

ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского»

**Е.Г. Сумина, С.Н. Штыков,
В.З. Углонова, Н.В. Кулакова**

**Тонкослойная хроматография.
Теоретические основы
и практическое применение**

Учебное пособие

Саратов,
2012

УДК 543:544.42

ББК 24.58

С89

Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Углонова В.З., Кулакова Н.В.

Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение: Учебное пособие. – Издание 3-е, дополненное. 128 с.

В пособии рассмотрены теоретические аспекты, варианты метода, техника работы и практическое применение тонкослойной хроматографии (ТСХ) в химическом анализе и препаративном разделении смесей неорганических и органических соединений.

Учебное пособие предназначено для преподавателей, аспирантов, студентов старших курсов химических факультетов университетов, изучающих хроматографические методы анализа и использующих ТСХ для контроля продуктов синтеза, а также для широкого круга специалистов, интересующихся применением ТСХ при анализе пестицидов, консервантов, пищевых продуктов, фармпрепаратов, биопрепаратов и других веществ.

Рекомендуют к печати:

Кафедра аналитической химии и химической экологии Института химии (ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»)

Введение

При решении аналитических задач, связанных с определением органических и неорганических соединений в сложной многокомпонентной матрице, возникает необходимость в привлечении методов быстрой качественной или полуколичественной оценки состава образца. Желательно также, чтобы этот метод мог сочетаться с инструментальным количественным определением. В этом отношении наиболее перспективным является метод *тонкослойной хроматографии* (ТСХ), предложенный в 1938 году российскими учеными Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбер.

ТСХ является одним из вариантов *плоскостной жидкостной хроматографии* (ЖХ), в котором разделение веществ происходит на открытом слое сорбента. Это определяет простоту, легкость проведения хроматографического эксперимента и низкую стоимость оборудования в ТСХ.

ТСХ используют не только как аналитический, но и препаративный метод, который обеспечивает разделение вещества в пределах от 10^{-3} - 10^{-12} г. Особенностью ТСХ является также то, что разделенные на пластинке отдельные зоны компонентов можно выделить и идентифицировать другими микроаналитическими методами: газовой, высокоэффективной жидкостной хроматографии, видимой-, УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и др. Современным вариантом ТСХ является *высокоэффективная тонкослойная хроматография* – ВЭТСХ и ВЭТСХ под давлением (ОPLC), воспроизводимость определения в которых позволяет реализовать высокую эффективность, чувствительность, скорость и четкость разделения.

В настоящее время ТСХ и ВЭТСХ широко используются в органической, неорганической и аналитической химии, так как по абсолютной чувствительности и возможности идентификации веществ в сложных смесях они превосходят многие известные приемы и методы.

Анализ методом ТСХ включает следующие стадии: подготовку пробы, подготовку пластины, нанесение образца, подготовку хроматографической камеры, элюирование разделяемых веществ, удаление элюента с пластины, детектирование компонентов, их идентификацию и полуколичественный анализ. Каждая из перечисленных операций имеет самостоятельное значение и влияет на результат анализа.

Кроме того, поскольку разделение в ТСХ происходит в *открытой* хроматографической системе, результаты анализа существенно зависят и от внешних факторов. Так, относительная влажность в камере влияет на состояние гидрофильных слоев сорбента. Сорбент также способен улавливать загрязняющие

вещества из воздуха, а сами компоненты могут изменяться под влиянием кислорода или света. Таким образом, отсутствие контроля за большим числом внешних параметров может быть причиной невоспроизводимости и искажения результатов анализа.

Для того чтобы в полной мере использовать уникальные возможности ТСХ, необходим достаточно высокий уровень знаний метода, понимание его основ и особенностей. В связи с тем, что доступные руководства по ТСХ в отечественной литературе отсутствуют, а зарубежные малодоступны, настоящее пособие призвано восполнить этот пробел.

Глава 1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС И ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКИ В ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ТСХ является разновидностью планарной жидкостной хроматографии, в которой подвижная фаза движется в пористой среде плоского слоя сорбента под действием капиллярных сил. Скорость движения вещества определяется соотношением времени его удерживания в потоке элюента и удерживания за счет сорбции на неподвижной фазе. При движении элюента вдоль плоскости каждая молекула или ион растворенного вещества участвует в многочисленных актах сорбции и десорбции. В процессе хроматографирования зона каждого вещества проходит характерное расстояние, определяемое его природой. Обычно эти зоны размыты за счет флуктуации средней скорости движения индивидуальных молекул вдоль пластины (Рис.1).

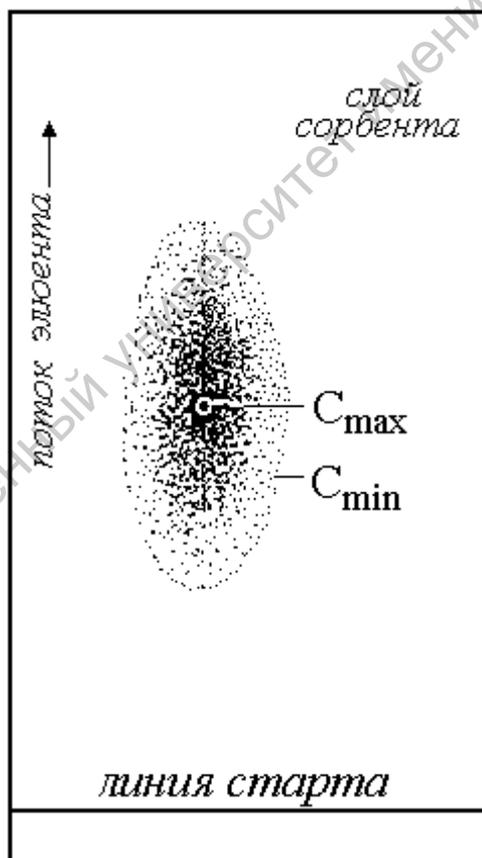


Рис. 1. Размывание пятна в ТСХ; **C** – концентрация вещества

Таким образом, основным в ТСХ является процесс независимого движения компонентов разделяемой смеси в потоке элюента вдоль пластины с постепенным размыванием хроматографических зон, форма которых существенно зависит от изотермы адсорбции.

1.1. Изотерма адсорбции

Важной характеристикой любого хроматографического процесса является *изотерма сорбции*. В адсорбционной хроматографии она носит название *изотермы адсорбции*, в распределительной – *изотермы распределения*. *Изотерма адсорбции (распределения)* – это кривая зависимости концентрации вещества в неподвижной фазе ($C_{\text{нф}}$) от концентрации вещества в подвижной ($C_{\text{пф}}$) фазе при постоянной температуре и условиях равновесия. Отношение этих концентраций называют *коэффициентом распределения D* :

$$D = \frac{C_{\text{нф}}}{C_{\text{пф}}} \quad (1)$$

Для адсорбционного механизма хроматографирования D имеет размерность $(\text{г/г})/(\text{г/см}^3) = (\text{см}^3/\text{г})$, для жидкостно-жидкостного распределения $D = (\text{г/см}^3)/(\text{г/см}^3)$ – безразмерная величина.

Отношение количеств (но не концентраций) вещества в двух фазах определяет величину “фактора емкости” (“коэффициента емкости”), в последнее время называемого “*фактором удерживания*” k' . Величины D и k' пропорциональны между собой :

$$k' = \frac{C_{\text{нф}} V_{\text{нф}}}{C_{\text{пф}} V_{\text{пф}}} = D \frac{V_{\text{нф}}}{V_{\text{пф}}} \quad (2) ,$$

где $V_{\text{нф}}$ и $V_{\text{пф}}$ – объемы неподвижной и подвижной фаз, соответственно.

Коэффициент распределения определяют из наклона линейной части соответствующей изотермы сорбции (рис.2). Количественное разделение смеси на отдельные компоненты возможно, когда значения D в выбранной системе различаются между собой не менее чем на 0.001.

Как видно из рис. 3, вид изотермы сорбции влияет на форму хроматографической зоны. Различают три основные формы изотермы: линейную (А), выпуклую (В) и вогнутую (С). Степень кривизны определяется относительно оси $C_{\text{пф}}$. В области небольших концентраций образца при адсорбционных процессах большинство изотерм имеет

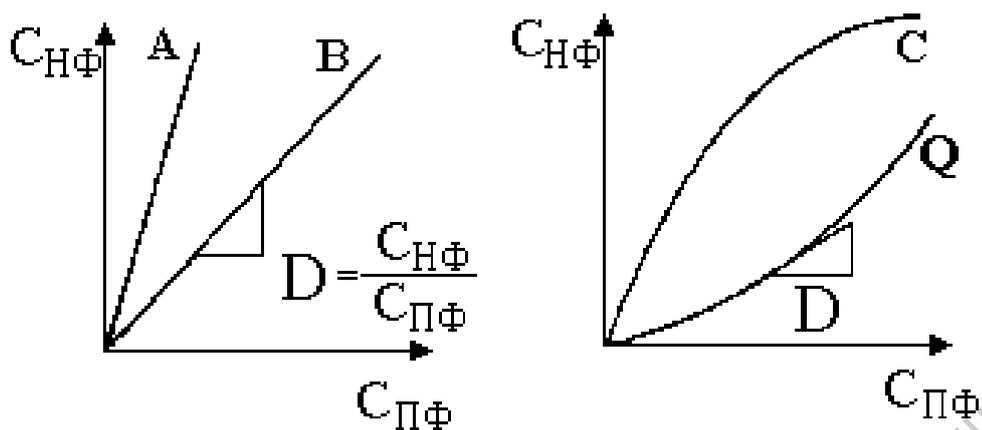


Рис. 2. Определение коэффициента распределения из изотермы сорбции

линейный характер, при повышении концентрации линейная зависимость нарушается, и они становятся вогнутыми или выпуклыми. Линейные изотермы приводят к появлению симметричных хроматографических зон. Выпуклые и вогнутые – вызывают их размывание.

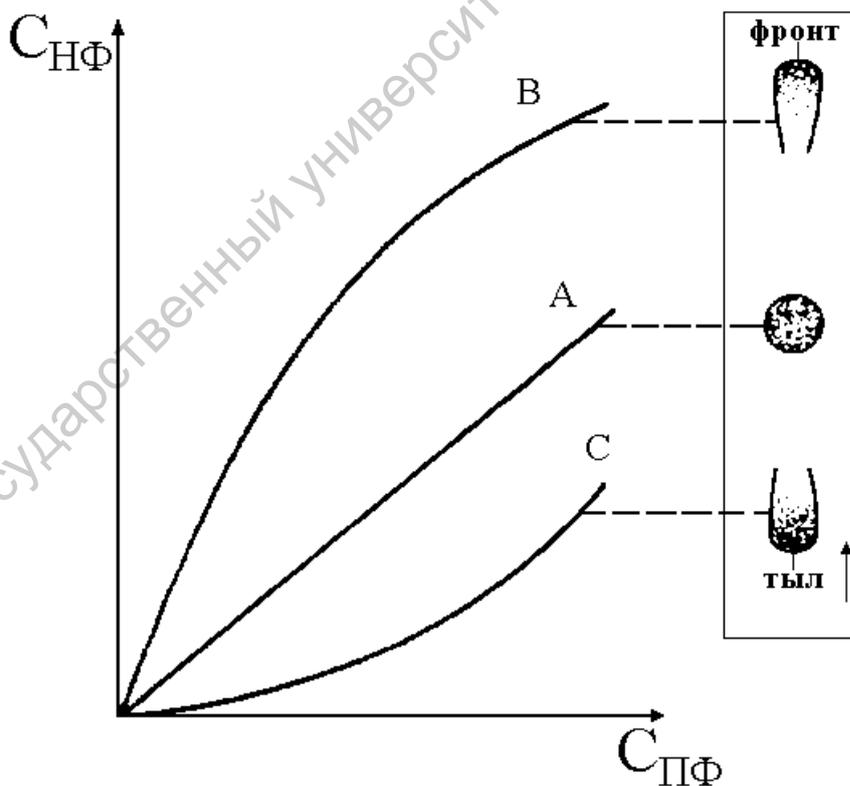


Рис. 3. Связь между изотермой сорбции и формой пятна в ТСХ.

