

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ ТРИТИЯ В БУМАЖНЫХ ХРОМАТОГРАММАХ

В.М. Вдовенко, В.Н. Боброва, О.А. Рысьев и И.Ф. Иванова

Радиевый институт имени В. Г. Хлопина, Ленинград П-22, СССР

Поступило в редакцию 3 июля 1973г.

Работа посвящена вопросам исследования природы различий в эффективности регистрации препаратов, меченных тритием, на бумажных хроматограммах на примере использования метода введения мелкодисперсных сцинтилляторов в хроматографическую среду. Обнаружены значительные различия в эффективности счета на бумажных хроматограммах даже таких близких по своему строению аминокислот, как DL аланин-[^3H], DL лейцин [^3H] и DL глицин [^3H]. На примере изучения хроматограмм меченного тритием гуанозина на тонких слоях целлюлозы показано решающее влияние геометрического распределения вещества по сечению хроматографического слоя. Хроматограммы разделялись на участки шириной 0,5 см, целлюлоза с введенным стильбном тщательно перемешивалась и измерялась в отдельных кюветках. Показано, что сигнал от пятен без хроматографирования и сигнал от радиоактивной зоны после хроматографирования идентичных пятен выравниваются в результате перемешивания массы целлюлозы.

Специфика измерений трития в хроматограммах определяется чрезвычайно малой энергией β -частиц трития (средняя энергия β -частиц трития ~ 5 кэВ¹). В работе^{2,3} указано, что уже на результаты измерений ^{14}C оказывают воздействие различия в способах сушки готовых бумажных хроматограмм. Радиоактивное вещество концентрируется больше на той поверхности бумаги, с которой испарение вещества происходило более интенсивно. Эффект асимметрии распределения веществ, меченных тритием, подробно исследовался в работе⁴, где рассмотрено влияние процесса сушки в чистом виде, поскольку использовалась одна система для хроматографирования и отсутствовала зависимость от величины R_f . Суммарный эффект при измерениях с двух сторон хроматографической бумаги при сушке теплым воздухом с одной из сторон значительно превышает суммарный эффект при измерениях хроматограмм после сушки в спокойной атмосфере. Авторы считают⁴, что меченное тритием вещество в результате хроматографирования распределяется в центральном слое бумаги, а процессы сушки вызывают перемещение вещества к одной из поверхностей ленты.

В работе Доббса⁵ был отмечен ряд особенностей измерения бумажных хроматограмм веществ, меченных тритием. Сравнение с результатами, полученными методом сжигания участков хроматограмм показало, что наблюдается разница в 8 раз в эффективности регистрации бензойной и стеариновой кислот, меченных тритием. Доббс предполагает⁵, что бензойная кислота проникает в так называемые „фибры“ (нерастертые хлопья целлюлозы), а стеариновая кислота остается на поверхности. Эта гипотеза о связи фибрилярной структуры хроматографической бумаги с размерами молекул веществ, подвергаемых хроматографическому анализу, развивается еще целым рядом авторов^{6,7}.

В настоящей работе анализируются особенности измерений бумажных хроматограмм с тритием методом введения в хроматографическую бумагу мелкодисперсных органических сцинтилляторов⁸.

ОПЫТНАЯ ЧАСТЬ

Готовые и просушенные бумажные хроматограммы пропитываются раствором органического сцинтиллятора (стильбена, 2,5-дифенилоксазона и т. п.) в бензоле, высушиваются и поступают на измерения в сцинтилляционный счетчик с записью результатов сканирования на диаграммную ленту⁹.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При использовании описанного метода, также как и в работах²⁻⁴ была отмечена асимметрия в распределении радиоактивных препаратов на двух сторонах ленты, с пятнами, при нанесении которых использовалась подсушка либо горячим воздухом, либо на нагревательном столике. Разница площадей пиков, измеренных на разных сторонах ленты, доходит до 3—4 раз.

В процессе калибровочных работ по определению нижнего порога детектируемых активностей было обнаружено несовершенство общепринятых методов калибровки счетчиков для измерения бумажных хроматограмм с тритием. Во многих случаях площадь пика над пятном после хроматографирования (радиоактивной зоной) была в несколько раз меньше, чем площадь пика над тем же пятном до хроматографирования. Отсюда возникали расхождения в оценке предельно малых детектируемых активностей трития для измерительных устройств при их калибровке с помощью нанесения пятен с известной активностью. Примером может явиться запись, полученная при сканировании хроматограммы саркослизина $-[{}^3\text{H}]$ на бумаге „М“ (плотность 65 ед), пропитанной стильбеном. Хроматографирование производилось в 2%-ном хлористом аммонии. На разные концы ленты наносилось 2 одинаковых по активности пятна раствора сарколизина $-[{}^3\text{H}]$. Одно из пятен подвергалось хроматографированию, а другое — нет. Площадь пика над хроматографической зоной много меньше площади пика над пятном, не подвергшегося хроматографированию (рис. 1).

