетон (98 : 2) [6].

2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) и метаболит 2,4-ДХФ (2,4-дихлорфенол) разделяли на силуфоле. В качестве элюента использовали смесь растворителей: циклогексан, бензол, ледяная уксусная кислота в объемном соотношении 10 : 2 : 2. Для обнаружения применяли 0,1 н раствор нитрата серебра в 3 н.растворе азотной кислоты. Значения R_F : для 2,4-Д – 0,33; 2,4-ДХФ – 0,42 [3].

Приведены величины R_F некоторых фосфорорганических пестицидов (табл.2) [3].

2. Величина R_F фосфорорганических пестицидов [3]

Пестицид	Элюент			Пестицид	Элюент		
	Гексан-ацетон (4 : 1)	Гексан-ацетон (7 : 3)	хлороформ		Гексан-ацетон (4 : 1)	Гексан-ацетон (7 : 3)	хлороформ
Амифос	0,04	0,18	0,00	Метилнитрофос	0,33	0,46	0,95
Антио	0,18	0,32	0,18	Фосфамид	0,08	0,22	0,05
Афуган	0,35	0,46	–	Сайфос*	0,02	–	0,00
Базудин	0,40	–	–	Цианокс	0,27	0,40	0,88
Бромфос	0,60	0,72	–	Цидиал	0,42	0,51	–
Валексон	0,54	–	–	Фенкаптон	0,64	0,79	–
Гардона	0,35	–	–	Фозалон	0,35	0,46	0,84
Карбофос	0,29	0,40	0,59	Фталофос	0,22	0,36	0,48
Метафос	0,35	0,48	0,89				

* В системе гексан : ацетон (1 : 2) $R_{F\text{сайфоса}}$ 0,40.

Значительную группу фосфорорганических пестицидов представляют собой тиофосфаты. Для хроматографического разделения тиофосфатов пользуются системами растворителей средней полярности. В качестве сорбента служат преимущественно силикагель. Метод определения антио и фосфамида в кормах основан на извлечении их хлороформом с последующей очисткой экстракта. Хроматографическое разделение проводят на силикагеле в системе растворителей хлороформ-ацетон (9 : 1).

Для обнаружения антио и фосфамида применяют аммиачно-ацетоновый раствор нитрата серебра. Значения R_F : для антио – 0,72; фосфамида – 0,45 [3].

Фосфорорганические пестициды (карбофос, метафос, фосфамид, фталофос) определяли в лекарственных растениях на газовом хроматографе «Кристалл 2000» [3].

Заключение. Из литературных данных и собственных экспериментальных исследований следует, что тонкослойная хроматография (ТСХ) является экспресс-методом анализа химических соединений различных классов. ТСХ широко используется в медицине,

фармации, ветеринарии, токсикологических исследованиях и других областях.