Удлинение пятен может быть связано с кинетическими эффектами ("сопротивление массопереносу"), однако оно не зависит

от концентрации вещества в пробе.

В практической работе нелинейность изотерм является нежелательным фактором, поскольку не только приводит к изменению формы зон, но и влияет на воспроизводимость количественных определений. Изотермы могут быть выпрямлены *дезактивированием* сорбента или повышением элюирующей способности подвижной фазы. Деактивирующие добавки селективно занимают центры с наибольшей активностью, что делает поверхность сорбента более однородной. Хорошо дезактивированные силикагели сортов, применяемых в ТСХ, обладают сорбционной емкостью в 5-15 раз более высокой, чем оптимально дезактивированный оксид алюминия. При толщине слоя силикагеля, используемой для аналитических определений (~0.25 мм), и средней активности (при относительной влажности 45%) линейность изотермы не нарушается при нанесении 5-20 мкг образца.

1.2. Параметры тонкослойной хроматографии

Параметр	Формула расчета
R_f	$R_f = \frac{l}{L}$
R'_f	$R'_f = \xi \cdot R_{f_{\text{экспер}}}$
R_m	$R_m = \lg \left(\frac{1-R_f}{R_f} \right)$
R_c	$R_{c_i} = \frac{(R_m)_i - (R_m)_{\text{basis}}}{(R_m)_{\text{CH}_2}}$
R_k	$R_{k_i} = R_{m_i} - R_{m_{\text{ЭТ}}}$
$R_{f_{\text{цб}}}$	$R_{f_{\text{цб}}} = \sqrt{R_{f_{\text{лин}}}}$
$R_{f_{\text{цс}}}$	$R_{f_{\text{цс}}} = \sqrt{1-R_{f_{\text{лин}}}}$

Величина R_f в линейной ТСХ

В соответствии с коэффициентами распределения разделяемые компоненты переносятся подвижной фазой вдоль слоя сорбента, образуя отдельные зоны. Положение каждой зоны характеризуется величиной R_f (rate fraction) – физический смысл которой определяется отношением скоростей движения зоны определяемого вещества и

элюента. Поскольку на практике измерить эти величины трудно величину R_f , называемую *подвижностью*, экспериментально определяют как отношение расстояния l , пройденного веществом от точки нанесения пробы до центра зоны, к расстоянию L , пройденному элюентом от линии старта до линии фронта элюента за то же время (рис. 4, уравнение 3).

$$R_f = \frac{l}{L} \quad (3)$$

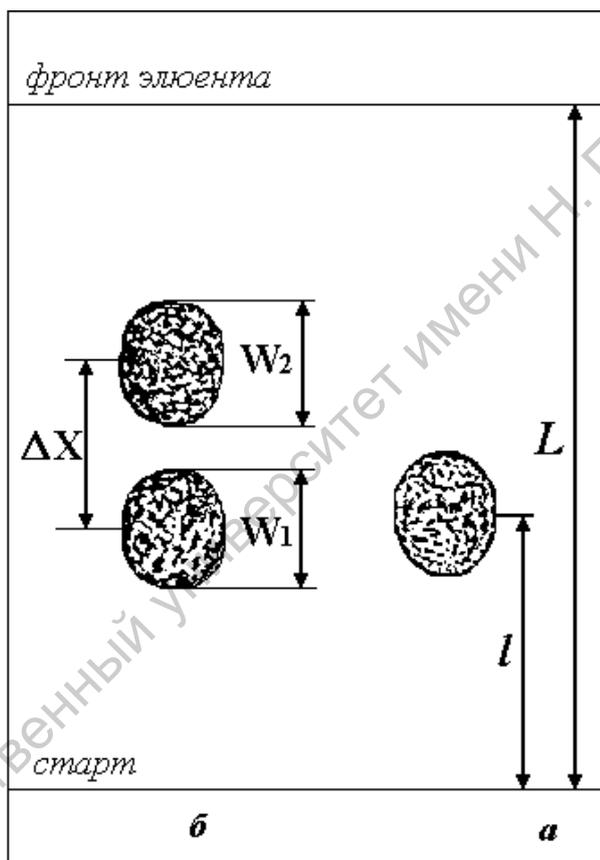


Рис. 4. Определение R_f (а) и разрешения R (б) хроматографических зон на пластине

Величина R_f является индивидуальной характеристикой соединения, хроматографируемого в данном растворителе, в условиях опыта и изменяется от 0 до 1. Оптимальным для практической ТСХ является интервал изменения R_f от 0.2 до 0.8. При $R_f = 0$ вещество не движется, при $R_f = 1$ вещество не задерживается неподвижной фазой и движется с фронтом растворителя.

Иногда для получения более надежных результатов подвижность соединений оценивают по отношению к подвижности вещества, выбранного в качестве стандарта, свидетеля или эталона.

Относительная подвижность $R_{f\text{отн}}$ выражается формулой

$$R_{f\text{отн}} = \frac{R_{fX}}{R_{f\text{св}}} = \frac{l_X}{l_{\text{св}}} \quad (4) ,$$

где R_{fX} и l_X – подвижность и расстояние на хроматограмме, пройденное определяемым компонентом;

$R_{f\text{св}}$ и $l_{\text{св}}$ – подвижность и расстояние на хроматограмме, пройденное свидетелем.

Значение $R_{f\text{отн}}$ может быть больше единицы. Значение R_f , рассчитанное по уравнению 3, никакой информации о хроматографическом процессе не дает в отличие от *термодинамического значения* подвижности R'_f , которое учитывает процесс хроматографического распределения вещества между подвижной и неподвижной фазой.

R'_f имеет следующий смысл:

- определяет среднюю вероятность пребывания молекулы сорбата в подвижной фазе;
- указывает относительное время пребывания молекулы в подвижной фазе;
- определяет долю молекул сорбата в подвижной фазе

$$R'_f = \frac{n_{\text{пф}}}{n_{\text{пф}} + n_{\text{нф}}} = \frac{m_{\text{пф}}}{m_{\text{пф}} + m_{\text{нф}}} \quad (5)$$

$$1 - R'_f = \frac{n_{\text{нф}}}{(n_{\text{пф}} + n_{\text{нф}})} \quad (6) ,$$

где $n_{\text{пф}}$ – число молей сорбата в подвижной фазе;

$n_{\text{нф}}$ – число молей сорбата в неподвижной фазе;

$m_{\text{пф}}$ – масса сорбата в подвижной фазе;

$m_{\text{нф}}$ – масса сорбата в неподвижной фазе.

Уравнение (5) позволяет вывести основную зависимость между термодинамическим значением R'_f , коэффициентом распределения D и “фазовым отношением” $V_{\text{нф}}/V_{\text{пф}}$:

$$R'_f = \frac{m_{\text{пф}}}{m_{\text{пф}} + m_{\text{нф}}} = \frac{C_{\text{пф}} V_{\text{пф}}}{C_{\text{пф}} V_{\text{пф}} + C_{\text{нф}} V_{\text{нф}}} =$$

$$= \frac{V_{\text{пф}}}{V_{\text{пф}} + \left(\frac{C_{\text{нф}}}{C_{\text{пф}}} \right) \cdot V_{\text{нф}}} = \frac{1}{1 + \frac{C_{\text{нф}}}{C_{\text{пф}}} \cdot \frac{V_{\text{нф}}}{V_{\text{пф}}}}$$

После замены $C_{\text{нф}}/C_{\text{пф}}$ коэффициентом распределения и $V_{\text{нф}}/V_{\text{пф}}$ соотношением $A_{\text{нф}}/A_{\text{пф}}$ получим:

$$R'_f = \frac{1}{1 + D \cdot \frac{A_{\text{нф}}}{A_{\text{пф}}}} \quad (7)$$

Величина $V_{\text{нф}}/V_{\text{пф}}$ численно равна $A_{\text{нф}}/A_{\text{пф}}$ – отношению фаз в сечении слоя (“фазовое отношение”). Уравнение (7) получило название уравнения Мартина-Синга. Оно применимо для жидкостно-жидкостной ТСХ.

Снайдером выведено аналогичное уравнение для жидкостно-адсорбционной ТСХ:

$$R'_f = \frac{1}{1 + K_G \cdot \frac{W_A}{V_M}} \quad (8) ,$$

где K_G – коэффициент адсорбции;

W_A – масса сорбента в неподвижной фазе;

V_M – мертвый объем в слое перед элюированием без предварительного насыщения молекулами растворителя из газовой фазы в камере.

Произведения $D(A_{\text{нф}}/A_{\text{пф}})$ или $K_G(W_A/V_M)$ равны k' – фактору удерживания. Следовательно:

$$R'_f = \frac{1}{1 + k'} \quad (9)$$

Откуда

$$k' = \frac{1-R'_f}{R'_f} \quad (10) ,$$

где $(1- R'_f)$ пропорционально количеству растворенного вещества в неподвижной фазе, а R'_f пропорционально количеству растворенного вещества в подвижной фазе.

Если фазовое отношение известно, коэффициент распределения может быть подсчитан (в идеальной системе) по значениям R'_f :

$$D = \frac{A_{\text{пф}}}{A_{\text{нф}}} \left[\frac{1-R'_i}{R'_i} \right] \quad (11)$$

Фазовое отношение можно определить следующими способами:

1. Определяют величину D для растворенного вещества экстракционным методом, хроматографируют исследуемое соединение на тонкослойной пластинке и рассчитывают $A_{\text{нф}}/A_{\text{пф}}$ по уравнению (11) (если такой подход доступен).

2. При использовании в качестве подвижной фазы не очень летучего растворителя используют гравиметрический метод, измеряя массу слоя сорбента до и после элюирования.

Измеренное значение R_f может оказаться равным термодинамическому R'_f , если

- а) фазовое отношение вдоль слоя постоянно;
- б) состав слоя вдоль пластинки неизменен;
- в) скорости продвижения фронта подвижной фазы и растворителя в месте нахождения пятна одинаковы;
- г) в слое перед началом элюирования не было молекул растворителя или молекул любой другой подвижной жидкости.

Если эти условия не соблюдаются $R_{f_{\text{экспер}}}$ будет меньше значения R'_f и тогда

$$R'_f = \xi \cdot R_{f_{\text{экспер}}} ,$$

где ξ - поправочный коэффициент, который в зависимости от условий попадает в интервал 1.0 – 1.6.