Для предположения о сорбции части радиоактивности на участке стракта хроматограммы до пика хроматограммы измерялись на самом чувствительном диапазоне. Было получено в большинстве случаев, что уровень фона совпадает с уровнем записи на участке от старта до пятна. В некоторых случаях сорбция на бумаге действительно имеет место (нафтидон- $[{}^3\text{H}]$, пирокатехин- $[{}^3\text{H}]$ и т.п.), но величина этой активности не покрывает разницы в площадях пиков над пятном без хроматографирования и после развития хроматограммы над хроматографической зоной.

Для проверки гипотезы о влиянии фибров был поставлен эксперимент на тонких слоях целлюлозы. Хроматографирование пятен гуанозина, меченного тритием, производилось в системе бутанол–уксусная кислота–вода (5 : 2 : 3). Пример записи результатов сканирования одномерной тонкослойной хроматограммы гуанозина на слое целлюлозы 20 мк, полученной с помощью специального сцинтилляционного счетчика⁹, приведен на рис. 2а. На записи опять четко видно, что площадь пика над пятном без хроматографирования значительно превышает площадь пике над радиоактивной зоной. В дальнейшем слой нарезался на участки 0,5 см шириной и фрагменты слоя соскребались каждый в отдельную кювету. Целлюлозная масса тщательно растиралась в каждой кювете при смачивании спиртом. После испарения спирта кюветы поступали на измерение

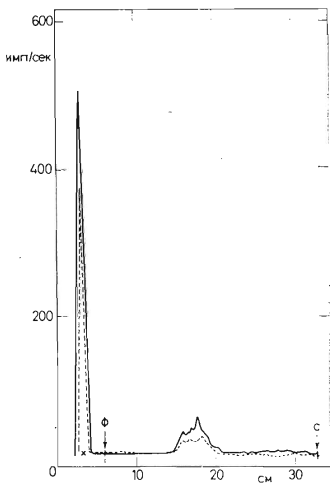


Рис. 1

Записи с двух сторон ленты хроматограммы сарколизина-[³H] на бумаге „М“, пропитанной стильбеном (пунтир — запись с фронтальной стороны ленты)

Пик, расположенный за фронтом хроматограммы, записан над пятном, не подвергнутым хроматографированию.

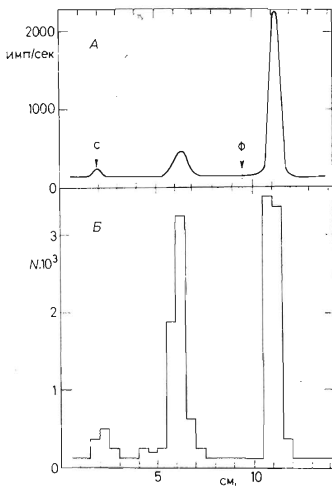


Рис. 2

Запись распределения активности на хроматограмме гуанозина [8-³H] в тонком слое целлюлозы 20 мк (А) и распределение активности в перемешанных порциях целлюлозы, взятых с участков хроматограммы шириной 0,5 см (Б).

в одноканальный сцинтилляционный счетчик и распределение радиоактивности вдоль слоя получали в виде *гистограммы*.

Если принимать гипотезу о влиянии фибров, то растирание целлюлозы в спирте не должно существенно нарушить распределение гуанозина в самих фибрах, поскольку гуанозин не растворяется в спирте. Стилбен, введенный в слой целлюлозы перед измерением, также не растворяется в спирте. В итоге, растирание фрагментов слоя целлюлозы приводит только к нарушению геометрического распределения меченого вещества по толщине слоя, делая его равномерным. Такое перемешивание массы фрагментов слоя целлюлозы приводит к выравниванию площадей пиков от пятна до и после хроматографирования (рис. 2б). Следовательно, наибольшее влияние на эффективность счета препаратов, меченных тритием, оказывает геометрическое распределение вещества по толщине слоя.

