

У. МАРГНА

R_x — ПОЛЕЗНЫЙ КРИТЕРИЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕИЗВЕСТНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ РАЗДЕЛЕНИИ НА БУМАГЕ

Величина R_f , представляющая собой расстояние пятна изучаемого вещества от линии старта, выраженное в долях расстояния фронта растворителя от той же линии, является практически единственным цифровым параметром, который до сих пор нашел широкое применение для характеристики поведения отдельных компонентов анализируемой смеси при их хроматографическом разделении на бумаге. Теоретически константа R_f как функция коэффициента распределения вещества между двумя жидкими фазами растворителя — постоянная величина, которая по крайней мере в случае распределительной хроматографии, куда относится преобладающее большинство всех хроматографических работ на бумаге, не зависит от положения места нанесения разделяемой смеси, расстояния фронта растворителя от источника последнего, а при обычно применяемых концентрациях также и от количества веществ в стартовой точке (Токштейн и др., 1962). Таким образом, теоретически значение R_f в каком-то определенном растворителе должно быть весьма специфической константой для данного конкретного вещества X . Нетрудно убедиться, что при действии закона постоянства R_f сравнение экспериментально установленных значений R_f с табличными или теоретическими может служить простейшим и наиболее удобным способом для идентификации неизвестных веществ изучаемой смеси. Однако добиться удовлетворительной воспроизводимости R_f в практической работе весьма трудно. Существует много причин чисто технического порядка, которые в большей или меньшей мере обуславливают различия в величинах R_f при применении одной и той же системы растворителей. К таким факторам, в первую очередь, относятся качество бумаги и температура, а также степень насыщенности бумаги и атмосферы камеры составными частями системы растворителей, количество жидкости в сосуде для растворителя, форма и объем камеры, приемы работы при нанесении, сушке и проявлении и т. д. Константность величины R_f для данного вещества обеспечена лишь в строго стандартных условиях, точное соблюдение которых, однако, нереально и практически неосуществимо не только в работе разных исследователей, но и в экспериментах одного и того же аналитика. Очень трудно соблюдать во время хроматографирования и постоянство температуры в пределах $0,5^\circ$, являющееся одним из основных условий, при которых может быть достигнута воспроизводимость величин R_f (Bate-Smith, Westall, 1950).

Невозможность всеобщей и полной стандартизации процесса хроматографирования значительно уменьшает диагностическую ценность величин

R_f и, хотя в работах с применением хроматографии на бумаге такие данные почти всегда представлены, они большей частью имеют лишь иллюстративное значение. То же самое можно сказать и о сравнительно редко применяемой величине R_M , являющейся логарифмическим производным величины $R_f - R_M = \log \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$ (Bate-Smith, Westall, 1950).

Вследствие ненадежности критерия R_f при идентификации обычно прибегают к прямому сравнению с метчиками, но из-за малодоступности или отсутствия аутентичных веществ и этот способ, несмотря на свою простоту и несомненную безукоризненность, часто неприменим или связан с большими затруднениями. В то же время метод метчиков обладает достоинством, которое при наличии хотя бы одного только стандарта значительно увеличивает как теоретическое значение самого метода, так и область его практического использования. В частности, он дает возможность перейти к применению нового цифрового критерия, который до сих пор, как нам кажется, незаслуженно не используется исследователями. Речь идет о величине, условно обозначаемой R_X , которая представляет собой расстояние пятна изучаемого вещества от линии старта, отнесенное не к фронту, а к расстоянию пятна какого-либо стандартного вещества X от той же линии. Следует отметить, что в справочниках по хроматографии на возможность оценить положение пятен компонентов изучаемой смеси по стандартному веществу обычно указано, но среди громадного числа ежегодно публикуемых экспериментальных данных с применением распределительной хроматографии этот метод встречается лишь в редких случаях. Тем не менее показатель R_X имеет по сравнению с величиной R_f ряд преимуществ, особенно важных для практической хроматографической работы в обыкновенной неспециализированной биохимической лаборатории, где соблюдение требуемой стандартности затруднительно.

В настоящей работе на примере хроматографического анализа антоцианидиновых пигментов сделана попытка охарактеризовать практическую ценность и применимость величины R_X . На основании чисто эмпирических данных дан сравнительный анализ воспроизводимости R_f и R_X в нестрогих стандартизованных (в частности, по температуре) условиях, что больше всего соответствует обычным условиям работы в рядовых лабораториях.

Материал и методика

Препараты. В качестве испытуемых веществ использовались антоцианидиновые агликаны—дельфинидин, цианидин и пеларгонидин. Препарат дельфинидина и цианидина был выделен в виде смеси из плодов черники по общеизвестной методике (Hayashi, 1962), препарат цианидина выделяли из гипокотилей 5-дневных проростков гречихи. Образцом пеларгонидина служил коммерческий препарат австрийской фирмы «Austrowagen». При одновременном изучении всех трех антоцианидинов исходная смесь изготовлялась путем добавления к выделенному из плодов черники препарату небольшого количества аутентичного препарата пеларгонидина с таким расчетом, чтобы концентрация последнего в получаемой смеси оказалась примерно равной концентрации дельфинидина и цианидина. Образцы смесей антоцианидинов наносились на хроматографическую бумагу в виде раствора в изоамиловом спирте.

Бумага. Работа проводилась на двух сортах бумаги: на отечественной бумаге марки «Б» и на дважды промытой кислотой бумаге марки FN-11 производства Германской Демократической Республики. Бумага применялась в виде полос шириной 4 и длиной 54 см, причем на один из концов каждой 4-сантиметровой полосы наносилась только одна порция (0,02—0,05 мл в зависимости от концентрации исходного раствора) изучаемой смеси. Диаметр стартовых пятен не превышал 6—8 мм.