На величину поправочного коэффициента ξ влияет природа сорбента, растворителя, способ элюирования и продолжительность предварительного насыщения сорбента. При использовании силикагелей этот коэффициент выше, чем при работе с оксидом

алюминия. В случае обращенных фаз ξ принимает промежуточные значения.

Величина R_f в круговой тонкослойной хроматографии

Для перехода от значений R_f , соответствующих “линейным” вариантам разделений, к значениям R_f в круговой тонкослойной хроматографии используют следующие соотношения:

$$R_{f_{цб}} = \sqrt{R_{f_{лин}}} \quad (12)$$

$$R_{f_{цс}} = \sqrt{1 - R_{f_{лин}}} \quad (13)$$

Значения R_f в круговой центробежной хроматографии выше значений $R_{f_{лин}}$, а в центростремительной ниже соответствующих значений R_f для линейной хроматографии, как это видно из рис.5. Исключением являются случаи при $R_f = 0$ и $R_f = 1$, когда подвижность веществ во всех вариантах ТСХ одинакова. В практической работе могут быть отклонения от уравнений 12 и 13. Это связано с сильным фронтальным градиентом растворителя, профиль которого зависит от его природы, способа подачи и других факторов.

Параметр R_m

Параметр R_m связан со структурными особенностями анализируемого вещества и находится в логарифмической зависимости от значений R_f :

$$R_m = \lg \left(\frac{1 - R_f}{R_f} \right) \quad (14)$$

Это уравнение предложено Бейт-Смитом.

Используется также другое уравнение, выведенное Райчлом:

$$R_m^* = \lg \left(\frac{R_f}{1 - R_f} \right) \quad (15)$$

Значения R_m и R_m^* равны и отличаются только знаком: $R_m = -R_m^*$. Графики зависимостей R_m и R_m^* от R_f представлены на рис. 6. Параметр R_m более часто используется, чем R_m^* .

Основываясь на связи между R_m и R_f , уравнение (7) может быть преобразовано к виду (16):

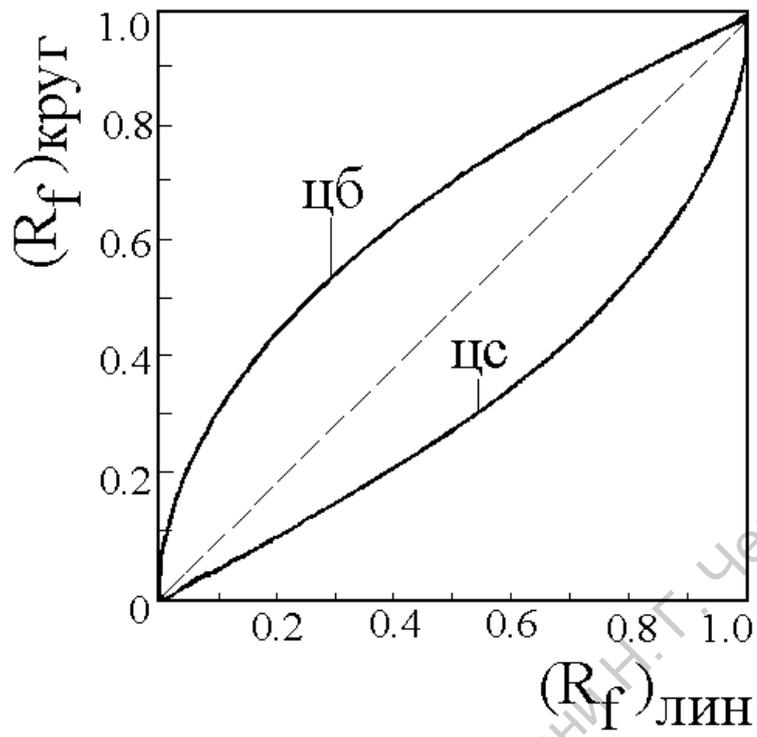


Рис. 5. Отклонение значений R_f в круговой ТСХ: **цб** – центробежная; **цс** – центростремительная; **лин** – линейная ТСХ

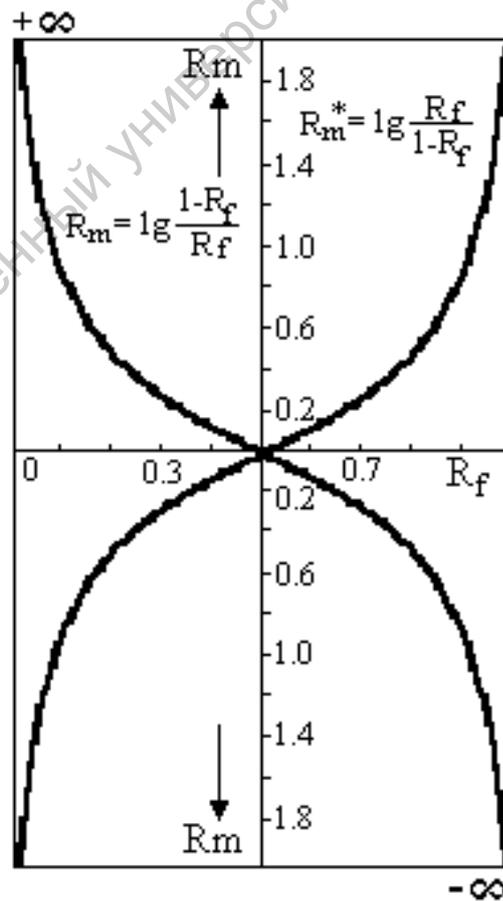


Рис. 6. Взаимосвязь R_f и R_m

$$R_m = \lg \left(\frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}} \right) + \lg D = \lg k' \quad (16) ,$$

которое используется в жидкостно-жидкостной (распределительной) хроматографии.

По аналогии для адсорбционной хроматографии имеем уравнение (17):

$$R_m = \lg \left(\frac{W_A}{V_M} \right) + \lg D \quad (17) ,$$

где W_A – масса адсорбента;

V_M – свободный объем слоя (“мертвый объем”).

Подставляя в уравнение (16) вместо $\lg D$ выражение

$$\frac{\Delta G^\circ}{2,3RT} = \lg D \quad (18) ,$$

получаем уравнение Мартина

$$R_m = \lg \frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}} + \frac{\Delta G^\circ}{2.3RT} \quad (19) ,$$

где ΔG° – изменение свободной энергии при фазовом переходе одного моля растворенного вещества при стандартных условиях. ΔG° отражает изменения в хроматографической системе природы растворителя, активности, pH и т.д. Уравнение Мартина используется для установления структуры анализируемых соединений методами хроматографии.

Параметр R_c

Параметр R_c был предложен Деккером в 1958 году. Он позволяет в некоторой степени устранить влияние фазовых градиентов, рассчитать значение R_c для исследуемого вещества по значениям R_m членов гомологического ряда, разделяемых в той же самой хроматографической системе. Принцип графического определения R_c показан на рис. 7.

С этой целью строится график значений R_m для гомологического ряда в зависимости от числа повторяющихся групп в гомологе (например групп CH_2) – n . О наличии градиента говорит искривленность графика.

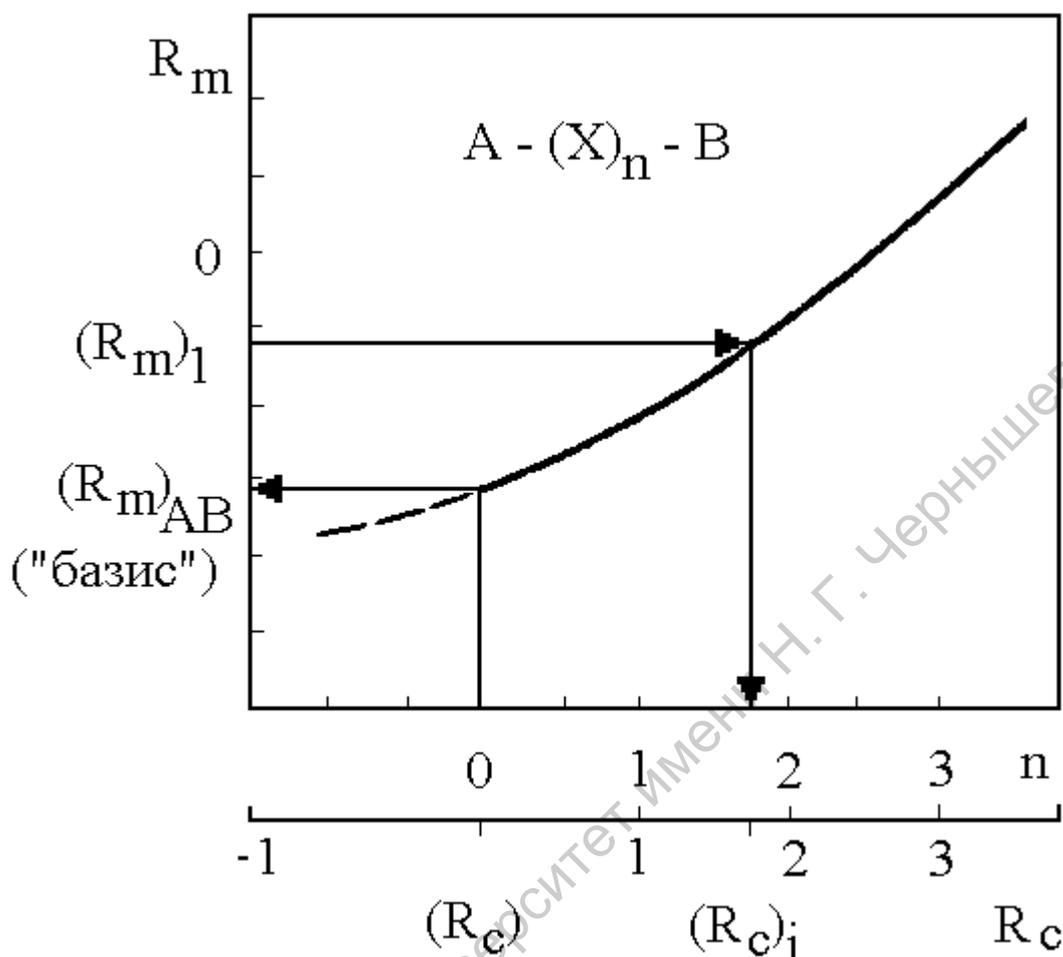


Рис. 7. Определение величины R_c

Если градиента нет, график представляется в виде прямой. Значение R_c для вещества i , находящегося в той же системе, определяют по градуировочному графику (рис. 7).

Если взаимосвязь R_m с n линейна, для вещества i можно записать

$$R_{c\ i} = \frac{(R_m)_i - (R_m)_{basis}}{(R_m)_{CH_2}} \quad (20)$$

“Базисом” для произвольного гомологического ряда является вещество с $n=0$. Значение $(R_m)_{CH_2}$ должно быть постоянным.

Значения R_c в тонкослойной хроматографии несколько схожи с предложенными Ковачем индексами удерживания для газовой хроматографии. Параметр R_c важен только при хроматографическом анализе структуры гомологических веществ, когда значения R_m не искажаются каким-либо градиентом. Эта величина не является

универсальной константой и не используется для коррекции внешних воздействий на систему.

