



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИРОДНЫХ ТИОФЕНОВ ХРОМАГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

В.И. Дейнека¹

А.М. Григорьев²

М.Ю. Третьяков¹

¹ *Белгородский государственный национальный исследовательский университет*

Россия, 308015 Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: deineka@bsu.edu.ru

² *ГУЗ Бюро судебно-медицинской экспертизы по Белгородской области*

Россия, 308017 Белгород, ул. Волчанская, 159

Методом обращено-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием исследовано разделение природных политиофенов, характерных для ряда растений рода бархатцы и некоторых других родов семейства сложноцветные. Обсуждаются особенности разделения тиофенов в элюентах с различными органическими составляющими: ацетонитрила, ацетона и 2-пропанола. Количественное содержание тиофенов определено с использованием спектрофотометрического метода, а их строение было подтверждено методом ГЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Исследованы возможности определения тиофенов в экстрактах методом ТСХ на пластинах (силикагелевых) «Сорбфил» с обнаружением по яркой голубой флуоресценции в УФ свете (354 нм).

Ключевые слова: ОФ ВЭЖХ, ТСХ, ГЖХ, спектрофотометрия, масс-спектрометрия, тиофены, *Tagetes* sp.

Введение

Паразитические нематоды растений отвечают за потерю от 10 до 50% урожая многих сельскохозяйственных культур во всем мире, поэтому для снижения численности этих организмов в почве приходится использовать экологически небезопасные синтетические препараты [1]. Альтернативой использованию таких веществ может служить применение природных тиофенов, накопление которых характерно для корней ряда растений семейства сложноцветные [2], и в первую очередь такого популярного цветкового декоративного растения, как бархатцы (*Tagetes*) [3]. Особо выделим это растение, поскольку лепестки его цветков являются уникальным сырьем для производства лютеина (и зеаксантина) для медицинской промышленности [4], что позволяет рассчитывать на возможность комплексной утилизации всего растения. Кроме того, для производства тиофенов возможно использование культуральных клеточных технологий [3]. Число различных производных тиофенов довольно велико, но важнейшими из них являются соединения I–IV (схема 1).

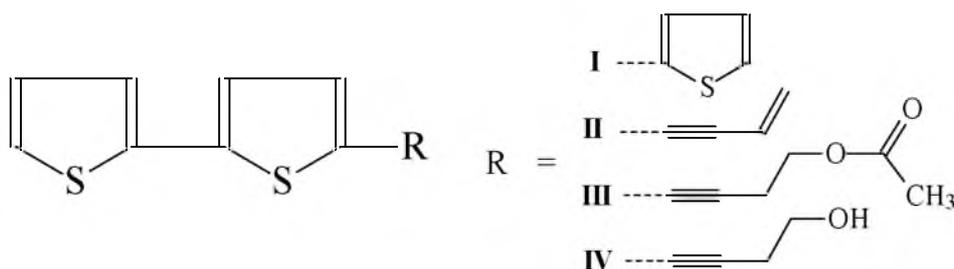


Схема 1. Строение важнейших природных тиофенов

Природные тиофены не устойчивы при УФ-облучении: обладают специфической фототоксичностью [5], флуоресцируют синим светом [6]. Для определения тиофенов с целью уточнения биосинтеза этих соединений в бархатцах известно использование капиллярной газо-жидкостной хроматографии [7, 8], причем комбинация этого метода с масс-спектрометрическим детектированием позволила определять минорные составляющие сложных смесей природных тиофенов. Тонкослойная хроматография на силикагелевых пластинах с флуоресцентным индикатором и с метанолом в качестве подвижной фазы были использованы для качественного анализа тиофенов после

опрыскивания пластин 0.4%-ным раствором изатина в концентрированной серной кислоте в УФ (254 нм) свете [9]. Заметно более простая процедура была использована в работе [8], в которой использована способность тиофенов флуоресцировать при УФ-облучении. Но ВЭЖХ в аналитических целях используется чаще. В работе, посвященной разработке быстрого метода анализа тиофенов в сложных смесях [10], предложен обращено-фазовый вариант ВЭЖХ со сложной подвижной фазой на основе смеси ацетонитрил – вода (72:28), содержащей по 10 мМ калий-фосфатного буфера (pH=3.2) и хлорида тетраметиламмония. Впрочем, в других работах использовали смеси ацетонитрила с водой без каких-либо добавок [11, 12] или метанола с водой [13].

Цель настоящей работы – систематизация хроматографических методов анализа смеси тиофенов в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ и нормально-фазовой ТСХ.

Материалы и методы исследования

Корни растений трех видов бархатцев: отклоненных (*T. patula*), прямостоячих (*T. erecta*) и тонколистных (*T. tenuifolia*) и других растений сушили на воздухе до воздушно-сухого состояния, измельчали и экстрагировали ацетонитрилом непосредственно в ступке при разминании пестиком. Экстракт отделяли от осадка и переносили в мерную колбу, туда же добавляли вторую порцию экстракта, полученную аналогично из твердого остатка и новой порции экстрагента. Раствор в колбе доводили до метки, и перед введением в хроматограф фильтровали через мембрану фторопластовую гидрофильную МФФК-3Г (0.45 мкм).