Растворители. А — уксусная кислота : концентрированная соляная кислота : вода в соотношении 30 : 3 : 10, или так наз. Форестальский растворитель; Б — муравьиная

кислота : концентрированная соляная кислота : вода в соотношении 5 : 2 : 3; В — *n*-бутанол : уксусная кислота : вода в соотношении 4 : 1 : 5 (органическая фаза) (Harborne, 1958). При работе с последней системой растворителей ответственная хроматографическая бумага марки «Б» предварительно обрабатывалась 5%-ной соляной кислотой.

Прочие условия. Хроматографирование проводилось по восходящей технике в цилиндрических стеклянных камерах высотой 60 и диаметром 23 см. В одну камеру помещалось по 9—10 хроматографических полос; количество растворителя на две камеры — 400—500 мл. Во избежание разложения антоцианидинов под действием света камеры во время хроматографирования помещались в закрытые боксы.

Температура в помещении, в котором находились боксы с камерами, а также в боксах не регулировалась, а колебалась в зависимости от окружающей температуры в пределах 17—27°C. Вследствие этого хроматографирование разных образцов проводилось при неодинаковой температуре, причем разница между минимальной и максимальной температурами при хроматографировании одного и того же образца достигала 5°, а между средними температурами хроматографирования разных образцов 10°.

Процесс хроматографирования прекращали по достижении фронтом растворителя расстояния 28—40 см от стартовой линии, в зависимости от примененной смеси растворителя. Хроматограммы высушивались в вентиляционных шкафах при комнатной температуре.

При оценке положения пятен на хроматограммах расстояние их продвижения измерялось от стартовой линии до переднего края пятен. Значения R_X во всех случаях вычислялись в виде отношений расстояний пятен с более низким расположением к расстоянию пятен более высокого расположения.

Каждый эксперимент с определенной комбинацией веществ в определенной смеси растворителей состоял из 7 или 20—21 отдельных серий по 9 или 10 хроматограмм в каждой.

Математическая обработка. Для оценки воспроизводимости R_f и R_X вычисляли абсолютные и относительные ошибки как по отдельным сериям, так и по целой группе серий в пределах одного эксперимента. Мерилом абсолютной ошибки отдельной серии служило стандартное отклонение s , вычисленное по общеизвестным статистическим формулам (Weber, 1961), а мерилем относительной погрешности — коэффициент вариации V , представляющий собой отношение стандартного отклонения s к средней величине серии \bar{x} , выраженное в процентах. Средняя абсолютная ошибка \bar{s} по всему эксперименту вычислялась в виде квадратного корня из средней дисперсии соответствующих серий (Weber, 1961), а средняя относительная погрешность V целого эксперимента — в виде геометрической средней из коэффициентов вариации соответствующих серий.

Границы доверительного интервала для неизвестного генерального среднего значения $R_f^?$ вычисляли по формуле $\bar{x} \pm ts/\sqrt{n}$, а границы доверительного интервала для разности между двумя генеральными средними $R_f^?$ — по формуле $(x_1 - x_2) \pm ts \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$ (Бейли, 1962), где n — число хроматограмм в серии, s — стандартное отклонение по серии и t — табличное значение критерия Стьюдента, соответствующее данному n .

В большинстве случаев значения R_f , R_X и s представлены в тексте для удобства в виде произведений на коэффициент 1000.

Результаты и обсуждение

Теоретические соображения о применимости значений R_X . Непосредственной причиной различий R_f в разных повторностях одного и того же эксперимента является непропорциональное изменение скоростей передвижения фронта растворителя и пятен изучаемых веществ на бумаге, причем повышение относительной скорости передвижения фронта приводит к заниженным значениям R_f , а повышение относительной скорости передвижения разделяемых веществ по сравнению со скоростью движения растворителя — к значениям R_f , превышающим теоретически ожидаемые. В идеальной обстановке, в абсолютно стан-

дартизованных условиях, этого не наблюдается, и R_f является константной величиной. Следовательно, при соблюдении полной стандартности отношение двух значений R_f , а тем самым и величина R_X также должны быть константны для данной системы растворителей (рис. 1):

$$\frac{R_f A}{R_f X} = \frac{af}{fx} = \frac{a}{x} = R_X A = \text{const.}$$

Из уравнения следует, что при определенном сочетании обстоятельств величина R_X может оставаться константой и в таких случаях, когда экспериментально установленные значения R_f изученных веществ оказываются неконстантными и резко отличаются от теоретически ожидаемых величин. Это имеет место, когда причины, обуславливающие определенные сдвиги в значениях R_f , не нарушают пропорциональности в скоростях передвижения компонентов разделяемой смеси на бумаге. Например, если какое-нибудь несоблюдение стандартности вызывает увеличение скорости передвижения как вещества А, так и вещества Х на рис. 1 в полтора раза, не оказывая при этом существенного влияния на передвижение растворителя, то это приводит к изменению значения $R_f A$ с 0,3 на 0,45 и $R_f X$ с 0,5 на 0,75, а значение $R_X A$ по-прежнему остается равным 0,6.

Конечно, в практической работе, даже при теоретической допустимости такого предположения, пропорциональность скоростей передвижения веществ вряд ли сохраняется в любых комбинациях внешних условий, но тем не менее именно отсюда вытекают основные положения о преимуществах величины R_X в качестве специфического параметра для идентификации. Вероятность того, что действие какого-то фактора, оказывающегося способным вызывать варьирование значений R_f , имеет противоположный характер по отношению к одновременно разделяемым веществам или распространяется лишь на отдельные компоненты смеси, сравнительно невелика. При хроматографировании химически родственных соединений или производных одного гомологического ряда такая вероятность практически должна быть исключена и влияние мешающего фактора, по всей вероятности, ограничивается лишь не совсем равносильно выраженным действием его в одном направлении. Это означает, что R_X должна быть значительно менее лабильной величиной и отличаться значительно лучшей воспроизводимостью, чем величины R_f отдельных веществ.