Аналогичные результаты были получены на слоях целлюлозы 13, 37 и 70 мк. Если сложить площади пиков, зарегистрированных при сканировании с обеих сторон пластины, и нанести их на график в зависимости от толщины слоя (рис. 3), то ясно видно, что наибольшее количество радиоактивного вещества доступно измерению на более тонких слоях. Значит, перемещение вещества при хроматографировании происходит где-то в срединных слоях хроматографи-

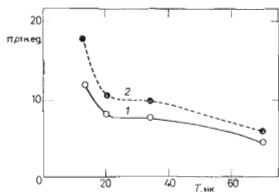


Рис. 3

Зависимость суммарной площади пиков П с двух сторон хроматограммы гуанозина- $[8-^3\text{H}]$ от толщины слоя целлюлозы T

1 Суммы при сканировании радиоактивной зоны, полученной в результате хроматографического анализа; 2 суммы при сканировании пятен идентичных пятнам, нанесенным на старт хроматограммы, но не подвергнутых хроматографированию.

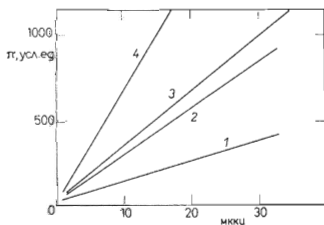


Рис. 4

Зависимость площади пика П на записи от величины активности на бумажных хроматограммах (бумага „М“ со стилбеном)

1 Аспарагиновая кислота без носителя, 2 аспарагиновая кислота с носителем, 3 гуанозин 8 без носителя, 4 гуанозин 8 с носителем.

ческой среды и свет от сцинтилляций не достигает с такой глубины фотокатопа фотоумножителя.

Для следующего эксперимента были взяты вещества с разным строением молекул. На ленты хроматографической бумаги „М“ наносились пятна гуанозина, меченного тритием (активность в пятнах 0,5; 1; 2; 5; 10 мкКи). На другую серию лент наносились те же растворы, но в них был добавлен неактивный гуанозин, как носитель (1 мг/мл). Такие же две серии лент были заготовлены с пятнами аспарагиновой кислоты, меченной тритием. Хроматографирование производилось в системе бутанол–уксусная кислота–вода (5 : 2 : 3). График зависимости площадей пиков над хроматографическими зонами от величины внесенной на старт активности, приведен на рис. 4. Введение носителя привело к удвоению эффективности счета как гуанозина, так и аспарагиновой кислоты. Если этот факт можно связать с перераспределением радиоактивного вещества по толщине хроматографической бумаги, то превышение эффективности счета гуанозина, по сравнению с аспарагиновой кислотой, явно наводит на мысль о влиянии фибров. Аспарагиновая кислота имеет линейную форму, что облегчает проникновение в аморфные участки целлюлозы.

Для следующего эксперимента были взяты вещества с очень близкими химическими свойствами. Анализировались три аминокислоты, меченные тритием (аланин-[2^3H], лейцин-[2^3H] и глицин-[2^3H]). Хроматографирование производилось одновременно в одной системе и в одном сосуде. Сушка готовых лент и пропитка их сцинтиллятором производилась в одних и тех же условиях и по одной и той же методике. Хроматографирование производилось восходящим способом в системе: бутанол–уксусная кислота–вода (4 : 1 : 5). Одна партия лент хроматографировалась 19 часов, а другая – 6,5 часов.

Подсушка лент снизу на нагревательном столике в процессе нанесения пятен привела к асимметрии распределения вещества. На обратной стороне лент вещества было больше. На рис. 5а приведены графики зависимости разности площадей пиков с двух сторон лент до хроматографирования с разным количеством меченых веществ в пятнах. Величина разности площадей пиков у лейцина заметна больше, чем у аланина и особенно у глицина. Если построить такие же кривые по данным сканирования лент после хроматографирования (рис. 5б, в, г), то можно утверждать, что асимметрия распределения вещества значительно уменьшилась, особенно на лентах, подвергавшихся более длительному процессу хроматографирования. Высокие значения разности сохранились только при измерении лент с малым количеством меченых веществ. Интересно, что знак разности изменился. За 100 процентов во всех случаях принималась величина площади пиков при сканировании лент с той поверхности, на которую наносились пятна вещества на старте (фронтальная сторона ленты).