Параметр R_k

Параметр R_k , предложенный Бреннером в 1963г., является характеристическим показателем, который не зависит от внешних условий. Этот параметр определяется разностью между R_m для исследуемого вещества и эталона:

$$R_{k\ i} = R_{m\ i} - R_{m\ \text{ЭТ}} \quad (21)$$

Объединение уравнений (16) и (21) дает выражение

$$R_{k\ i} = \lg\left(\frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}}\right)_i + \lg D_i - \lg\left(\frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}}\right)_{\text{ЭТ}} - \lg D_{\text{ЭТ}} \quad (22)$$

Исходя из предположения, что $(A_{\text{НФ}}/A_{\text{ПФ}})_i = (A_{\text{НФ}}/A_{\text{ПФ}})_{\text{ЭТ}}$ получим

$$R_{k\ i} = \lg \frac{D_i}{D_{\text{ЭТ}}} = \lg \frac{k'_1}{k'_2} \quad (23)$$

Из уравнения (23) видно, что величина R_k зависит только от коэффициентов распределения исследуемого и эталонного вещества и не зависит от фазового отношения.

Параметр $R_{\text{ЭТ}}$

$R_{\text{ЭТ}}$ рассчитывается по уравнению (4). В отличие от параметра R_k , величина $R_{\text{ЭТ}}$ зависит от фазового отношения и может быть также рассчитана по уравнению

$$R_{\text{ЭТ}} = \frac{1 + D_{\text{ЭТ}} \left(\frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}}\right)}{1 + D_i \left(\frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}}\right)} \quad (24)$$

Параметр $R_{\text{ЭТ}}$ зависит от условий хроматографирования анализируемой системы.

Параметр R_f°

Этот параметр дает возможность сопоставлять значения R_f для вещества i в исследуемой системе с величинами R_f для того же самого вещества в другой “эталонной” системе. Взаимосвязь двух

систем обеспечивается применением двух выбранных эталонных веществ Т и U, значения R_f для которых должны быть определены в двух системах:

$$R_{f_i}^0 = a R_{f_i} + b \quad (25)$$

Величина $(R_f)_i$ – значение R_f для вещества i в исследуемой системе, а $(R_f^0)_i$ – то значение R_f , которое должно быть рассчитано на основании данных о поведении в эталонной системе. Константы a и b определяются по следующим уравнениям:

$$a = \frac{(R_f^0)_T - (R_f^0)_U}{(R_f)_T - (R_f)_U} \quad (26)$$

$$b = R_{f_I} - a R_{f_I} \quad (27)$$

$(R_f^0)_T$ и $(R_f^0)_U$ – значения для эталонных веществ Т и U в эталонной системе, $(R_f)_T$ и $(R_f)_U$ – значения R_f для тех же веществ в исследуемой системе.

Как следует из уравнений 20, 23, 24 для расчета R_c , $R_{эт}$, R_k требуется большой объем экспериментальных данных, большие временные затраты, чем для определения R_f и R_m . Поэтому необходимость расчета той или иной характеристики определяется конкретной практической задачей и особенностями хроматографируемой системы.

1.3. Количественные характеристики эффективности разделения в ТСХ

Как и в других вариантах хроматографии эффективность разделения в ТСХ определяется *числом теоретических тарелок N* и *высотой, эквивалентной теоретической тарелке – ВЭТТ(H)*, которые могут быть рассчитаны по уравнениям:

$$N = 16 \left(\frac{l}{w} \right)^2 = 16 \left(\frac{LR_f}{w} \right)^2 \quad (28)$$

$$H = \frac{L}{N} = \frac{w^2}{16R_f L} \quad (29) ,$$

где w – ширина зоны в направлении движения элюента. Величина H характеризует размывание хроматографической зоны, N – эффективность хроматографической пластины.

Разрешение R (разрешающая способность) двух хроматографических зон определяется расстоянием между их центрами (ΔX), поделенным на среднеарифметическое из их ширин (w_1) и (w_2) (рис. 4):

$$R = \frac{\Delta X}{\left[\frac{(w_1 + w_2)}{2} \right]} \quad (30)$$

Селективность разделения $\alpha_{\text{селект}}$ рассчитывается по формуле

$$\alpha_{\text{селект}} = \frac{D_2}{D_1} = \frac{\left(\frac{1}{R_{f1}} - 1 \right)}{\left(\frac{1}{R_{f2}} - 1 \right)} \quad (31)$$

где D_1 и D_2 – коэффициенты распределения компонентов;

R_{f1} и R_{f2} – подвижности компонентов.

Разрешающая способность (для двух соседних) зон определяется тремя факторами: а) селективностью; б) структурой слоя сорбента; в) средним значением R_f для разделяемой пары:

$$R = \frac{1}{4} \left[\frac{D_1}{D_2} - 1 \right] \sqrt{\underbrace{\frac{R}{f}}_b \underbrace{N(1 - R_f)}_v} \quad (32)$$

Это уравнение выведено Снайдером и является определяющим уравнением для описания и понимания процесса разделения в тонкослойной хроматографии. Разделение соседних зон при изменении различных параметров хроматографирования показано на рис. 8.

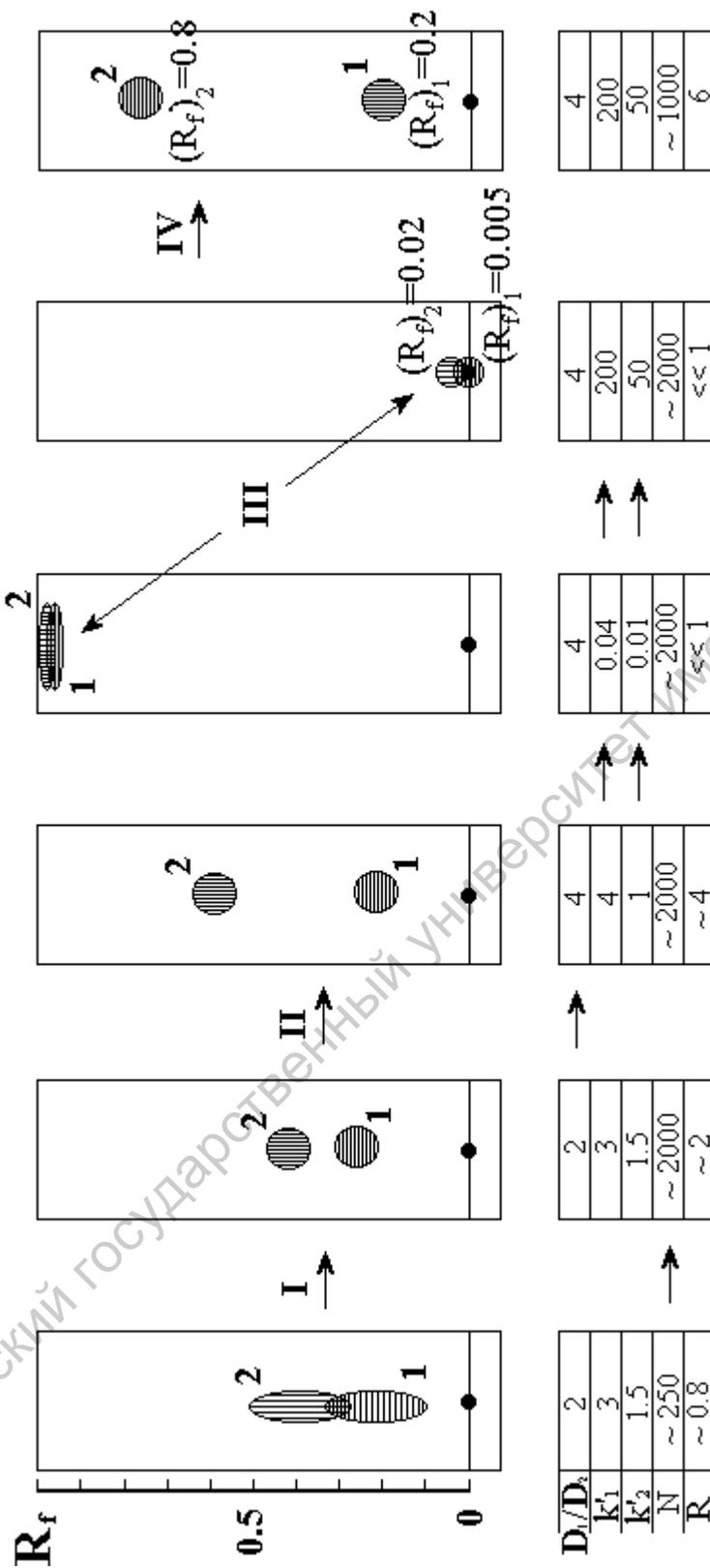


Рис. 8. Зависимость разрешающей способности и от ряда параметров: I – увеличение числа N ; II – повышение селективности; III – “влияние экстремальных значений R_f ”; IV – непрерывная хроматография или разделение на тонкослойной пластинке под давлением

Разрешение двух зон считается полным при $R \geq 1.5$. Для максимального разрешения оптимальным является значение $\Delta R_f \approx 0.3 - 0.5$. Известно, что оптимальные условия хроматографирования могут быть выбраны на основании уравнения Ван-Деемтера, описывающего зависимость ВЭТТ (H) от скорости движения элюента (V). Модификацией этого уравнения является уравнение Нокса, которое устанавливает связь между приведенными величинами H и V : приведенная ВЭТТ $h = H/d_p$, приведенная скорость $v = u d_p/D_m$, где u – константа скорости, D_m – коэффициент диффузии хроматографируемого вещества в элюенте, d_p – диаметр зерна носителя на пластине. С использованием приведенных величин h и v уравнение Нокса приобретает вид:

$$h = av^{1/3} + \frac{b}{v} + cv \quad (33) ,$$

где a , b , c – безразмерные экспериментальные коэффициенты, характеризующие качество структуры слоя (a), диффузию в подвижной фазе (b) и сопротивление массопереносу (c).

Это уравнение описывает кривую с минимумом (рис.9), левая (крутая) ветвь которой связана в основном с размыванием зон за счет молекулярной диффузии, а правая (пологая) ветвь – с размыванием за счет неравномерности массопереносу.

Приведенная скорость является переменной величиной и зависит от ряда параметров:

$$v = \frac{K_o d_p^2 \lambda \cos \theta}{L \eta D_m} \quad (34) ,$$

где L – длина пробега растворителя;

K_o – коэффициент гидродинамической проницаемости слоя сорбента;

λ – поверхностное натяжение;

θ – краевой угол смачивания;

η – вязкость элюента.