В работе использована хроматографическая система, составленная из насоса Al-tex 110А, крана дозатора Rheodyne 7200 с петлей объемом 20 мкл. Хроматографическая колонка: 4×250 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм. Детектор – спектрофотометрический с варьируемой длиной волны (детектор Nicolet LC/9563). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП МультиХром 1.5.

Для разделения тиофенов по фракциям использовали ТСХ на пластинах «Сорбфилл» (10×10 см, силикагель) в подвижных фазах *n*-гексан – ацетон (10:1; $R_f = 0.59$ – фракция 1 и 10:0.05 $R_f = 0.80$ – фракция 2 и $R_f = 0.84$ – фракция 3).

Исследование фракций методом ГХ-МС: Хроматограф: Agilent 6890N. Колонка: кварцевая капиллярная EVDX-5ms (длина 25 м, внутренний диаметр 0.20 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0.33 мкм). Газ-носитель: гелий, расход через колонку 0.8 мл/мин. Температурный режим колонки: градиент - начальная температура 50°C, выдержка 0.5 мин, подъем до 100°C со скоростью 99°/мин и выдержка 1 мин, подъем до 300°C со скоростью 35°/мин и выдержка 20 мин; время записи хроматограммы 27 мин. Испаритель: режим без деления потока (0.4 мин), температура 270°C, объем вводимой пробы 1 мкл. Интерфейс детектора: температура 290°C. Детектор: масс-спектрометрический квадрупольный Agilent 5975С. Тип ионизации: электронный удар (70 эВ). Температура ионного источника 230°C. Температура масс-фильтра 150°C. Диапазон масс: 45-550 а.е.м. Система обработки данных: MSD ChemStation E.01.00 (Agilent).

Для приготовления подвижных фаз использовали растворители: ацетон ч.д.а. ЗАО «Экос-1», ацетонитрил х.ч., ООО «ХромРесурс».

Результаты исследования и их обсуждение

ВЭЖХ тиофенов. Хроматограммы экстрактов боковых корней бархатцев трех видов, выращенных в условиях Белгорода, представлены на рис.1.

Очевидно, что набор тиофенов богаче в случае вида *T. erecta*: кроме одного основного пика, характерного для экстракта корней *T. tenuifolia*, на хроматограмме детектируются второй и третий компоненты, составляющие конкуренцию веществу II; в экстракте корней *T. patula* содержание этих компонент несколько меньше. Вещества I-III были идентифицированы с использованием разделения экстракта на три фракции тиофенов с последующим определением соединений методом ГЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

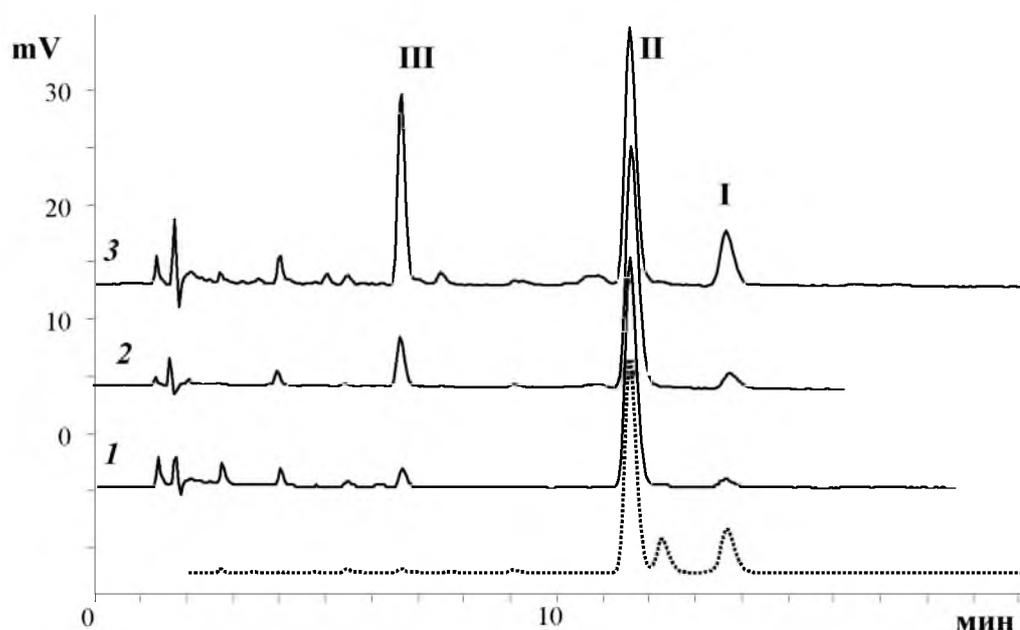


Рис. 1. Разделение тиофенов экстрактов корней растений рода *Tagetes*
 1 – *T. tenuifolia*; 2 – *T. patula*; 3 – *T. erecta*; пунктир ная линия – *Echinops sphaerocephalus*.
 Колонка: 250×4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм; подвижная фаза: вода – ацетонитрил (2 : 8 об.),
 1 мл/мин., детектор: 340 нм