Правдоподобность приведенных умозрительных заключений подтверждается нижеизложенными экспериментальными данными.

Воспроизводимость единичных значений R_f и R_X в пределах одновременно проведенной хроматографической серии. Имея в виду подобранную нами схему проведения экспериментов, согласно которой проявление всех хроматографических полос одной и той же серии проводилось одновременно и в одной и той же камере, можно было ожидать, что расхождения между значениями R_f отдельных пятен одного и того же вещества не особенно велики и воспроизводимость R_f в пределах

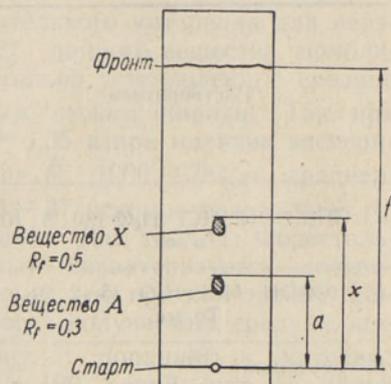


Рис. 1. Схематическое изображение хроматограммы с пятью веществами А и Х (a , x и f — соответственно расстояния веществ А, Х и фронта растворителя от стартовой линии).

Таблица 1

Средние значения \bar{R}_f и \bar{R}_X и средние абсолютная и относительная ошибки \bar{s} и \bar{V} в одновременно проведенных хроматографических сериях

а. Средние значения \bar{R}_f и \bar{R}_X

Растворитель	Бумага	Количество серий	Число хроматограмм в серии	$\bar{R}_f \cdot 1000$			$\bar{R}_X \cdot 1000$		
				Дел	Циа	Пел	Дел Циа	Дел Пел	Циа Пел
А. $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{HCl} : \text{H}_2\text{O}$ (30 : 3 : 10) То же	FN-11	20	10	387	599	850	646	455	704
	Б	7	9	—	559	784	—	—	713
Б. $\text{HCOOH} : \text{HCl} : \text{H}_2\text{O}$ (5 : 2 : 3) То же	FN-11	20	10	166	285	449	582	369	634
	Б	7	9	—	213	345	—	—	617
В. <i>n</i> -бутанол: $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$ (4 : 1 : 5) То же	Б	21	10	—	693	867	—	—	800
	Б	7	9	—	696	869	—	—	801

б. Средние абсолютная и относительная ошибки

Растворитель	Бумага	Количество серий	Число хроматограмм в серии	$\bar{s} \cdot 1000$						$\bar{V}, \%$					
				R_f			R_X			R_f			R_X		
				Дел	Циа	Пел	Дел Циа	Дел Пел	Циа Пел	Дел	Циа	Пел	Дел Циа	Дел Пел	Циа Пел
А То же	FN-11	20	10	18	27	35	13	14	13	4,01	3,84	3,72	1,74	2,74	1,60
	Б	7	9	—	28	37	—	—	9	—	3,67	3,56	—	—	1,20
Б То же	FN-11	20	10	6	9	13	9	7	7	3,37	2,92	2,51	1,37	1,90	1,10
	Б	7	9	—	9	13	—	—	11	—	3,48	3,18	—	—	1,66
В То же	Б	21	10	—	24	21	—	—	12	—	2,83	2,07	—	—	1,43
	Б	7	9	—	22	16	—	—	12	—	2,99	1,73	—	—	1,44

серии хорошая. Однако, несмотря на одинаковый для всех хроматограмм серии температурный режим, достаточно было уже различий в их пространственном расположении в камере и незначительных градиентных явлений, могущих иметь место внутри сосуда, чтобы проявились существенные различия в значениях R_f . Это в значительной мере сказывается на достоверности единичных определений R_f . Как видно из табл. 1, б, при 9—10-кратных повторностях хроматограмм в одной серии каждое значение R_f может быть определено лишь с точностью, при которой средняя относительная ошибка не ниже 3—4%. В некоторых случаях выборочная ошибка равнялась даже 6—7% и лишь при веществах, имеющих R_f в пределах 0,85—0,90 и больше (например, пеларгонидин в растворителе В), можно надеяться, что расхождения между значениями R_f отдельных пятен серии и выборочным средним не будут превышать 2%.

В абсолютных цифрах средняя ошибка, которую нужно было бы учитывать в серии при каждом отдельном значении R_f , колебалась в пределах 20—40 относительных единиц по шкале $R_f \cdot 1000$ (табл. 1, б). Возможная ошибка единичных измерений немножко меньше лишь у веществ со сравнительно низкими значениями R_f ($R_f = 0,15 \div 0,30$; см. табл. 1, а).

При таких отклонениях границы доверительного интервала для неизвестного генерального среднего значения R_f^0 данного вещества, приближениями к которому являются экспериментально установленные средние значения \bar{R}_f отдельных серий хроматограмм, весьма широки. Так, при работе с 5%-ным уровнем значимости $P=0,05$ и при наличии экспериментально найденного среднего значения $\bar{R} \cdot 1000 = 784$ и среднего стандартного отклонения для серии $\bar{s} \cdot 1000 = 37$ искомое неизвестное генеральное среднее значение R_f^0 пеларгонидина (см. табл. 1: Форестальский растворитель, серии из 9 хроматограмм) характеризуется доверительным интервалом от 756 до 812. Это значит, что при повторении аналогичных 9-хроматограммовых серий 95% всех получаемых средних значений \bar{R}_f , принадлежащих пеларгонидину, попадает в интервал $R_f \cdot 1000 = 756 \div 812$. В пяти случаях из 100 серий нет и такой гарантии и среднее значение $R_f \cdot 1000$ пеларгонидина может отклоняться еще больше, т. е. оказаться ниже 756 или выше 812.