При увеличении длины пробега растворителя L происходит уменьшение v , следовательно, h тоже уменьшается. Зависимость $h=f(v)$ проходит через минимум при $L=L_{opt}$ и начинает резко расти на левой крутовосходящей ветви (рис.9). При этом эффективность пластины N увеличивается лишь в малой степени, а время анализа резко возрастает. Отсюда можно сделать вывод о необходимости

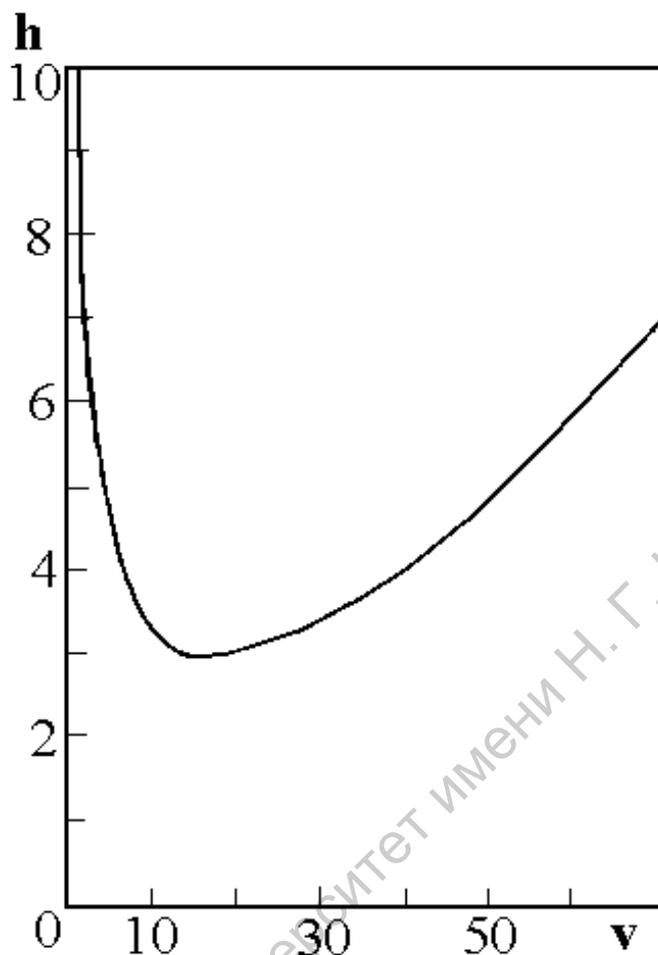


Рис.9. Зависимость h от приведенной скорости v

использовать пластины для ТСХ длиной $L \leq L_{opt}$, которая зависит от свойств элюента (λ , θ и η) и анализируемого вещества (D_m , R_f).

Для обычных элюентов и низкомолекулярных веществ $L_{opt} \approx 10$ см и $d_{p\ opt} \approx 10$ мкм, а для высокомолекулярных веществ $L_{opt} \approx 5$ см и $d_{p\ opt} \approx 5$ мкм, что необходимо учитывать при выборе оптимальных условий хроматографирования.

1.4. Типы классификаций в ТСХ

Тонкослойная хроматография может быть классифицирована по различным принципам:

- механизму процесса разделения;
- природе неподвижной (НФ) и подвижной (ПФ) фазы;
- числу операций хроматографирования;
- способу движения растворителя по слою сорбента;
- направлению движения растворителя;
- режимам хроматографирования.

Основные варианты ТСХ рассмотрены в соответствующих

разделах.

1.5. Основные механизмы разделения в ТСХ

ТСХ является разновидностью жидкостной хроматографии (ЖХ), поэтому основные механизмы разделения в ЖХ реализуются и в ТСХ (табл.1).

Таблица 1

Основные механизмы разделения в ЖХ

Вид хроматографии	Основной механизм действия	Параметры, контролирующие разделение
Адсорбционная нормально-фазовая и обращенно-фазовая	Адсорбция	Коэффициент адсорбции
Распределительная нормально-фазовая	Экстракция, межфазное распределение	Коэффициент распределения
Распределительная обращенно-фазовая	Экстракция, межфазное распределение, гидрофобные взаимодействия	Коэффициент распределения
Ион-парная обращенно-фазовая	Гидрофобные взаимодействия с установлением вторичного равновесия ион-парных комплексов	Коэффициент распределения, вторичные константы равновесия
Ионообменная	Электростатические (ионные) взаимодействия	Заряд, константа диссоциации, изоэлектрические точки
Эксклюзионная гелепроникающая	Исключение из пор адсорбента	Эффективный размер макромолекул, коэффициент распределения

Классификация механизмов разделения, представленная в таблице 1, основана на характере сил, действующих между растворенным веществом и твердой или жидкой фазами, с которыми оно соприкасается. На практике обычно разделение веществ протекает по смешанным механизмам. Так, адсорбционный механизм сопровождается распределительным при ТСХ на слабоактивных сорбентах в элюентах, содержащих воду. Распределительный и ионообменный механизмы часто дополняются адсорбционным. В ТСХ в отличие от ЖХ все процессы разделения осложняются влиянием паровой фазы, содержащей испаряющийся элюент. Это может приводить к возникновению тонких взаимодействий между веществом и сорбентом, элюентом и сорбентом, веществом и элюентом, что позволяет получить в ряде случаев разделение близких по структуре

веществ и сложных многокомпонентных смесей, которые при реализации чистых механизмов в ЖХ невозможно получить.

Адсорбционная ТСХ

В адсорбционном варианте ТСХ в зависимости от полярности неподвижной и подвижной фаз различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографии. В НФХ используют *полярный адсорбент и неполярные подвижные фазы*, в ОФХ – *неполярный сорбент и полярные подвижные фазы*. В обоих случаях выбор подвижной фазы важнее, чем выбор неподвижной. Неподвижная фаза должна удерживать разделяемые вещества. Подвижная фаза, т.е. растворитель, должна обеспечивать эффективное разделение за приемлемое время.

Распределение сорбата между подвижной жидкой и неподвижной твердой фазами происходит за счет взаимодействий двух видов: неспецифических (дисперсионных, индукционных, ориентационных, гидрофобных) и специфических, вносящих основной вклад в величины удерживания, под которыми понимают образование водородных связей, донорно-акцепторное взаимодействие с неподвижной твердой фазой и др.

Механизм удерживания зависит от природы сорбента. На *полярных* сорбентах удерживание обусловлено взаимодействием компонентов с гидроксильными группами неподвижной фазы (силикагеля, оксида алюминия и др.) с образованием водородных связей. На *неполярных* сорбентах адсорбция осуществляется, в основном, за счет неспецифических взаимодействий с обращенно-фазовым сорбентом. Кроме того, на поверхности обращенной фазы за счет адсорбции может удерживаться слой жидкой фазы, обогащенной менее полярным растворителем из подвижной фазы. Состав этого слоя отличается от состава подвижной фазы, и разделение происходит за счет распределения компонентов между двумя несмешивающимися жидкостями. Поэтому разделение на обращенных фазах часто относят к распределительной хроматографии. Четко разграничить адсорбционную и распределительную хроматографии трудно.

Распределительная ТСХ

Метод распределительной или жидкостно-жидкостной ТСХ основан на распределении вещества между двумя несмешивающимися жидкостями.

Жидкую *неподвижную* фазу наносят на пористый сорбент. При пропускании жидкой *подвижной* фазы через слой сорбента анализируемая смесь разделяется на компоненты главным образом за счет различной растворимости в жидкой неподвижной фазе. Обычно растворимость компонентов пробы в подвижной и неподвижной жидких фазах, обладающих разной полярностью, сильно

различается. Если растворимость пробы выше в неподвижной фазе, R_f уменьшается, если растворимость выше в подвижной фазе – значения R_f возрастают. Чтобы добиться разделения, в подвижную фазу, насыщающую неподвижную, включают третий компонент, снижающий различие в полярности подвижной и неподвижной фаз. Например, к смеси неполярного (гексан) и полярного (вода) растворителей прибавляют спирт. Только в этом случае удастся подобрать оптимальные условия для разделения компонентов смеси.

Обычно полярный растворитель (вода, спирт) фиксирован на твердом носителе – силикагеле, диатомите, целлюлозе, оксиде алюминия. Подвижной фазой в этом случае служат неполярные растворители – изооктан, бензол, гексан и др. Такие системы используют в *нормально-фазовой распределительной* ТСХ.

Жидкие фазы, нанесенные путем импрегнирования (пропитки) имеют большой недостаток, так как быстро смываются с поверхности носителя. Поэтому более эффективным приемом является прививка к носителю. В качестве носителей неподвижных жидких фаз в НФТСХ используют силикагель с привитыми нитрильными, аминными, диольными и другими группами.

Пластины с химически связанными фазами имеют преимущества перед импрегнированными: не требуется насыщения неподвижной фазой элюентом, разделяемые вещества не загрязняются неподвижной фазой и характеризуются более воспроизводимыми величинами R_f .

Если неполярный растворитель зафиксировать на носителе, а в качестве подвижной фазы использовать полярные растворители (вода, спирты, ацетонитрил, буферные растворы, сильные кислоты), то такой вариант называют *обращенно-фазовой распределительной* ТСХ. В этом случае в качестве носителей неподвижных жидких фаз часто используют алкилмодифицированные силикагели RP_2 , RP_8 , RP_{18} (*relative phase*) с привитыми углеводородными фазами. Механизм разделения основан как на гидрофобных силах, вытесняющих неполярное вещество из водного элюента, так и на ван-дер-ваальсовых взаимодействиях углеродной части молекулы разделяемых соединений и алкильных радикалов адсорбента. С увеличением длины алкильного радикала взаимодействие увеличивается.

ОФТСХ применяют для разделения полярных и неполярных соединений. Вещества элюируются в порядке увеличения полярности: более полярные – быстрее. При увеличении полярности вещества для уменьшения удерживания увеличивают содержание воды в элюенте. Однако при увеличении содержания воды более чем на 35% сильно замедляется движение элюента, и пластины перестают смачиваться. Добавление солей (NaCl, LiCl) в элюент улучшает смачивание и процесс разделения.

Глава 2. СОРБЕНТЫ И ПЛАСТИНКИ В ТСХ.



Общая характеристика сорбентов

В тонкослойной хроматографии используют большое количество органических и неорганических сорбентов: силикагель, силикагель, модифицированный алкильными или функциональными группами, оксид алюминия, целлюлозу и модифицированную целлюлозу, силикат магния, ионообменные смолы, полиамид, а также смеси этих и других сорбентов. Все они должны удовлетворять *общим требованиям*:

- не растворяться в подвижной фазе;
- химически не реагировать с хроматографируемым веществом;
- не содержать компонентов, мешающих детектированию и разделению;

- вещества, используемые для образования слоя, не должны быть окрашены.

Размер частиц сорбента для пластинок ТСХ варьирует от 5 до 15 мкм. Чем меньше разброс частиц сорбента относительно среднего значения, тем лучше средняя плотность их упаковки. Это важно для количественного анализа, поскольку при этом улучшается соотношение сигнал/шум, снижается предел детектирования и метод становится более чувствительным.

Необходимо различать *внутреннюю* и *внешнюю* поверхность частиц слоя сорбента. Внешняя поверхность составляет около 1 % от общей площади. В хроматографии доминантной является внутренняя поверхность, площадь которой зависит от пористости структуры и, в зависимости от типа сорбента, составляет 70-500 м²/г. Размер пор, независимо от их формы (цилиндрические, щелеобразные и т.д.), характеризуется их диаметром. Вычисляют обычно размер цилиндрических пор, диаметр которых для ТСХ сорбентов составляет от 4 до 15 нм. Поры с диаметром менее 1 нм нежелательны, поскольку молекулы подвижной фазы не могут проникать в них.

Толщина слоя сорбента влияет на количество вещества, которое можно разделить, а также время разделения. Чем меньше количество вещества, тем тоньше должен быть слой. Обычные пластинки с нанесенным слоем сорбента имеют толщину слоя по меньшей мере 250 мкм. Иногда толщина слоя уменьшается до 100 мкм и даже 50 мкм.