При исследовании хроматографического поведения экстрактов корней бархатцев в различных составах подвижных фаз системы «ацетонитрил – вода» было установлено, что осложнений в разделении трех основных тиофенов (I–III) нет. Т.е. в таких случаях нет необходимости в усложнении состава подвижной фазы введением каких-либо добавок. Поскольку соединения I–III можно отнести к гидрофобным, то интерес представляла возможность существования общности в аналитической зависимости относительного удерживания пар веществ, характерная для гидрофобных соединений [14]. Такая общность может быть использована для предположительной идентификации соединений при отсутствии стандартных образцов соединений. На карте относительного удерживания [15], в которой в качестве вещества сравнения использовано производное II, представлены данные, полученные при выполнении настоящей работы, и точки, построенные по литературным данным (для других стационарных фаз), рис.2. Относительное удерживание вещества I по данным, полученным в разные дни на протяжении одного года, описывается уравнением с тангенсом угла наклона, близким к единице:

$$\lg k(\text{I}) = 0.989 \cdot \lg k(\text{II}) + 0.090, \quad (1)$$

с отклонением не более 0.003 логарифмические единицы, хотя были использованы две колонки различной длины (250 и 150 мм) с фазами Диасфер-110-С18 из различных партий сорбента, причем во втором случае колонка была без эндкеппинга. Отсутствие эндкеппинга не привело также и к отклонению точек, полученных для фазы без эндкеппинга, от общего уравнения относительного удерживания соединения III:

$$\lg k(\text{III}) = 0.909 \cdot \lg k(\text{II}) - 0.260, \quad (2)$$

что может свидетельствовать о незначительности вклада водородной связи в суммарное удерживание соединения III, несмотря на наличие сложноэфирной группировки в молекуле.

Относительно согласованности полученных зависимостей с точками, построенными по литературным данным, отметим следующее:

1) относительное удерживание соединения I по данным работы [10] с небольшим для грубого указания времени удерживания (с точностью до одного знака после за-

пятой) соответствует уравнению (1); для данных работ [12] и [13] такое отклонение несколько больше;

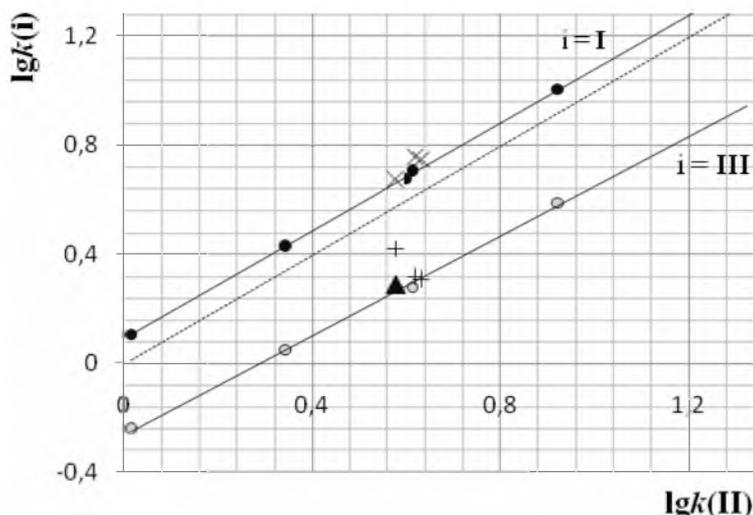


Рис. 2. Карта разделения веществ (I – III)

2) относительное удерживание соединения **III**, напротив, хорошо соответствует уравнению (2) для данных работ [12] и [13]; а по данным работы [10] этому уравнению соответствует удерживание соединения, идентифицированного как вещество **IV** (\blacktriangle); при этом увеличения удерживания вещества **III** нельзя объяснить введением в элюент ион-парной добавки. Подобная ситуация больше похожа на ошибку в идентификации тиофенов, тем более, что в экстракте существует соединение, элюирующееся между веществами **II** и **III**, хорошо заметное при детектировании при длине волны 290 нм, рис. 3.

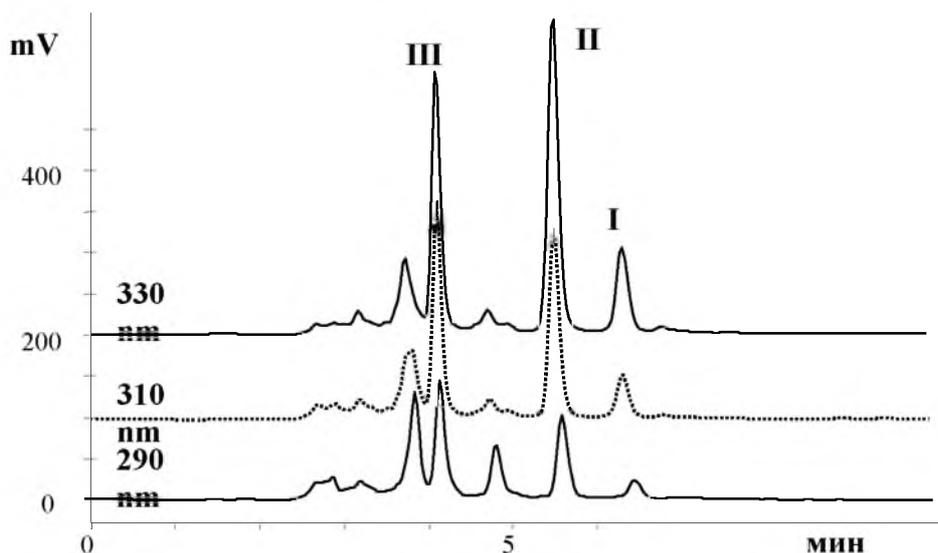


Рис. 3. Хроматограммы экстракта корней *T. erecta* при различных длинах волн
Подвижная фаза 100% ацетонитрил.