Для определения эффективности счета в условных единицах подсчитывались

площади пиков на диаграммной ленте и делились на величину активности, определенную ранее в жидкостном сцинтилляционном счетчике. Эффективность счета в таких единицах меняется в зависимости от скорости сканирования и протяжки диаграммной ленты, постоянного времени и диапазона измерителя

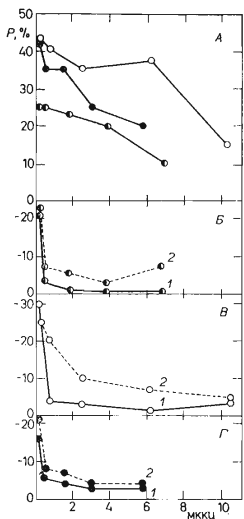


Рис. 5

Разность площадей пиков на записи P 6% при сканировании с двух сторон лент хроматографической бумаги „М“, пропитанной стильбеном. \circ лейцин, \bullet глицин, \bullet аланин. А Нанесены калибровочные пятна меченных тритием аминокислот до хроматографирования; Б, В, Г ленты с пятнами после хроматографирования, хроматографирование в течение часов: 1 19; 2 6,5.

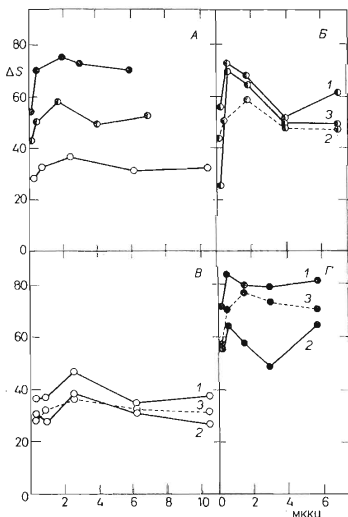


Рис.

Зависимость эффективности регистрации меченных тритием аминокислот от количества вещества, наносимого на старт хроматограмм

Бумага „М“, ΔS площадь пика на единицу активности. \circ Лейцин, \bullet глицин, \bullet аланин. А Данные сняты с лент с калибровочными пятнами до хроматографирования; Б, В, Г ленты с пятнами после хроматографирования. Хроматографирование в течение 1 19, 2 6,5 часов. 3 данные сняты с лент с калибровочными пятнами до хроматографирования.

скорости счета. Постоянство этих факторов соблюдалось при всех измерениях этой серии.

Вначале такой обработке были подвергнуты результаты сканирования лент с пятнами до хроматографирования. Результаты подсчетов приведены на рис. 6а. Видно, что определенной зависимости от количества радиоактивного вещества нет, за исключением того случая, когда вещества очень мало (единицы гамм). В этом случае для всех аминокислот наблюдается заметное уменьшение эффективности счета. Из графиков на рис. 6А видно также, что аминокислоты фиксировались с разной эффективностью счета, несмотря на близость строения молекулы. Причем, разница в эффективности счета у аланина и лейцина более, чем в 2 раза. Аналогичным образом были обработаны записи результатов сканирования тех же лент, но после хроматографирования. Результаты приведены на рис. 6Б, В, Г. Наблюдаются примерно те же соотношения эффективностей счета, как и в случае пятен аминокислот до хроматографирования. Регистрация аланина во всех случаях производится с наибольшей эффективностью, а лейцина — с наименьшей эффективностью. Характерно на всех графиках падение эффективности счета при малых количествах вещества.

Вся серия исследований была повторена на лентах из ватмана (Ватман 3). Также как и на бумаге „М“, различия между двумя сторонами ленты для калибровочных пятен трех аминокислот несколько отличаются по своей величине. Отмечается снова четкая закономерность — увеличение асимметрии по мере уменьшения количества вещества в пятне. Для ватмана эта зависимость более сильная, чем для бумаги „М“. Асимметрия на лентах после хроматографирования уменьшилась мало. Характер различий между двумя сторонами ленты при длительном и коротком по времени хроматографировании изменялся в незначительной степени.

Эффективность счета всех трех аминокислот при сканировании лент из ватмана с калибровочными пятнами получалась близкой по величине. Но после хроматографирования этих же лент характер различий в эффективности регистрации оказался таким же, как и в случае использования бумаги „М“, только эффективности регистрации более низкие (в интервале 40—20 условных единиц, в то время как для бумаги „М“ эффективность счета аланина достигает величины 80 условных единиц). Более сильно для ватмана выражено явление снижения эффективности счета при уменьшении количества радиоактивного вещества.

Путем анализа литературных источников и в результате проведенных экспериментальных исследований показано, что различные по структуре органические соединения, меченные тритием и распределенные на хроматографической бумаге, могут регистрироваться с различной эффективностью при всех известных методах измерений — ионизационном, методе жидких сцинтилляторов, а также методе сухих сцинтилляторов. Проведенные эксперименты подтвердили предположение о преимущественном воздействии на эффективность счета

геометрического распределения вещества по сечению хроматографической бумаги, которое сложилось в результате хроматографирования. В характере распределения проявляются физико-химические свойства анализируемых веществ, бумаги, системы растворителей, температуры и т.п.