В таких обстоятельствах вынесение решения об идентичности или неидентичности изучаемого вещества с каким-то известным стандартом по сравнению их значений R_f весьма затруднительно, тем более что границы доверительного интервала для разности между двумя генеральными средними еще шире. Исходя из того же примера с пеларгонидином при том же 5%-ном уровне значимости, оказывается, что разность между генеральными средними $R_{f1}^0 \cdot 1000 - R_{f2}^0 \cdot 1000 = 0$ характеризуется доверительным интервалом ± 37 . Практически это означает, что по R_f от пеларгонидина с 95%-ной вероятностью могут быть различены только те вещества (неизвестные в начале эксперимента антоцианидиновые производные), средние значения R_f которых имеют по крайней мере 74-единичную разницу по сравнению со средним значением R_f пеларгонидина. Если это условие не выполнено, их различение от пеларгонидина статистически не обосновано, и все они должны быть признаны тождественными с этим стандартом. В работах, требующих применения 1%-ного уровня значимости $P=0,01$, минимальная разница между средними \bar{R}_f , которая при том же стандартном отклонении $s \cdot 1000 = 37$ может быть признана достаточной для достоверного различения двух веществ, равняется уже 102 единицам по шкале $R_f \cdot 1000$. Это составляет около $\frac{1}{8}$ общей протяженности практически используемой части этой шкалы ($100 \div 900$).

Для целей идентификации такая точность явно неудовлетворительна.

Воспроизводимость значений R_X в тех же условиях — при одновременном проявлении хроматограмм одной серии — гораздо лучше. Средняя относительная ошибка при определении отдельных значений R_X всегда ниже относительных ошибок соответствующих R_f , причем в большинстве случаев она колебалась в пределах 1,0—1,7% от среднего значения \bar{R}_X по серии (см. табл. 1, б). Правда, при значениях R_X , вычисленных для пары веществ с относительно большой разницей в скорости передвижения на бумаге, ошибка, как правило, несколько больше, но лишь в редких случаях она превышала 3—4%. Характерен в этом смысле один из экспериментов с цланидином и пеларгонидином при их разделении в системе растворителей с муравьиной кислотой (рис. 2). Во всех 20

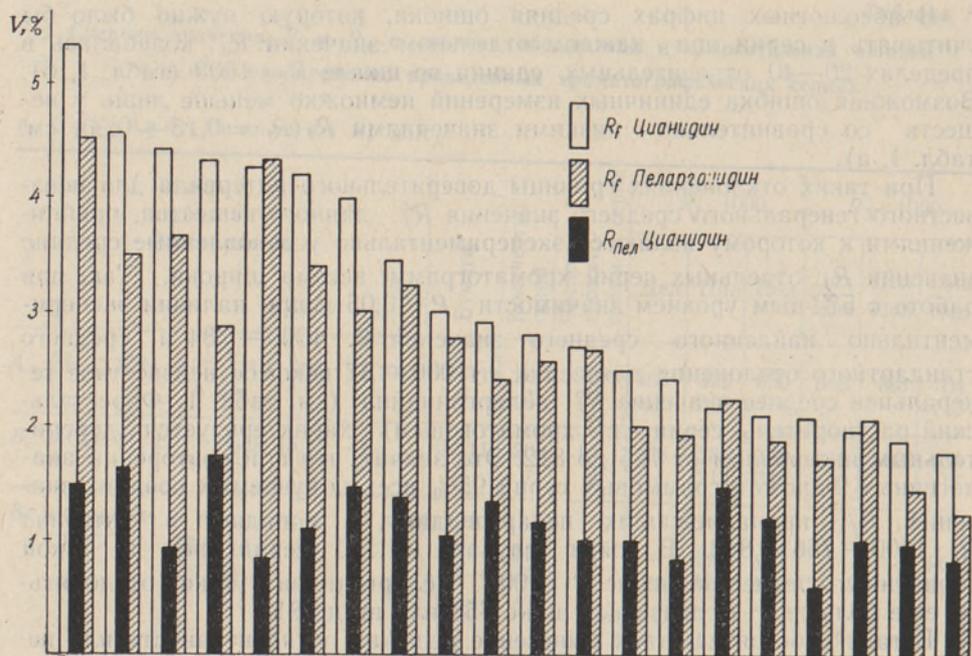


Рис. 2. Относительная ошибка V (в процентах) значений R_f цианидина, R_f пеларгонидина и R_{pel} цианидина в одном из экспериментов по 20 серий.

Растворитель Б, бумага — FN-11, число хроматограмм в каждой серии — 10.

сериях этого эксперимента относительная ошибка значений R_{pel} для цианидина ниже уровня 2%, равняясь в среднем только 1,10% среднего значения \bar{R}_{pel} цианидина по серии. Средняя относительная ошибка же значений R_f цианидина почти в 3 раза больше — 2,92%, а в некоторых сериях она поднималась даже до 4,5—5%. Ошибка заметна больше и у значений R_f самого пеларгонидина: средняя относительная ошибка равнялась 2,51% (см. табл. 1, б).