Таким образом, вероятность образования водородных связей между остаточными силанольными группами и веществом **III** не велика, но иной тип взаимодействия тиофенов со стационарными фазами исключить полностью нельзя. Однако в целом возможность переноса параметров относительного удерживания с одних стацио-



нарных фаз на другие существует, если не игнорировать возможность варьирования вкладов специфических взаимодействий «сорбат – сорбент» для каждой из рассматриваемых стационарных фаз.

Расширение числа объектов исследования на корни других растений семейства сложноцветные (*Compositae*) показало, что все-таки существует необходимость уточнения состава подвижной фазы. В частности она продиктована тем, что при исследовании тиофенов корней другого растения – *Echinops sphaerocephalus* выясняется, что в быстрых элюентах под пиком вещества **II** находился еще один компонент – **V**, строение которого в настоящей работе не устанавливали. Полное разделение **III** и **V** возможно только при содержании воды в водно-ацетонитрильных подвижных фазах более 20 об.%, рис. 4.

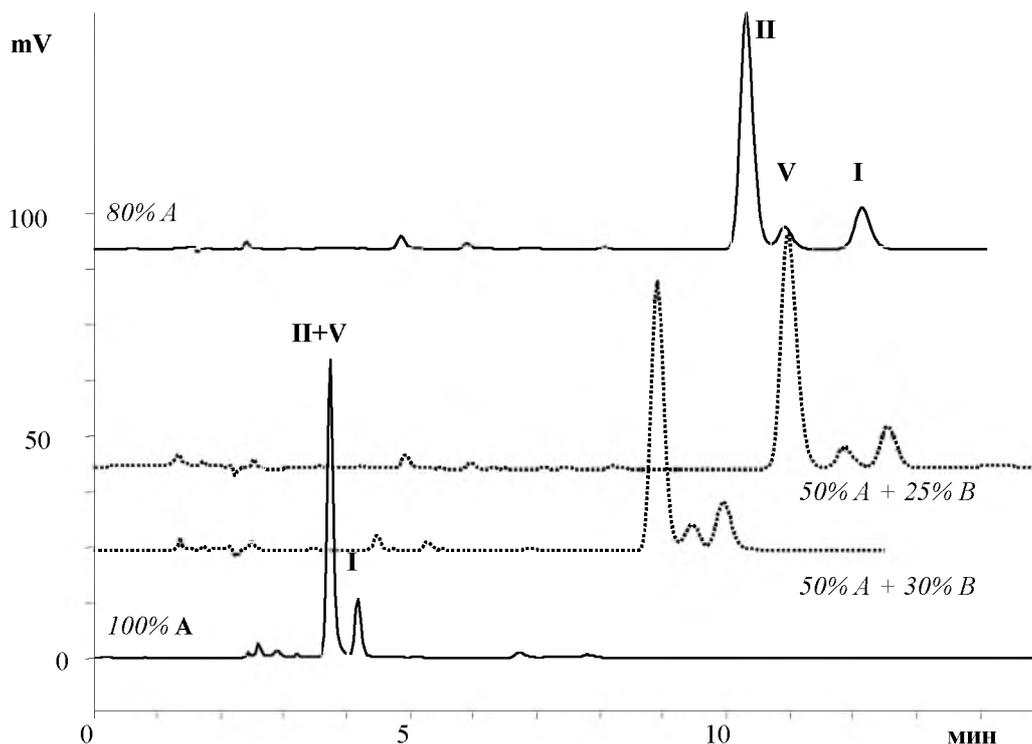


Рис. 4. Разделение веществ экстракта *Echinops sphaerocephalus*

На рисунке указаны объемные доли органических модификаторов водных подвижных фаз: А – ацетонитрил; В – ацетон. Условия записи хроматограммы см. рис.1. V – неидентифицированный компонент

Для поиска оптимальных элюентов в настоящей работе исследовали влияние добавок 2-пропанола и ацетона на разделение веществ **II** и **V**. При этом по тангенсам углов наклона зависимостей «логарифм фактора удерживания **II** как функция объемной доли модификатора» было найдено, что элюирующая сила убывает в ряду:

ацетон – 2-пропанол – ацетонитрил.

При этом только добавки ацетона изменяют селективность разделения компонентов **II** и **V**, что позволяет разделить эти вещества **II** и **V** за меньшее время хроматографирования при прочих равных условиях, рис. 4.

Следовательно, более эффективными элюентами (по сравнению со смесями ацетонитрила с водой) являются смеси воды, ацетонитрила и ацетона (например, состава 20:50:30 по объему, соответственно).