ЛИТЕРАТУРА: 1. Березкин В.Г. О вкладе Н.А. Измайлова и М.С. Шрайбер в развитие тонкослойной хроматографии. // ЖАХ. – 2008. – т.63, №4, с. 438–443; 2. Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия. – СПб.: НПО «Мир и семья», ч.II, 2003. С. 338–340; 3. Кадырова Р.Г. Тонкослойная хроматография. Идентификация и разделение углеводов, витаминов и токсичных соединений: Монография. – Казань: Казан.гос.энерг.ун-т, 2010, – 96 с. 4. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Березкин В.Г., и др. Новый метод тонкослойной хроматографии с управляемой газовой фазой. // ЖАХ – 2009. – т.64, №12, с.1256–1264; 5. Пат. 2101705. Россия. RUCI. (6G01 № 33/50).12.01.95. Способ определения галактозы в сыворотке крови / Р.Г. Кадырова, М.Г. Зухрабов; 6. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. – М.: Мир. ч. II, 1980. с. 382–387, с.510–519.; 7. Темердашев З.А., Киселева Н.В., Клищенко Р.А., Удалов А.В. Разделение и идентификация соединений ряда фенотиазина методом тонкослойной хроматографии. // ЖАХ. – 2006. – т. 61, № 1. с. 6–9; 8. Бородина Е.В., Китаева Т.А., Сафонова Е.Ф., Селеменев В.Ф., Назарова А.А. Определение α -токоферола и эргокальцеферола методом тонкослойной хроматографии.// ЖАХ. – 2007. – т.62, № 11, с.1181–1185; 9. Другов Ю.С., Беликов А.Б., Дьякова Г.А., Тульчинский В.М. Методы анализа загрязнений воздуха. – М.: Химия, 1984. с. 232–253.; 10. Гранберг И.И. Органическая химия. – М.: Дрофа, 2002. с.569–588.;11. Хроматография. Практическое приложение метода. ч.2. пер. с англ.(Ш. Чармс, Л.Фишбейн, Дж. Вагман и др.) / Под ред. Э.Хефтмана. –М.: Мир, 1986. 422 с.; 12. Трemasов М.Я., Папуниди К.Х., Степанов В.И., Шангараев Н.Г, Иванов А.В. Принципы диагностики отравлений животных. // Ветеринария. – 2010. – № 6.56–58 с. 13. Смирнов А.М. Достижения и актуальные проблемы ветеринарной фармакологии и токсикологии. // Ветеринария.–2010. – №2. 3–6 с. 14. Березкин В.Г. Новый подход к определению величин относительного удерживания в тонкослойной жидкостной хроматографии. // ЖАХ.– 2007. т.62, №4 406–408 с.

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – ЭКСПРЕСС МЕТОД АНАЛИЗА ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Кабилов Г.Ф., Кадырова Р.Г., Муллахметов Р.Р.

Резюме

Тонкослойная хроматография (ТСХ) является экспресс-методом анализа химических соединений различных классов. ТСХ широко используется в медицине, фармации, ветеринарии, токсикологических исследованиях и других областях.

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY –EXPRESS METHOD OF CHEMICAL COMPOUNDS ANALYSIS

Kabirov G.F., Kadyrova R.G., Mullakhmetov R.R.

Summary

Thin-layer chromatography (TLCH) is an express method of chemical compounds analysis of different classes. Thin-layer chromatography is widely used in medicine, pharmaceuticals, veterinary, toxicologic investigations and other spheres of science.

УДК 619:615.33:616.348-002:636.4

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕТРАГОЛДА ПРИ КОЛИБАКТЕРИОЗЕ ПОРОСЯТ

Казимиров О.В., Бригадиров Ю.Н., Михайлов Е.В.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии, г.Воронеж

Ключевые слова: колибактериоз, поросята, терапевтическая эффективность, тетраголд.

Key words: colibacteriosis, pigs, therapeutic efficacy, tetragold.

Одной из главных проблем промышленного свиноводства являются болезни молодняка свиней, среди которых чаще всего встречаются желудочно-кишечные болезни бактериальной этиологии. Многочисленными исследованиями в нашей стране и за рубежом установлено, что болезни молодняка на фоне неблагоприятного воздействия на животных предрасполагающих факторов, снижающих общую неспецифическую резистентность организма, имеют инфекционную природу (Ю.Н. Бригадиров, 2002; А.Г. Шахов с соавт., 2003).

Наиболее широко распространены эшерихиозы и сальмонеллёзы. По данным И.А. Волкова (2008), потери поросят от колибактериоза в первые недели после опороса составляют от 10 до 50%.

В настоящее время, для борьбы с данным заболеванием поросят, превалирует стратегия вакцинопрофилактики и антибиотикотерапии. Однако недостаточная эффективность специфических средств и антимикробных препаратов при колибактериозе объясняется значительным разнообразием антигенного состава и факторов патогенности возбудителя. В связи с этим в решении проблем,