Вместе с тем у значений R_x гораздо меньше и размеры возможной абсолютной ошибки; исключение составляют лишь вещества с низкими значениями R_f , у которых разницы между абсолютными ошибками R_f и R_x незначительны. Как видно из табл. 1, б, средняя ошибка, которую можно было бы приписать каждому из отдельных значений R_x по серии, составляет около 10—15 единиц по шкале $R_x \cdot 1000$. Это приблизительно от 1,5 до 3 раз меньше, чем соответствующие цифры у значений R_f , что скажется и на значительно более сжатых границах доверительного интервала для искомого генерального среднего значения R_x^0 данной пары веществ. Например, в том же эксперименте, откуда был взят и изложенный выше пример с пеларгонидином, доверительный интервал для генерального среднего R_f^0 цианидина характеризовался шириной (по шкале $R_f \cdot 1000$) 559 ± 22 . В то же время ширина доверительного интервала для генерального среднего R_{pel}^0 цианидина (по шкале $R_x \cdot 1000$) составляет только 713 ± 7 , т. е. более 3 раз уже, несмотря на то, что ширина доверительного интервала для генерального среднего R_f^0 самого пеларгонидина, принятого за стандарт, даже больше, чем у R_f^0 цианидина — 784 ± 28 (см. табл. 1).

Приблизительно такое же соотношение между точностью и воспроизводимостью значений R_f и R_X установлено и в остальных экспериментах.

Воспроизводимость значений R_f и R_X в хроматографических сериях, проведенных в разные сроки. Ценность величин R_f и R_X в качестве возможных критериев для идентификации веществ зависит не только от воспроизводимости их единичных значений в пределах одной и той же серии одновременно проявленных хроматограмм, но и от относительной стабильности и константности соответствующих значений во времени. В этом смысле величины R_f значительно уступают величинам R_X , что лучше всего проявляется при сравнении средних значений как R_f , так и R_X серий, проведенных в разные сроки.

Таблица 2

Ширина вариации средних значений R_f и R_X

Растворитель		$\bar{R}_f \cdot 1000$			$\bar{R}_X \cdot 1000$		
		Дел	Циа	Пел	Дел Циа	Дел Пел	Циа Пел
А. $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{HCl} : \text{H}_2\text{O}$ (30 : 3 : 10) Бумага — FN-11, 20 серий по 10 хроматограмм	$R_{\text{макс}}$	419	631	892	664	489	737
	$R_{\text{мин}}$	361	559	786	634	431	682
	d	58	72	106	30	58	55
Б. $\text{НСOOH} : \text{HCl} : \text{H}_2\text{O}$ (5 : 2 : 3) Бумага — FN-11, 20 серий по 10 хроматограмм	$R_{\text{макс}}$	177	300	467	594	381	645
	$R_{\text{мин}}$	145	253	411	567	352	615
	d	32	47	56	27	29	30
В. <i>n</i> -Бутанол : $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$ (4 : 1 : 5) Бумага — «Б», 20 серий по 10 хроматограмм	$R_{\text{макс}}$		739	910			818
	$R_{\text{мин}}$		623	781			773
	d		116	129			45

Из табл. 2 видно, что ширина вариации в выборках из 20 средних значений R_f отдельных серий весьма существенна и может в абсолютных цифрах порой превышать в 2—2,5 раза соответствующую ширину выборки из средних значений R_X . В процентном отношении отличие между размерами варьирования двух величин еще больше. Так, для R_f дельфинидина разница между максимальным и минимальным значениями указанных 20-членных выборок составляла в случае Форестальского растворителя 15%, а в случае растворителя с муравьиной кислотой — 19,3% среднего значения выборки. Для $R_{\text{Циа}}$ дельфинидина же соответствующая разница в обоих растворителях равнялась лишь 4,6%, т. е. по сравнению со средними значениями R_f дельфинидина средние по разным сериям значения $R_{\text{Циа}}$ дельфинидина имеют в 3—4 раза (и более) меньшую вариационную ширину. Почти аналогичное соотношение получается и при сравнении соответствующих данных о вариационной ширине для цианидина. Это значит, что при повторении хроматографического разделения тех же смесей антоцианидинов в разные и отдаленные друг от друга сроки получаемые значения R_X плотнее и со значительно меньшим варьированием сосредотачиваются вокруг генерального среднего, чем это можно ожидать в случае значений R_f .