Проблему количественного определения тиофенов мы решали комбинацией спектрофотометрического и хроматографического методов с учетом того, что молярные коэффициенты экстинкции тиофенов (**I–III**) различаются не более чем на 1-2 % [16]. В работе был использован молярный коэффициент экстинкции для соединения **I**, $\epsilon(\mathbf{I}) = 24100 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{дм}^3 \cdot \text{см}^{-1}$ [17]. Для количественного определения тиофенов в условиях ВЭЖХ выделяли концентрированную фракцию суммы соединений **I+II**, в получен-

ном концентрате определяли концентрацию тиофенов спектрофотометрическим методом; этот же концентрат затем использовали для градуировки отклика детектора, используя в дальнейшем этот же градуировочный коэффициент для веществ **I-III**. Результаты определения тиофенов в некоторых объектах представлены в табл.

Таблица

Содержание тиофенов I–III в корнях бархатцев и мордовника

Объект	Содержание тиофенов, г на 100 сухого материала			
	I	II	III	Сумма
<i>Tagetes tenuifolia</i> (бархатцы тонколистные)				
боковые корни (n = 3)	0.079 ± 0.005	0.722 ± 0.012	0.158 ± 0.003	0.959 ± 0.020
<i>T. patula</i> (бархатцы отклоненные)				
боковые корни (n = 3)	0.114 ± 0.007	0.535 ± 0.020	0.035 ± 0.005	0.684 ± 0.032
<i>T. erecta</i> (бархатцы прямостоячие)				
боковые корни (n = 7)	0.122 ± 0.005	0.172 ± 0.010	0.116 ± 0.010	0.418 ± 0.025
кора основного корня	0.012	0.071	0.827	0.911
основной корень	0.013	0.011	0.114	0.138
<i>Echinops sphaerocephalus</i> L. (мордовник шароголовый)				
боковые корни (n = 2)	0.394 ± 0.020	0.957 ± 0.005	0.018 ± 0.002	1.269 ± 0.027
кора основного корня	0.121	4.177	1.482	5.780
основной корень	0.002	0.113	0.041	0.156

Эти данные в целом согласуются с результатами работы [18] при несколько более высоком содержании тиофенов, найденном в нашей работе. Однако, во-первых, более точные результаты могут быть получены только при использовании не доступных нам стандартных образцов тиофенов, поскольку расчет содержания тиофенов при УФ-детектировании осложнен несовпадением максимумов абсорбции этих соединений, рис. 5. Во-вторых, количественные характеристики накопления тиофенов могут в значительной степени зависеть от подготовки материала (корней). Действительно, накопление этих веществ наиболее высоко именно в боковых (hair) корнях; при этом в основных корнях эти вещества локализованы во внешней части, что не удивительно, если предполагать, что биосинтез тиофенов определяется их защитной функцией. Кроме того, количественное соотношение веществ **I–III** во всех частях растения не одинаково – во внешней части основного корня преобладает соединение **III**. Наконец, накопление тиофенов в боковых корнях уменьшается при переходе от бархатцев тонколистных к бархатцам прямостоячим, что качественно также согласуется с выводами работы [19], при этом также совпадают тенденции к изменению соотношения тиофенов в экстрактах корней различных видов бархатцев.

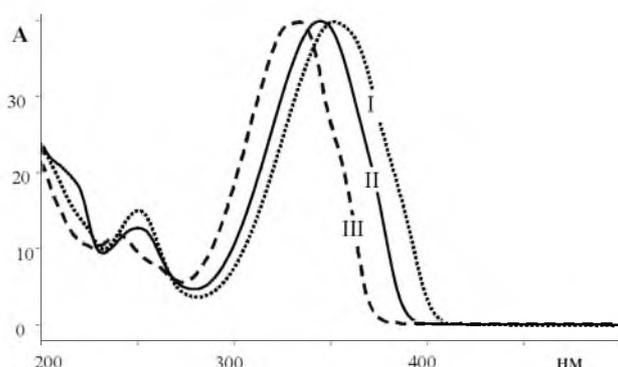


Рис. 5. Спектры соединений I–III
Растворитель: вода – ацетонитрил (20–80 об.). Спектр записан в кювете детектора

Проверяя сообщения о том, что производные тиофенов накапливаются в корнях других растений семейства сложноцветные, мы использовали разработанный метод для анализа экстрактов корней амброзии полыннолистной, пижмы обыкновенной и золотарника канадского. И только в корнях амброзии найдено соединение **I** – около 0.050 г на 100 г сухого материала (рис. 6.)