Важной характеристикой сорбентов в адсорбционной ТСХ является *активность*. Этот параметр в совокупности с другими свойствами сорбента, а также растворителем и температурой влияет на значение R_f вещества. Увеличение активности слоя при постоянстве других параметров способствует снижению R_f , а уменьшение – повышению R_f .

Понятие активности сорбента складывается из двух компонентов – вклада удельной энергии и размера поверхности. Чем больше энергия единицы поверхности, тем сильнее взаимодействие между сорбентом и сорбатом. Удельная поверхность сорбента (площадь поверхности на единицу массы сорбента) определяет количество сорбционных процессов, которые могут протекать одновременно. Величина поверхности, на которой происходит сорбция, уменьшается, если она покрыта молекулами “дезактиватора”, сокращающего активную (V_a) поверхность сорбента (Рис.10).

Деактиваторами гидрофильных сорбентов (силикагеля и оксида алюминия) являются высокополярные вещества, например вода, неполярных сорбентов (уголь, графитовая сажа) – молекулы липофильных веществ (бензол, стеариновая кислота). Гидрофобные обращенные фазы могут быть дезактивированы тяжелыми углеводородами.

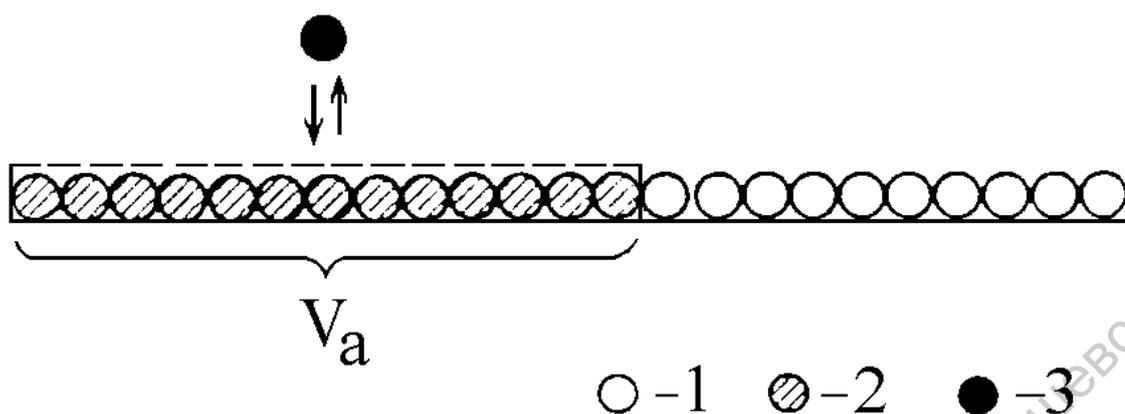


Рис.10. Схематическое изображение свободного объема поверхности гидрофильного сорбента : 1 – молекулы воды (дезактиватора); 2 – молекулы растворителя; 3 – молекулы вещества.

Снайдер вывел фундаментальное уравнение, связывающее значение R_m с параметрами активности слоя, анализируемого вещества, растворителя, массой и свободным объемом адсорбционного слоя :

$$R_m = \lg \left(V_a \cdot \frac{W_a}{V_m} \right) + \alpha \cdot f(X, S) \quad (35)$$

Первое слагаемое в уравнении определяет свойства сорбента (поверхностная составляющая), второе – анализируемого вещества (X) и растворителя (S) (энергетическая составляющая). Параметр V_a – объем монослоя молекул растворителя, который покрывает свободную поверхность адсорбента (рис. 10) и имеет размерность $\text{см}^3/\text{г}$. Чем больше V_a , тем выше активность сорбента. При полной дезактивации сорбента V_a равно нулю, т.е. $R_m = -\infty$, а $R_f = 1$. Если молекулами воды покрыто более 80% поверхности, то образуются полимолекулярные слои, уменьшающие свободную поверхность. W_a – масса безводного слоя, V_m – свободный объем слоя. Величина V_m является суммой объема пространства между частицами и объема пор в частицах и приближенно равна объему растворителя в слое после элюирования. Величину V_m можно определить гравиметрически, а также методом газовой хроматографии после экстракции адсорбированного растворителя.

Второе слагаемое в уравнении Снайдера $f(X, S)$ является безразмерной постоянной для данного растворителя и сорбента. В идеальном случае $f(X, S)$ не зависит от активности сорбента. Значения $f(X, S)$ для некоторых стандартных веществ приведены в таблице 2.

Таблица 2

Значения $f(X,S)$ для некоторых стандартных веществ

Вещество	Оксид алюминия	Силикагель
Стирол	2.34	1.71
Дурол	2.30	1.80
Нафталин	3.10	2.02
Азулен	3.56	2.35
Аценафталин	3.65	2.29
Фенантрен	4.34	2.55
Антрацен	4.60	2.60
Пирен	4.77	2.57
Флуорантен	4.94	2.79
Крезол	5.64	3.09
м-Терфенил	4.78	3.13
Трифенилен	5.64	3.15
Бензантрацен	5.65	3.09

Величина α характеризует поверхностную энергию. Этот параметр активности не зависит от анализируемого вещества и растворителя в случае его малой активности. По мере дезактивации поверхности величина α постепенно уменьшается и становится постоянной при средних значениях активности. Если удалить всю обратимо сорбируемую воду, то активность будет максимальной и $\alpha = 1$.

В адсорбционной ТСХ важным регулятором активности сорбента является *относительная влажность*. Изменение относительной влажности, а следовательно и активности влияет на результаты хроматографического разделения: значение R_f , ход разделения, положение фронта элюента при использовании смеси элюентов, размер зоны, селективность разделения и т.д. Поэтому при использовании ТСХ на практике контроль этого параметра является необходимым. Для поддержания постоянной влажности в закрытых камерах используют растворы серной кислоты или насыщенные растворы солей: $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaCl} + \text{KNO}_3$ (16°C), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и др.

Активацию пластин для адсорбционной ТСХ проводят их нагреванием в термостате при $110 - 120^\circ\text{C}$ в течение 15 – 30 минут для удаления влаги. Следует, однако, отметить, что пребывание активированных пластин на воздухе в течение даже короткого времени (в зависимости от температуры воздуха и влажности в помещении) может привести к ее полной дезактивации. Поэтому после активации пластины ТСХ слой рекомендуется сразу же закрывать стеклянной пластиной, помещенной несколько выше линии старта (линия нанесения проб). Для *обращенно-фазовой ТСХ*

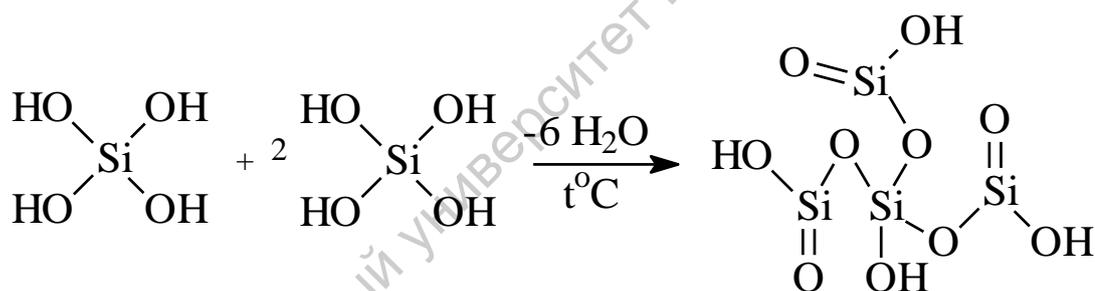
подобная активация не требуется. При *ионообменной ТСХ* пластины предварительно уравнивают элюирующим буферным раствором.

Важной процедурой является *предварительная очистка слоя пластины* ТСХ, например, элюированием полярным растворителем или обработкой хромовой смесью с последующей отмывкой водой (для очистки пластин с силиказолевым связующим). Пластины для обращенно-фазовой ТСХ очищают метанолом. Для улучшения разделения веществ перед нанесением проб иногда проводят *модификацию* пластин различными реагентами.

2.1. Полярные сорбенты

Неорганические полярные сорбенты

Силикагель - наиболее часто используемый в ТСХ сорбент. Его синтезируют полимеризацией ортокремниевой кислоты, получаемой гидролизом или обработкой соляной кислотой силиката натрия. Формирование структуры силикагеля может быть описано следующей схемой:



Поликонденсация дает вначале пластические гели, основная структура которых, как видно из схемы, состоит из мостиков -Si-O-Si-. Она содержит *силанольные* группы, число которых зависит от способа получения силикагеля. Сокращение объема пластического геля при контролируемых условиях приводит к образованию ксерогелей с определенной структурой пор и стандартизированными свойствами. Поверхность такого силикагеля содержит силанольные и силаноксидные группы (рис.11):

Силаноксидные группы обладают протоноакцепторными свойствами, в то время как свободные, геминальные и вицинальные силанольные группы действуют как доноры протонов ($pK_a = 6,0-6,8$) и слабокислотные ионообменники. Дипольные свойства сорбента зависят от основной структуры силикагеля. Из рис.11 видно, что силикагель - полярный гидрофильный сорбент, поэтому он частично растворяется в воде, образуя 0,01% раствор ($t = 20^\circ\text{C}$). Коллоидный раствор силикагеля может быть причиной трудностей с кристаллизацией веществ в случае препаративной ТСХ. Гидролиз и

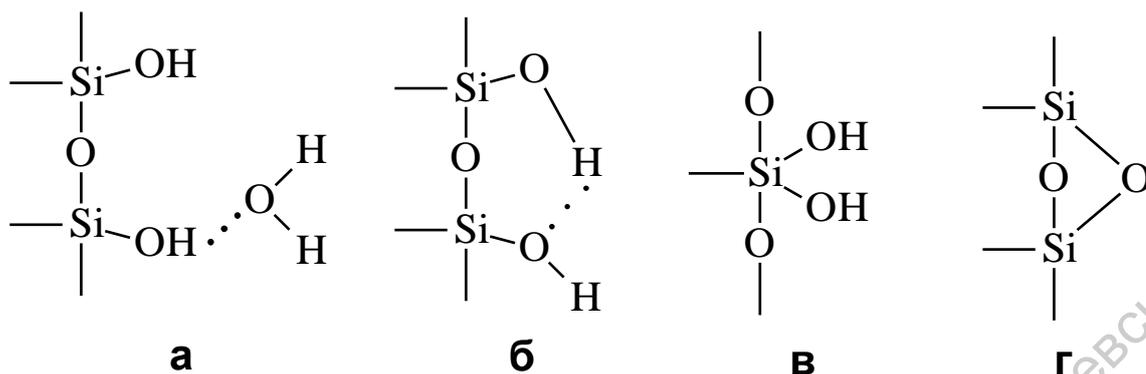


Рис.11. Типы функциональных групп в силикагеле: **а** - свободные силанольные группы; **б** - геминальные (парные) силанольные группы; **в** - вицинальные (соседние) силанольные группы; **г** - силоксановые группы.

растворимость силикагеля существенно увеличиваются при pH около 9. Таким образом, основные проблемы при работе с данным сорбентом возникают при продолжительном воздействии щелочной среды.