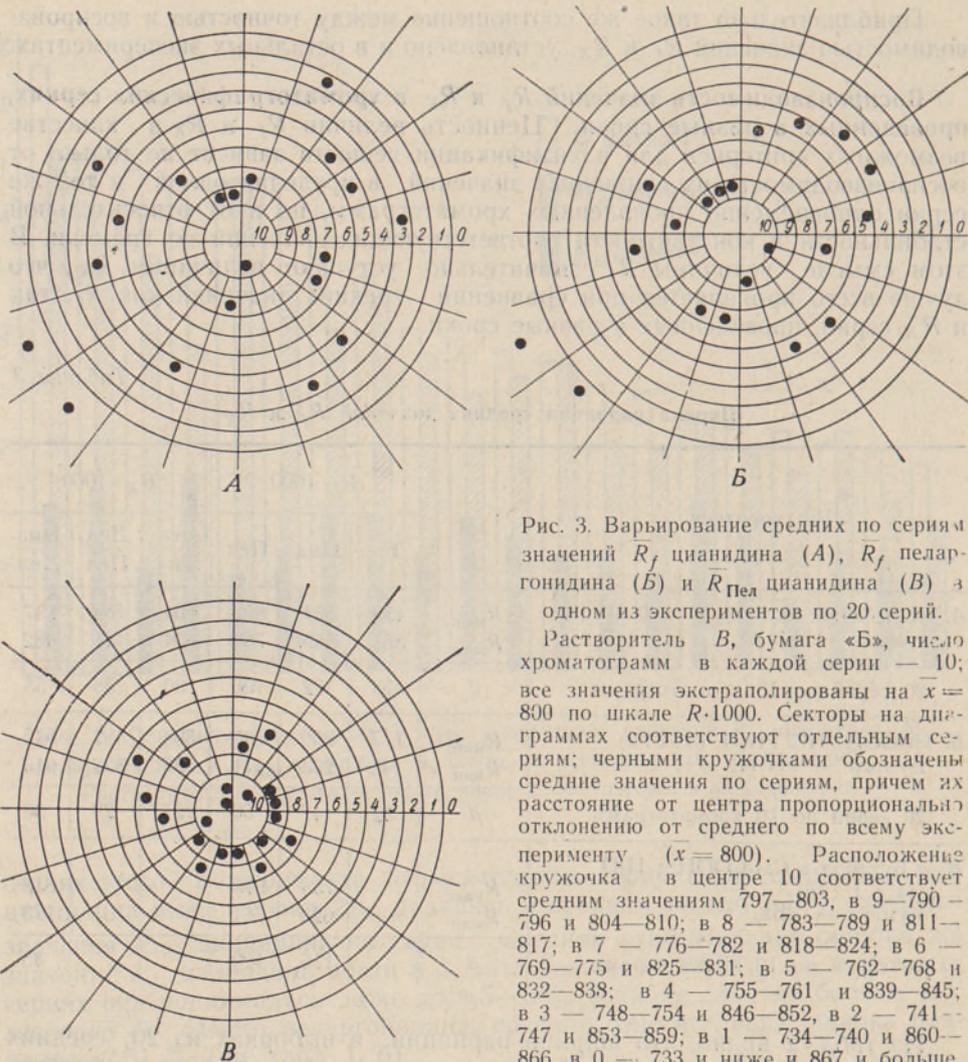


Рис. 3. Варьирование средних по сериям значений R_f цианидина (А), R_f пеларгонидина (Б) и $R_{Пел}$ цианидина (В) в одном из экспериментов по 20 серий.

Растворитель В, бумага «Б», число хроматограмм в каждой серии — 10; все значения экстраполированы на $x = 800$ по шкале $R \cdot 1000$. Секторы на диаграммах соответствуют отдельным сериям; черными кружочками обозначены средние значения по сериям, причем их расстояние от центра пропорционально отклонению от среднего по всему эксперименту ($x = 800$). Расположение кружочка в центре 10 соответствует средним значениям 797—803, в 9—790—796 и 804—810; в 8 — 783—789 и 811—817; в 7 — 776—782 и 818—824; в 6 — 769—775 и 825—831; в 5 — 762—768 и 832—838; в 4 — 755—761 и 839—845; в 3 — 748—754 и 846—852, в 2 — 741—747 и 853—859; в 1 — 734—740 и 860—866, в 0 — 733 и ниже и 867 и больше.

Графически это нагляднее всего изображается в виде «мишени», центр которой уравнивается с общим средним по всему эксперименту, а «попаданиями» являются средние значения по отдельным сериям, причем расстояние «попадания» от центра пропорционально отклонению соответствующего частного среднего от общего. Как видно из рисунка 3, на котором таким способом изображены результаты одного из экспериментов с пеларгонидином и цианидином в *n*-бутанол-уксуснокислотном растворителе, средние по сериям значения $R_{Пел}$ цианидина расположены концентрированно и близко к общему среднему по эксперименту, в то время как средние по сериям значения R_f цианидина, а также R_f использованного стандарта пеларгонидина гораздо больше удалены от центра и рассеяны по всей «мишени». Воспроизводимость и относительная независимость от времени проведения хроматографирования у значений R_x явно значительно выше.

Заметно лучшая воспроизводимость значений R_x по сравнению со значениями R_f весьма наглядно демонстрируется и на рис. 4, где изобра-

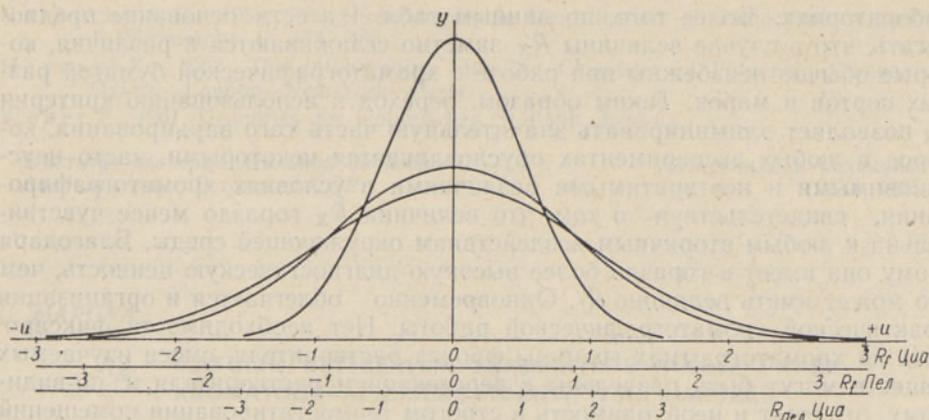


Рис. 4. Кривые нормального распределения единичных значений R_f цианидина, R_f пеларгонидина и $R_{Пел}$ цианидина в одном из экспериментов по 200 хроматограммам.

Растворитель А; бумага — FN-11; все значения экстраполированы на $\bar{x} = 1000$ по шкале $R \cdot 1000$.