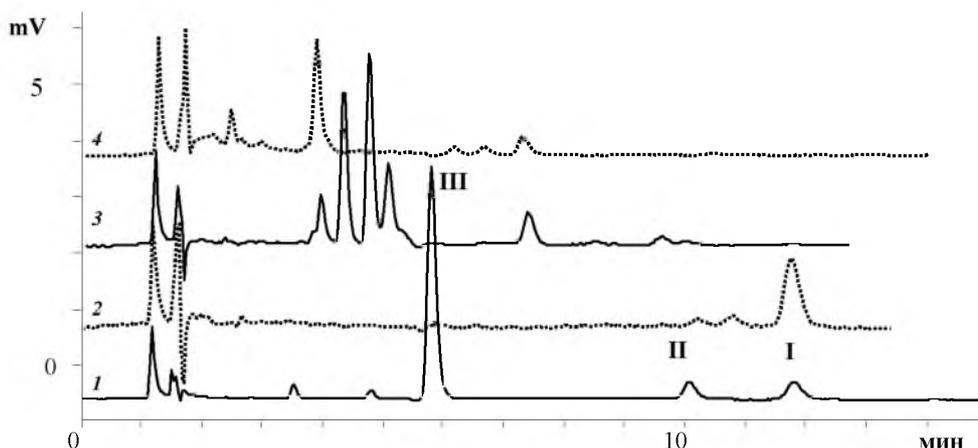


Рис. 6. Хроматограммы экстрактов корней некоторых растений семейства *Compositae*. Растения: 1 – внешняя часть основного корня *T. erecta*; 2 – *Ambrosia artemisiifolia*; 3 – *Tanacetum vulgare*; 4 – *Solidago canadensis*.

Тонкослойная хроматография

Для быстрого определения тиофенов I–III в растительных объектах очень удобна тонкослойная хроматография на алюминиевых пластинах Сорбфил с силикагелевым адсорбционным слоем и с проявлением пятен под действием УФ-облучения (354 нм) благодаря интенсивной флуоресценции пятен тиофенов синим светом. Т. е. для обнаружения тиофенов нет необходимости в каких-либо дополнительных обработках пластин. Только нельзя использовать пластины с силикагелем, нанесенным на пластиковую подложку.

В качестве элюентов удобно использование *n*-гексана с добавками ацетона. Из соединений I–III наивысшей подвижностью обладают вещества I и II, причем хроматографическая подвижность II немногим выше, чем соединения I; эти вещества могут быть разделены только при минимальных добавках ацетона (либо в чистом гексане). Любопытно, что интенсивность флуоресценции пятен увеличивается с ростом числа тиофеновых колец в молекуле, поэтому пятно соединения I на пластине светится интенсивнее, чем пятно соединения II, которого обычно больше в анализируемой пробе.

Использование ТСХ позволяет легко обнаружить тиофены в экстракте ксантофиллов из лепестков цветков бархатцев (рис. 7). Обращенно-фазовая ВЭЖХ в данном случае может быть использована только после специфической пробоподготовки. Она

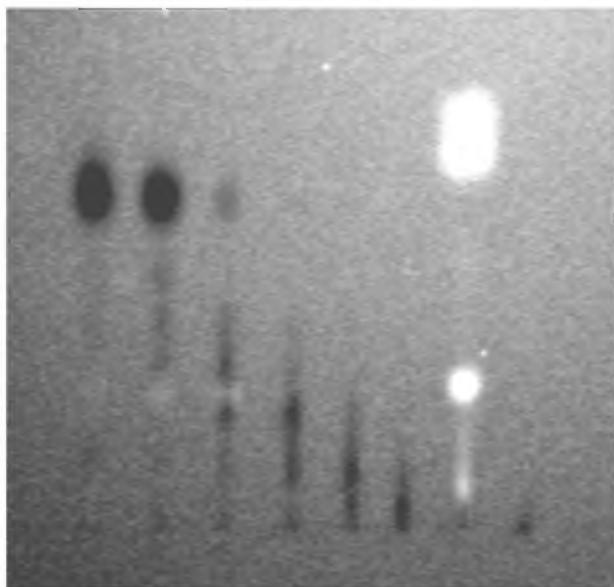


Рис. 7. ТСХ-граммы фракций экстракта лепестков цветков бархатцев

необходима для отделения сильно липофильных диэфиров лютеина от умеренно липофильных тиофенов, поскольку при использовании безводного ацетонитрила (для обнаружения тиофенов) диэфиры лютеина выпадают в осадок.

На фотографии показаны последовательные флеш-фракции, полученные с патрона ДИАПАК с силикагелем, на который была нанесена сумма экстрактивных веществ, экстрагированных *n*-гексаном из лепестков цветков бархатцев. Слева направо увеличивали содержание ацетона во флеш-фракции. Крайний справа ряд – экстракт корней бархатцев. Метод ТСХ был использован нами для исследования возможности очистки ксантофиллов от тиофенов методом флеш-хроматографии [20].

Этот же метод позволил установить наличие тиофенов в препарате ОРО ГЛО (Кемин, Бельгия), предназначенном для использования в качестве кормовой добавки при кормлении кур-несушек для увеличения накопления ксантофиллов в желтке яиц.

ГЖХ и масс-спектрометрия

Для идентификации тиофенов была использована газовая хроматография на капиллярной колонке (условия см. выше) с масс-спектрометрическим детектированием. Индивидуальные тиофены выделяли из смеси методом обращено-фазовой ВЭЖХ в выше изложенных условиях. Затем полученные фракции исследовали методом ГЖХ, записывая масс-спектры индивидуальных соединений **I–III** (рис. 8).