В итоге можно утверждать, что единственно точным методом измерений бумажных хроматограмм с тритием является в настоящее время только метод сжигания участков бумажных хроматограмм с последующей сорбции паров воды, в жидких сцинтилляторах¹⁰. Это утверждение не касается тех случаев, когда экспериментатора интересует только величина R_F . Предосторожности нужны в случае, если определяется радиохимическая чистота препарата, меченого тритием, то есть в случае, если на ленте проявляются пики активных продуктов радиолиза.

Необходима, по-видимому, предварительная тщательная проверка соотношения эффективностей счета основного вещества и всех его продуктов радиолиза, которую нужно производить методом сжигания участков хроматограммы. Только после введения соответствующих поправок на различия в эффективности регистрации веществ на одной хроматографической ленте можно правильно его продуктов радиолиза. После определения поправочных коэффициентов для расчета площадей пиков при строгом сохранении условий хроматографирования и сушки готовых хроматограмм можно пользоваться методом введения мелкодисперсных сцинтилляторов в хроматографическую среду, поскольку этот метод по всем данным дает наименьший разброс в эффективностях счета различных препаратов, меченных тритием.

Были сделаны попытки выравнять эффективности счета различных препаратов, меченных тритием, распределенных на бумажных хроматограммах. Исходя из гипотезы преимущественного влияния геометрического распределения меченого вещества по сечению хроматограммы, делались попытки вывести большую часть вещества на одну из сторон бумажной ленты путем интенсивной сушки готовых хроматограмм потоком теплого воздуха или путем повышения прозрачности хроматограмм, применяя пластические сцинтилляторы или пропитку вазелиновым, парафиновым или силиконовым маслом. При интенсивной сушке готовых хроматограмм с одной из сторон происходило некоторое увеличение эффективности счета, но соотношение эффективностей регистрации у различных веществ сохранялось. Наблюдалось увеличение расброса данных.

Весь цикл исследований с тремя аминокислотами, меченными тритием, был повторен с пластическими сцинтилляторами на основе полистирола (один с добавками РРО и нафталина, другой — с добавками РРО и β -метилнафталина), а также с применением пропиток бумажных лент различными веществами, повышающими прозрачность бумаги. Некоторое сближение эффективностей счета наблюдалось при использовании пластических сцинтилляторов, но соотношения между эффективностями регистрации разных аминокислот резко

менялись в зависимости от состава сцинтиллятора и растворителей. Видимо, в данном случае начинают сказываться такие свойства органических соединений как полярность. То же можно сказать и о применении пропиток лент вазелиновым, парафиновым и силиконовым маслом. По-видимому, начинают играть роль свойства органических соединений как органических полупроводников.

Все перечисленные методы выравнивания эффективности счета меченных тритием органических соединений на бумажных хроматограммах, видимо, в принципе, не могут привести к полному выравниванию эффективности регистрации различных по своим свойствам органических соединений, поскольку они не устраняют влияния различий в физико-химических свойствах. Единственным возможным на данном этапе представляется метод механического перемешивания вещества в участках бумажных хроматограмм, приводящий к нарушению сложившегося в результате анализа распределения и обеспечивающий равномерное распределение меченого препарата в веществе бумаги.

Литература

1. Скачков Ю. Ф.: Приборы и техника эксперимента 5, 168 (1964).
2. Tomisek A. T., Johnson B. T.: J. Chromatog. 33, 2, 329 (1968).
3. Duncomb W. G.: J. Chromatog. 36, 4, 555 (1968).
4. Phillips R. F., Waterfield W. R.: J. Chromatog. 40, 309 (1969).
5. Dobbs H. E.: J. Chromatog. 15, 29 (1964).
6. Gill D. M.: Int. J. Appl. Rad. Isotop. 18, 6, 393, (1967).
7. Furlong N. B., Williams N. L., Willis D. P.: Biochem. Biophys. Acta 103, 341 (1965).
8. Ломоносов И. И.: Способ измерения хроматограмм на бумаге соединений, меченных тритием. Авторское свидетельство № 169866, Бюллетень изобр. № 7, 14.04.65, стр. 32.
9. Вдовенко В. М., Боброва В. Н., Жарков А. В., Рысьев О. А., Волина В. В.: Радиохимия 13, 255 (1971).
10. Ober R. E., Hansen A. R., Mourer D., Baukema T., Gwinn G. W.: Int. J. Appl. Rad. Isotop. 20, 10, 703 (1969).