жены кривые нормального распределения значений R_f цианидина, R_f пеларгонидина и $R_{Пел}$ цианидина в одном из экспериментов по 200 отдельным хроматограммам, причем кривые построены на основании соответствующих экспериментально установленных стандартных ошибок s после их предварительной экстраполяции на единую основу сравнения. Плоская форма кривых распределения значений R_f свидетельствует о сильной разбросанности этих значений по длине шкалы, в то время как значения R_X распределены весьма плотно по значительно более короткому интервалу. Математически можно показать, что при тех же размерах стандартной ошибки в интервал, равняющийся ± 10 единицам (по шкале $R \cdot 1000$), в обе стороны от среднего значения в случае R_f цианидина и R_f пеларгонидина попадает соответственно 24 и 20% всех единичных значений, а в случае $R_{Пел}$ цианидина эта цифра равняется 40%. Интервал «среднее значение ± 20 единиц» охватывает уже 71% всех значений $R_{Пел}$ цианидина, из значений же R_f в тот же интервал попадает меньше половины — у R_f цианидина 47, у R_f пеларгонидина — 38%. В интервал ± 40 единиц в обе стороны от среднего вмещаются практически все значения R_X , а большая часть значений R_f (у R_f цианидина 21% и у R_f пеларгонидина 32%) все же остается вне этих границ. Лишь интервал ± 70 единиц может обеспечить практически полный учет значений R_f цианидина всего эксперимента, для значений же R_f пеларгонидина и этого недостаточно — вмещение всех значений эксперимента обеспечено только при интервале ± 90 единиц в обе стороны от среднего значения R_f пеларгонидина.

Заключительные замечания. Полученные результаты показывают, что величина R_X имеет несомненные преимущества перед величиной R_f . Выясняется, что в практической экспериментальной работе отдельные значения R_X в пределах одновременно проведенных хроматографических серий колеблются в 2—3 раза меньше, чем соответствующие значения R_f . Значения R_X до 2—3 раз более стабильны и в отношении возможных отличий и отклонений в температурных и прочих условиях, которые могут встречаться при проведении экспериментов в разные сроки или в разных

лабораториях. Более того, по данным табл. 1, а есть основание предполагать, что в случае величины R_X заметно сглаживаются и различия, которые обычно неизбежны при работе с хроматографической бумагой разных сортов и марок. Таким образом, переход к использованию критерия R_X позволяет элиминировать значительную часть того варьирования, которое в любых экспериментах обуславливается некотормы, часто неустановимыми и неотвратимыми различиями в условиях хроматографирования, свидетельствуя о том, что величина R_X гораздо менее чувствительна к любым вторичным воздействиям окружающей среды. Благодаря этому она имеет и гораздо более высокую диагностическую ценность, чем это может иметь величина R_f . Одновременно облегчается и организация практической хроматографической работы. Нет необходимости фиксировать на хроматограммах границы фронта растворителя, смеси изучаемых веществ могут быть разделены с перетеканием растворителя и, по-видимому, отпадает и необходимость в строгом термостатировании помещений и камер во время хроматографирования.

Однако успех применения величины R_X зависит от выбора стандарта, по отношению к которому ведется характеристика разделяемых веществ. Положительные черты величины R_X лучше всего выявляются в том случае, когда пятна изучаемых веществ на хроматограммах расположены в относительной близости к пятну стандартного вещества. Поэтому при наличии только одного условного стандарта последний должен быть подобран из числа веществ с R_f около 0,5. Это позволяет с почти одинаковым успехом характеризовать вещества по всей хроматограмме, хотя вследствие относительной отдаленности крайних членов от стандарта их значения R_X несколько менее точны, чем значения R_X веществ из центральной части хроматограммы. Указанный недостаток можно избежать путем применения одновременно двух стандартов, один из которых (с R_f в пределах 0,3—0,4) предназначен для характеристики веществ с R_f от 0 до 0,5, а другой (с R_f в пределах 0,6—0,7) — для веществ с R_f от 0,5—1,0. В этом случае максимальное расстояние изучаемого вещества от стандарта не превышает 20—25% всей протяженности хроматограммы, т. е. лежит в пределах, в которых установленные в настоящей работе положительные свойства значений R_X полностью сохраняются.

На основании вышеизложенного можно прийти к заключению, что величину R_X можно рекомендовать к широкому применению не только в качестве параметра, по которому можно судить о взаимном расположении пятен на хроматограммах, но и в качестве весьма специфического критерия для идентификации неизвестных веществ. Такой вывод тем более обоснован, что с помощью недавно предложенных поправочных коэффициентов (Galanos, Karoulas, 1964) открываются дальнейшие возможности для значительного повышения точности значений R_X . В частности, это касается хроматографических экспериментов с применением одновременно двух стандартных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

- Бейли Н., 1962. Статистические методы в биологии. Изд. ИЛ, М.
- Токштейн А., Дворжак И., Хайс И. М., 1962. Принципы и теория хроматографии на бумаге. В кн.: Хроматография на бумаге. Изд. ИЛ, М.
- Bate-Smith E. C., Westall R. G., 1950. Chromatographic behaviour and chemical structure. I. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochim. biophys. acta* 4 : 427—440.
- Galanos D. S., Karoulas V. M., 1964. The paper chromatographic identification of compounds using two reference compounds. *J. Chromatogr.* 13 : 128—138.

- Harborne J. B., 1958. The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *J. Chromatogr.* 1 : 473—488.
- Hayashi K., 1962. The anthocyanins. In: *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Oxford—London—New York—Paris.
- Weber E., 1961. *Grundriss der biologischen Statistik*. Jena.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
3/XI 1965

U. MARGNA

R_X — KASULIK KRITERIUM TUNDMATUTE AINETE PABER-KROMATOGRAAFILISEKS IDENTIFITSEERIMISEKS

Resüme

Antotsüanidiinderivaatide delfinidiini, tsüanidiini ja pelargonidiini paberkromatograafilise lahutamise põhjal kolmes eri solvendisüsteemis uuriti võrdlevalt kahe arvulise parameetri — R_f ja R_X — reprodutseeritavust praktilises eksperimendis ning nende rakendatavust võimalike spetsiifiliste kriteeriumidena tundmatute ühendite iseloomustamisel ja paberkromatograafilisel identifitseerimisel.