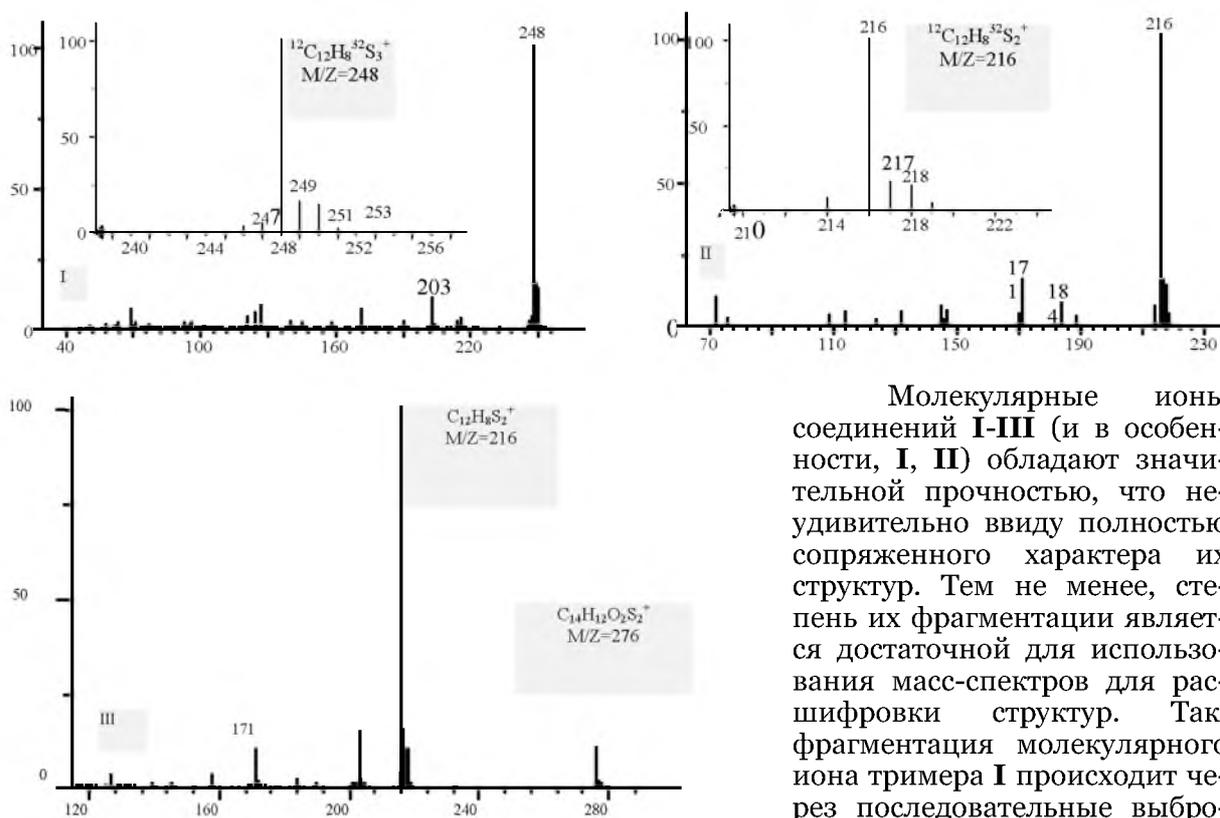


Рис. 8. Масс-спектры тиофенов I - III

$[C_{11}H_7S]^+$, m/z 171, и $[C_5H_3S_2]^+$, m/z 127, дающие интенсивные пики в спектре и, по-видимому, образующими прочные циклические структуры. Фрагментация молекулярных ионов соединений **II**, **III** в целом протекает с образованием подобных фрагментов; для молекулярного иона соединения **III** характерно отщепление молекул CO_2 ($[C_{13}H_{12}S_2]^+$, m/z 232) и уксусной кислоты ($[C_{12}H_8S_2]^+$, интенсивный пик с m/z 216).

Выводы

Таким образом, в настоящей работе выполнено комплексное исследование применимости хроматографических методов для определения природных тиофенов. Показано, что разделение (и определение) природных тиофенов в экстрактах различных частей растений рода *Tagetes* может быть выполнено с использованием предложенных в работе условий для ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, ТСХ по флуоресценции пятен в УФ-свете и ГЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

Список литературы

1. Riga E., Hooper C., Potter J. In vitro effect of marigold seed exudates on plant parasitic nematodes // Phytoprotection. – 2005. - Vol. 86. – P. 31–35.
2. Gommers F.J., Voorin'tholt D.J.M. Chemotaxonomy of Compositae related to their host suitability for *Pratylenchus penetrans* // Neth. J. Pl. Path. – 1976. – Vol. 82. – P.1–8.