При нагревании силикагеля до 150-200°C с его поверхности удаляется физически связанная вода. При нагревании до более высоких температур сорбент спекается. Происходит постепенное превращение силанольных групп в силоксановые, сопровождающееся удалением химически связанной воды. Нагревание выше 400°C приводит к дополнительному уменьшению поверхности, а при 1000°C способность к связыванию воды полностью утрачивается. Поверхность силикагеля становится гидрофобной, а структура его подобна структуре силоксана.

Силикагель является универсальным и наиболее распространенным сорбентом в нормально-фазовой ТСХ. В таблице 3 приведены физические свойства силикагелей и типы связывающих веществ для пластин, наиболее часто используемых в ТСХ.

Оксид алюминия - второй часто используемый в ТСХ полярный сорбент. Его готовят дегидратацией гидроксида алюминия при $t^{\circ} = 500^{\circ}\text{C}$. При нагревании происходит удаление воды с образованием структуры Al-O-Al, имеющей в составе основные гидроксильные группы (pH = 7.5-8.0).

Этот сорбент, как и силикагель, может образовывать водородные связи. Однако, протонноакцепторные свойства Al_2O_3 гораздо сильнее, чем у силикагеля. На слоях оксида алюминия возможно хорошее хроматографическое разделение кислот, спиртов, фенолов или аминосоединений. Более размытые зоны следует ожидать для карбонильных соединений, эпоксидов, эфиров и сложных эфиров, поскольку они не могут образовывать водородных связей с сорбентом.

Таблица 3

Характеристики силикагелей для ТСХ

Пластины	Диаметр пор, нм	Объем пор, мл/г	Удельная поверхность, м ² /г	Фракционный состав, мкм	Толщина слоя, мкм	Связующие
“М е р к”, Германия						
TLC-Si-60	6	0.82	550	5 - 20	250	Органическое полимерное (конкретно не указано)
HPTLC-Si-60	6	0.82	550	5 - 10	200	
“В а т м а н”, США						
LK5-HP-K	8	0.70	300	5 - 10	200	Органическое полимерное (конкретно не указано)
“М а ш е р е й и Н а г е л”, Германия						
SiLG-25	6	0.75	500	5 - 25	250	Гипс
“К а в а л и е р”, Чехия						
Силуфол	6	0.8	500	5 - 40	100	Крахмал
“Р е а х р о м”, Армения						
Реахром	6	0.8	300	10 - 20	100	Силиказоль
ЗАО “С о р б п о л и м е р” и фирма “Л е н х р о м”, Россия						
Сорбфил АТСХ	9-12	0.8	350	5 - 17	100-120	Силиказоль
Сорбфил ВЭТСХ	9-12	0.8	350	8 - 10	100-120, 160	

Флорисил - это основной силикат магния ($Mg_3[Si_4O_{10}](OH)_2$), с промежуточной полярностью между силикагелем и оксидом алюминия. Этот сорбент особенно подходит для хроматографирования сахаров, эфиров, спиртов, гликолей и гликозидов (при pH = 8-10).

Кизельгур - сильнопористый сорбент, представляющий собой микроскопические зерна опалового кремнезема (двуокиси кремния). Как сорбент он слабее силикагеля и оксида алюминия и

употребляется для хроматографирования кетокислот, оксикислот, лактонов и других сильно гидрофильных органических соединений. Иногда кизельгур используют в смеси с силикагелем или гипсом, который должен быть химически чистым.

Органические полярные сорбенты

Полиамиды - это сорбенты, которые обладают как адсорбционными, так и распределительными хроматографическими свойствами. Карбоксиамидная группа ($-\text{CONH}_2$ -) в этих сорбентах является адсорбционно-активной. Поэтому такие фазы особенно эффективны для разделения фенолов (пищевых красителей, флавонов, таннинов и др.), нитрофенолов, спиртов и кислот. Расстояние между пептидными связями регулируется количеством гидрофобных CH_2 -групп, которые, естественно, вносят вклад в распределительные хроматографические свойства и могут вступать также в гидрофобные взаимодействия. Так, полиамид-11 более гидрофобен, чем полиамид-6. Это объясняет существование элюотропных рядов подвижных фаз, которые специально разработаны для различных полиамидов.

Целлюлоза - органический полимер природного происхождения. В качестве сорбента применяются порошки целлюлозы, содержащие и несодержащие гипс. Хроматографирование проводят на коммерчески доступных пластинках с целлюлозами, специально предназначенными для хроматографии: MN 300 - без гипса, MN 300 G - с гипсом. Кроме обычной целлюлозы для хроматографического разделения применяется ацетилированная целлюлоза: MN 300 AC - без гипса, MN 300 G/AC - с гипсом.

Ионообменные смолы (ионообменники) - начали применяться в тонкослойной хроматографии сравнительно недавно. Для этой цели пользуются диэтиламиноэтилцеллюлозой (ДЭАЭ) - MN 300 DEAE и MN 300 G/DEAE и целлюлозой MN 300 ECTEOLA и MN 300 G/ECTEOLA, которые являются коммерчески доступными.

2.2. Органические сорбенты средней полярности

По уменьшению полярности сорбенты можно расположить в ряд: немодифицированный силикагель > модифицированный силикагель с амино- > циано- > диол- > RP_2 > RP_8 > RP_{18} -группами. Индексы 2, 8, 18 означают число углеводородных атомов в привитом алкильном радикале.

Гидрофильно-модифицированные слои и их применение

Для расширения диапазона селективности между полярными силикагельными слоями и неполярными RP фазами были разработаны амино-, циано- и диольные фазы, в которых функциональная конечная группа и атом кремния разделены "прокладкой" из трех групп CH_2 (спейсер):

Фаза	Структура
амино-	$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2$ <p style="text-align: center;">спейсер</p>
циано-	$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—C}\equiv\text{N}$
Диол	$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O—CH}_2\text{—CH—CH}_2$ <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 20px; margin-top: -10px;"> <div style="text-align: center;"> OH</div> <div style="text-align: center;"> OH</div> </div>

Эти фазы могут использоваться как в нормально-фазовой, так и в обращенно-фазовой хроматографии.

В нормально-фазовой хроматографии главными являются адсорбционные взаимодействия. Все функциональные группы сорбентов обладают свободными электронными парами, которые позволяют им образовывать водородные связи (протонные акцепторы) с анализируемыми веществами. Некоторые из этих функциональных групп обладают протонно-донорными функциями. Эти взаимодействия отчасти эффективны в хроматографии с липофильными подвижными фазами.

Если используются гидрофильные подвижные фазы, функциональные группы быстро насыщаются. Тогда за удерживание веществ ответственны гидрофобные взаимодействия со спейсерами. Это означает, что на этих фазах осуществляется обращенно-фазовая распределительная хроматография.

Слой с аминофазами

Эти фазы имеют пропиламиновые радикалы, ковалентно связанные с силикагелем. Слой обладает основными свойствами, что делает его пригодным для хроматографирования компонентов с такими же свойствами (аминов, алкалоидов). Для подавления диссоциации не нужно добавлять к подвижной фазе основания. Эти фазы могут быть также использованы как слабоосновные ионообменники. В протонированной форме они обменивают анионы OH^- на фенолятные и сульфонатные ионы. Добавление солей к элюенту подавляет ионообменные свойства, так как аминогруппы экранируются ионами противоположного заряда.

Адсорбционное разделение разных по полярности незаряженных молекул на этих фазах возможно в сочетании с безводными подвижными фазами. Адсорбция веществ осуществляется за счет взаимодействия с силанольными группами и концевыми аминогруппами сорбента.

Слой с цианофазами

Эти слои содержат цианопропильные группы, связанные с силикагелем. Слои имеют нейтральную реакцию по отношению к водным элюентам. Поскольку цианогруппы не ограничивают выбор подвижных фаз, то возможно проведение как обращенно-фазовой, так и нормально-фазовой хроматографии.

Распределительные хроматографические свойства этих фаз определяются гидрофобными взаимодействиями между пропильными спейсерами и сорбатом. Полярные цианогруппы и силанольные группы неподвижной фазы индуцируют диполь-дипольные взаимодействия и поэтому ответственны за адсорбционный механизм разделения.

Слои с диольными фазами

Силанольные группы этих фаз связаны с радикалами 1,2-пропандиола через пропильные пространственные группы (спейсеры). Хроматографические свойства поверхности сорбента определяются присутствием алкильных радикалов и спиртовых групп. Последние сходны по своим свойствам с силанольными группами силикагеля. Связь с силикагелем через алкильный радикал уменьшает их полярность и они становятся менее поверхностно-активными. Сорбенты могут быть использованы как в нормально-фазовой, так и обращенно-фазовой ТСХ. Некоторые результаты практического применения таких сорбентов приведены в таблице 4.

Таблица 4

Применение гидрофильно-модифицированных слоев в нормально-фазовой хроматографии

Класс вещества	Неподвижная фаза	Система подвижной фазы
метилированные фенолы	NH ₂	дихлорметан/метанол
нитроанилины	NH ₂	гексан/этанол
Фенолы	NH ₂	ацетон/дихлорметан
ксантин-производные	NH ₂	метанол
Эстрогены	CN	петролейный эфир/ацетон
Фенолы	CN	этилацетат/толуол
РН-аминокислоты	CN	дихлорметан/метанол
половые гормоны	CN	петролейный эфир/ацетон
Анаболики	диол	диизопропиловый эфир/уксусная к-та
олигофенилены	диол	циклогексан
Тестостерон	диол	диизопропиловый эфир
Стероиды	диол	гексан/ацетон/уксусная кислота/LiCl
бензолкарбоновые кислоты	NH ₂	этанол/аммиак/NaCl
Нуклеотиды	NH ₂	этанол/вода
Пурины	NH ₂	этанол/вода/NaCl
консерванты	CN	этанол/вода/тетраэтиламмоний

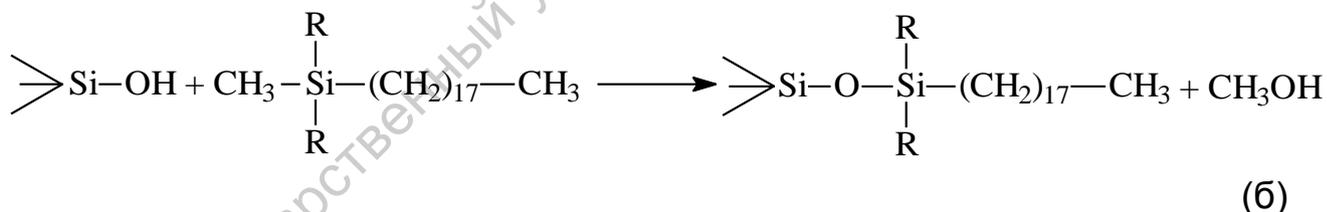
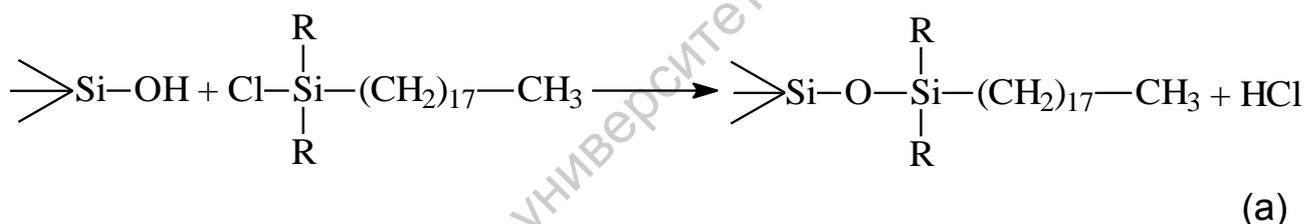
		хлорид
РТН-аминокислоты	CN	метанол/пропанол/вода
половые гормоны	CN	ацетон/вода
гликозиды дигиталиса	диол	этилацетат
Стероиды	диол	ацетон/вода

2.3. Органические неполярные фазы

Гидрофобно-модифицированные (обращенно-фазовые) слои

Обращенно-фазовые гидрофобные слои получают в результате химической прививки алкилсиланов к силикагельному скелету. В качестве алкильных заместителей используют диметил-, этил- (RP_2), октил- (RP_8) или октадециловые (RP_{18}) группы (табл.5).