Saadud tulemused näitavad, et suurus R_X , mis kujutab endast uuritavate ühendite kromatograafilise liikumistee pikkuse suhet samaaegselt kromatogrammidele kantud standardühendi X kromatograafilise liikumistee pikkusesse, allub tunduvalt väiksematele varieerumistele ja on märgatavalt stabiilsemaks tunnuseks antud ühendeile, kui seda on suurus R_f (R_f — aine kromatograafilise liikumistee pikkuse suhe lahusti frondi kaugusesse stardijoonest). Eri kromatogrammide samaaegsel voolutamisel ühesuguses temperatuuris ja muudes ühesugustes tingimustes on uuritavate ühendite R_X väärtused määratavad keskmiselt 2—3 korda, mõnel juhul koguni 4—5 korda väiksema veaga kui neile vastavad R_f üksikväärtused. Skaala $R_X \cdot 1000$ ühikutes on R_X väärtuste keskmine absoluutse vea suuruseks samaaegselt läbiviidud kromatograafilise seeria piirides keskmiselt 10—15 skaalaühikut, keskmine suhteline viga aga moodustab ainult 1,0—1,7% seeria keskmisest R_X väärtusest. Seevastu R_f väärtuste puhul saadi absoluutse vea keskmiseks suuruseks seerias 20—40 ühikut (skaala $R_f \cdot 1000$ järgi) ja keskmine suhteline viga oli 3—4%, mõnel juhul koguni 6—7% seeria keskmisest väärtusest. R_X väärtused osutusid R_f väärtustest 2—3-kordselt stabiilsemaks ka nende erinevuste suhtes voolutamistingimustes, mis võivad esineda kromatograafiliste eksperimentide läbiviimisel eri aegadel või eri laboratooriumides. Ühtlasi tasanduvad R_X kasutamise puhul märgatavalt ka need erinevused, mis tavaliselt on vältimatud kromatograafilise paberi eri markide ja sortide kasutamisel.

Suurema stabiilsuse ja tunduvalt väiksema tundlikkuse tõttu mistahes sekundaarsete mõjutuste suhtes on R_X märgatavalt kõrgema diagnostilise väärtusega kui R_f . Seetõttu võib teda soovitada praktikas rakendamiseks mitte ainult parameetrina, mille abil saab hinnata laikude vastastikust asetust kromatogrammidel, vaid küllalt spetsiifilise kriteeriumina tundmatute ühendite identifitseerimiseks. Eriti häid tulemusi võib saada kahe standardühendi üheaegsel kasutamisel. See garanteerib R_X väärtuste piisava täpsuse ja lubab rakendada ka kirjanduses soovitatud paranduskoefitsiente eksperimentaalselt leitud väärtuste korrigeerimiseks.

Üleminekuga K_X kasutamisele lihtsustub ka kromatograafilise töö organiseerimine. Pole vaja fikseerida lahusti frondi piire, voolutamisel võib lahusti läbida kromatogrammi kogu tema ulatuses ning nähtavasti kaob ka vajadus kromatografeerimiseks kasutatavate ruumide ja bokside rangeks termostateerimiseks.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Saabus toimetusse
3. XI 1965

U. MARGNA

 R_X — A USEFUL CRITERION FOR PAPER-CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF UNKNOWN COMPOUNDS

Summary

The paper-chromatographic distribution of anthocyanidin derivatives delphinidin, cyanidin and pelargonidin in three different solvent systems was used to compare the two numerical parameters — R_f and R_X — in connection with their reproducibility in practical experimental work and in relation to their applicability as specific criteria for the characterization and paper-chromatographic identification of unknown compounds.

It was shown that the value R_X representing the ratio of the distance of the studied substances from the start to the analogous distance of the reference compound X simultaneously travelling along the paper is less variable and a considerably more stable character for a given substance than the value R_f (i. e. the ratio of the distance of the studied substances from the start to the length of the solvent flow). Providing the development of different chromatograms is carried out at the same temperature rate and under the same conditions, the R_X values of the compounds studied may be evaluated with an error on the average from 2 to 3, and occasionally even up to 4 times smaller than the corresponding error of the R_f values. In such chromatographic series simultaneously conducted, the mean absolute error of a single R_X value proved to be equal to 10—15 units as expressed by the scale $R_X \cdot 1000$, and the mean relative error averaged only 1.0—1.7% of the mean \bar{R}_X value of the series. At the same time the mean absolute error of the R_f values was 20—40 units (by the $R_f \cdot 1000$ scale) and the mean relative error averaged 3—4%, but in the same cases up to 6—7% of the mean R_f value of the series. The R_X values proved to be from 2 to 3 times stabler also in the presence of possible differences that might occur in the chromatographic conditions during experiments at different times or in different laboratories. By the application of R_X values, the differences usually unavoidable in experiments with chromatographic paper of different sorts and grades may be considerably smoothed out as well.

Owing to the more pronounced stability and considerably lesser susceptibility to any secondary influences, the chromatographic evidence by means of R_X has an immensely higher diagnostic value than that achieved by means of R_f . Therefore it may be widely recommended for practical use not only as a parameter good enough to judge the mutual arrangement of spots on chromatograms, but also as a rather specific criterion for the identification of unknown substances. The application may lead to especially remarkable results when the two test substances are used simultaneously.

The transition to the use of R_X values may sufficiently simplify the organization of chromatographic work. There is no need to fix the front of the solvent flow, the chromatograms may be developed by the method of overflow, and, apparently, the question of a temperature regulation of rooms and chambers for chromatographic procedures is no longer so acute as generally accepted hitherto.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
Nov. 3, 1965