Молекулярные ионы соединений **I–III** (и в особенности, **I**, **II**) обладают значительной прочностью, что неудивительно ввиду полностью сопряженного характера их структур. Тем не менее, степень их фрагментации является достаточной для использования масс-спектров для расшифровки структур. Так, фрагментация молекулярного иона тримера **I** происходит через последовательные выбросы серы ($[C_{12}H_8S_2]^+$, m/z 216 и $[C_{12}H_8S]^+$, m/z 184), а также через ионы $[C_{11}H_7S_2]^+$, m/z 203,



3. Mukundan U., Hjorsto M.A. Growth and thiophene accumulation by hairy root cultures of *Tagetes patula* in media of varying initial pH // *Plant Cell Rep.* – 1991. – Vol. 9. – P. 627-630.
4. Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Дейнека Л.А., Третьяков М.Ю. Исследование цветков *Tagetes* sp. как источника лютеина // *Хим.-фарм. ж.* – 2007. – Т. 41. – № 10. – С. 30-32
5. Rampone W.M., McCullough J.L., Weinstein G.D., Nail Towers G.H., Berns M.W., Abeyskera B. Characterization of cutaneous phototoxicity induced by topical alpha-terthienyl and ultraviolet A radiation // *J. Invest. Dermatol.* – 1986. – Vol. 87. – P.354-357.
6. Zeichmeister L., Sease J.W. A blue-fluorescing compound, terthienyl, isolated from marigolds // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1947. – Vol. 69. – P. 273-275.
7. Margl L., Tei A., Gyurajan I., Wink M. GLC and GLC-MS analysis of thiophene derivatives in plants and in *in vitro* cultures of *Tagetes patula* L. (*Asteraceae*) // *Z. Naturforsch.* – 2002. – Band. 57. – S. 63-71.
8. Szarka Sz., Hethelyi E., Lemberkovics E., Kuzovkina I.N., Banyai P., Szoke E. GC and GC-MS studies on the essential oil and thiophenes from *Tagetes patula* L. // *Chromatographia.* – 2006. – Vol. 63. – S. 67-73.
9. Benavides M.P., Caso O.H. Plant regeneration and thiophene formation in tissue cultures of *Tagetes mendocina* // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1993. – Vol. 35. – P. 211-215.
10. Downum K.R., Towers G.H.N. Analysis of thiophenes in the *Tageteae* (*Asteraceae*) by HPLC // *J. Nat. Prod.* – 1983. – Vol. 46. – P. 98-103.
11. Sütfeld R. Distribution of thiophene derivatives in different organs of *Tagetes patula* seedlings grown under various conditions // *Planta.* – 1982. – Vol. 156. – P. 536-540.
12. Croes A.F., van den Berg A.J.R., Bosveld M., Breteler H., Wullems G.J. Thiophene accumulation in relation to morphology in roots *Tagetes patula*. Effects of auxin and transformation by *Agrobacterium* // *Planta.* – 1989. – Vol. 179. – P. 43-50.
13. Mukundan U., Hjorsto M.A. Effect of fungal elicitor on thiophene production in hairy root cultures of *Tagetes patula* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1990. – Vol. 33. – P. 145 – 147
14. Дейнека В.И. Экспериментальное обоснование метода относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // *Ж. физ. химии.* – 2006. – Т. 80, № 3. – С. 507-510.
15. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // *Ж. физ. химии.* – 2006. – Т. 80, № 3. – С. 511-516.
16. Norton R.A., Finlayson A.J., Towers G.H.N. Thiophene production by crown galls and callus tissues of *Tagetes patula* // *Phytochemistry.* – 1985. – Vol. 24. – P. 719-722.
17. Sease J.W., Zeichmeister L. Chromatographic and spectral characteristics of some polythienyls. *J. Amer. Chem Soc.* – 1947. – Vol. 69. – P. 270-273.
18. Munkundan U., Hjorsto M.A. Effect of fungal elicitor on thiophene production in hairy root cultures of *Tagetes patula* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1990. – Vol. 33. – P. 145-147.
19. Maritti M., Piccaglia R., Marotti I., Venturi G. *Tagetes* spp.: a source of biologically active substances / Intern/. *South Eur. Symp. Non-Food Crops: From Agriculture to Industry.* Bologna, Italy, 15-16 May 2003 <http://www.ienica.net/italyseminar/italyseminarposters.html>
20. Дейнека В.И., Третьяков М.Ю., Сорокопудов В.Н. Флэш-хроматография: Очистка ксантофиллов бархатцев от тиофенов // *Хроматография и хромато-масс-спектрометрия. Всероссийский симпозиум. Москва, 14-18 апр. 2008 г., Тезисы.* – М.: Граница, 2008. – С. 114.

CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR NATURAL THIOPHENES DETERMINATION

V.I. Deineka¹

A.M. Grigoriev²

M.Yu. Tretyakov¹

¹ *Belgorod State National Research University*

Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia

E-mail: deineka@bsu.edu.ru

² *Belgorod Region Forensic Medical Examination Bureau*

Volchanskaya St., 159, Belgorod, 308017, Russia

Reversed-phase HPLC with spectrophotometric detection has been used for the investigation of resolution of natural thiophenes being the *Tagetes* characteristic substances common for some other *Asteraceae* plants. Particularities of the resolution in mobile phases with acetonitrile, acetone and 2-propanol are discussed. Quantitative determination of thiophenes has been performed spectrophotometrically, the structure has been proved by GC with MS-detection. Determination of thiophenes by TLC upon "SORBFIL" silica plates may be performed due to blue fluorescence at UV (354 nm) excitation.

Key words: RP HPLC, TLC, GC, spectrophotometry, MS, thiophene, *Tagetes* sp.