Такая прививка уменьшает количество реакционноспособных силанольных групп и приводит к образованию новых силоксановых групп, обладающих меньшей химической активностью. При использовании алкилсиланов могут образовываться кислые (а) или нейтральные (б) фазы :



Предполагается, что неполярные алкильные цепи с числом атомов углерода до четырех торчат из матрицы силикагеля как волокна щетки, а также проникают во внутренний объем частиц силикагеля, в результате чего уменьшается радиус пор. Более длинные углеводородные цепи RP_8 и RP_{18} лежат плоско на поверхности и должны быть подняты при кондиционировании перед разделением.

RP слои используют для разделения в распределительной хроматографии с гидрофильными подвижными фазами. Компоненты пробы удерживаются за счет гидрофобных взаимодействий, которые в этом случае являются основными. Соотношение между прореагировавшими и непрореагировавшими силанольными группами является мерой *степени модифицирования* силикагеля. По

пространственным причинам максимальная степень модифицирования - 50 %, т.е. 3,5-4 мкмоль/м² (табл.5).

Чем больше молекулярная масса используемых алкилсиланов, тем меньше степень модифицирования, а значит растет влияние силанольных групп на удерживание молекул пробы, селективность и смачиваемость фазы водой.

Гидрофобность слоев возрастает с увеличением длины цепи алкильного заместителя. Поэтому смачиваемость слоев RP полярной, содержащей воду, подвижной фазой является слабой. По мере увеличения содержания воды в подвижной фазе гидрофильные силы противодействуют капиллярным силам. Слои RP₂ смачиваются

Таблица 5

Модифицированные силикагели для ТСХ

Фирма производитель, страна	Обозначение пластин	Модифицирующая функциональная группа	Диаметр частиц, мкм	Примечание
“Мерк”, Германия	TLC RP ₂	C-2	11 – 13	Неполное силаниро- вание С повышен- ной смачива- емостью
	TLC RP ₈	C-8		
	TLC RP ₁₈	C-18		
	HPTLC RP₂	C-2	5 – 7	
	HPTLC RP ₈	C-8		
	HPTLC RP ₁₈	C-18		
	HPTLC RP- NH ₂	γ-аминопропил		
	HPTLC RP-CN	- циано		
	HPTLC RP- диол	- диол		
RP ₂ , RP ₈ , RP ₁₈ , RP ₁₈ (S)	C-2, C-8, C-18			
“Машерей и Нагел”, Германия	SILC 18-100	C-18	5 - 10	Степень силаниро- вания 100, 75, 50 %
	SILC 18-75			
	SILC 18-50			
“Ватман”, США	K C-2	C-2	10 - 14	Полное силаниро- вание (end- capped C-2)
	K C-8	C-8		
	K C-18	C-18		
	Multi	C-18		
	KCS 5-дифенил	дифенилметил		Двухфазные (C-18/сили- кагель)
“Ленхром”, Россия	ОФ RP ₂	C-2	5-17	
	ОФ RP ₈	C-8		

подвижными фазами, содержащими 70-80 % воды по объему, в то время как смачиваемость RP₈ и RP₁₈ слоев составляет 50-60 %.

Применение обращенных слоев в ион-парной ТСХ

Пластинки с RP слоями применяют, в основном, для разделения смесей веществ с различной гидрофобностью. Однако их также можно использовать для разделения полярных соединений методом ион-парной хроматографии.

Такое разделение проводят добавлением ион-парного реагента (ИПР) к подвижной фазе, состоящей из воды или буферного раствора и разделяемых органических компонентов ионного характера. Разделяемые вещества образуют с ИПР ионные пары нейтрального характера. Они хорошо растворяются в органических растворителях и могут хроматографироваться при использовании малополярных подвижных фаз.

Соединения тетраалкиламмония обычно используют для разделения веществ кислотной природы, а алкилсульфонаты и сульфоаминовые кислоты для разделения оснований (табл. 6).

Таблица 6

Применение ион-парных реагентов в обращенно-фазовой ТСХ

Противоион	Определяемые соединения
четвертичные амины	сильные или слабые кислоты, сульфоновые красители, карбоновые кислоты
третичные амины	сульфоновые кислоты
арил- или алкилсульфоновая кислота	четвертичные и третичные амины

Ионные пары распределяются между неподвижной и подвижными фазами в зависимости от их растворимости в подвижной фазе. Это возможно только в том случае, когда используются достаточно неполярные подвижные фазы, поскольку полярные подвижные фазы разрушают ионные пары. Адсорбция на алкильных цепочках модифицированного гидрофобного силикагеля возрастает по мере увеличения длины алкильной цепи алифатической части противоиона. При достаточно большой длине алкильной цепочки (гидрофобности) определяемого иона ПФ может иметь водную основу.

Значение R_f является наименьшим при минимальной диссоциации веществ пробы, то есть при малых рН для кислот и при больших рН для оснований. Наилучшее разделение получается при промежуточном значении рН между рК диссоциации двух разделяемых веществ. Возможность изменения состава водно-органических ПФ, величины рН, типа и концентрации противоиона, степени диссоциации вещества пробы делает ион-парную хроматографию удобным инструментом для оптимизации аналитического разделения веществ.

Модифицированные целлюлозы

Для использования в качестве ионообменных сорбентов в ТСХ разработано несколько типов химически модифицированных целлюлоз (табл.7) :

для анионного обмена:

- АЕ (аминоэтил);

- DEAE (диэтиламиноэтил);
- ECTEOLA (продукт реакции эпихлоргидрина, триэтиламина и щелочной целлюлозы);
- PEI (полиэтиленимин);

для катионного обмена:

Таблица 7

Применение ионообменных слоев в ТСХ

Класс вещества	Тип ионообменника	Подвижная фазы
аминокислоты	Fixion 50X8	цитратный буфер
карбоновые и сульфоновые кислоты	NH ₂ -Sil.gel	этанол/вода + NaCl
неорганические ионы	P-целлюлоза	метанол/серная кислота
нуклеотиды	NH ₂ -Sil.gel	спирт/вода + NaCl
нуклеотиды	DEAE-целлюлоза	0.1 N HCl
олиготимидиновые кислоты	PEI-целлюлоза	вода + NaCl
фрагменты РНК, ДНК	ECTEOLA-целлюлоза	вода / NH ₄ OH / NaCl / фосфатный буфер
стероиды	DEAE-целлюлоза	изопропанол / вода / муравьиная кислота

- CM (карбоксиметил);
- P (с введением фосфора);
- Poly-P (полифосфат).

В качестве носителя для ионообменной хроматографии используют также некоторые полимеры.

Энантиоселективные модифицированные фазы

Наибольшее распространение получили хиральные лигандно-обменные фазы и фазы с привитыми циклодекстринами. Хиральные лигандообменные фазы являются доступными для тонкослойного хроматографического разделения энантиомеров. Разделение рацемических смесей на пластинках с нанесенным хиральным слоем проводится без добавления хиральных селекторов к подвижной фазе.

Для этого RP-слои импрегнируют производными пролина в качестве хирального селектора и двухвалентными ионами меди. Образуется комплекс меди с двумя бидентантными пролиновыми лигандами. Обмен одного пролина, сорбированного неподвижной фазой, на одну из молекул пробы приводит к образованию смешанного диастереомерного хелатного комплекса, состоящего из вещества пробы, иона меди и хирального селектора. Различие в устойчивости диастереомерных комплексов приводит к различию в удерживании энантиомеров. В качестве подвижных фаз в энантиомерной ТСХ обычно используют воду, спирт или ацетонитрил.

Недостатком этих фаз является ограниченный диапазон их применения. Возможно разделение только тех веществ, которые могут

образовывать с медью комплексы, т.е. содержащие, по меньшей мере, две функциональные группы. Энантиоселективные модифицированные силикагели могут быть использованы для разделения аминокислот, α -метилованных аминокислот, аминоспиртов, N-алкиламинокислот, дипептидов, производных тиазолидина, гидроксикарбоновых кислот и лактонов.

Разделение на циклодекстриновых (ЦД) неподвижных фазах основано на реализации взаимодействия “гость-хозяин”. Внутренняя полость ЦД имеет несколько хиральных центров и способна включать только один тип энантиомеров, причем определенного размера, соответствующего размеру его внутренней полости. ЦД могут входить также в состав ПФ.

КОММЕРЧЕСКИЕ ПЛАСТИНЫ ДЛЯ ТСХ

Пластины для ТСХ состоят из трех элементов: подложки, слоя адсорбента и связующего вещества. В качестве подложки используют стеклянные пластины, алюминиевую фольгу и полимерные пленки (главным образом полиэтилентерефталатные). Наиболее распространенными связующими компонентами являются гипс, крахмал, силикаты щелочных металлов и органические полимеры. К адсорбенту часто добавляют люминесцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в УФ-области спектра. Наибольшее распространение получили пластинки фирм “Мерк”, “Машерей и Нагел” (Германия) и “Ватман” (Англия, США). В России до недавнего времени широко использовали пластины “Силуфол” (“Kavalier”, Чехия), в настоящее время получили распространение пластины “Сорбфил” (ЗАО “Сорбполимер” и фирма “Ленхром”, Россия).

В ТСХ, в основном, используются *однофазные* пластинки. Кроме этого, ряд фирм выпускает *двухфазные* пластинки, покрытые двумя адсорбентами. К ним относят в первую очередь пластины с зоной для концентрирования проб, у которых полоса шириной 2 – 2,5 см покрыта адсорбционно-неактивным адсорбентом (обычно силикагель с диаметром пор 500 нм или диатомит), так называемым преадсорбционным слоем, а остальная часть пластины – обычным силикагелем. Такие пластины находят широкое применение в биохимии, клинической химии, для контроля качества фармацевтических препаратов. У ТСХ-пластин указанного типа качество разделения практически не зависит от размера стартового пятна, объема и количества нанесенной пробы вещества, так как нанесенные зоны концентрируются в виде узких полос на границе адсорбентов и далее хроматографируются в виде пятен малого продольного размера. Это повышает эффективность разделения, экономит время, позволяет предварительно очищать образцы в зоне

неактивного адсорбента. Двухфазные пластины позволяют концентрировать очень разбавленные пробы при многократном погружении их в раствор образца с использованием элюента, в котором разделяемые вещества в активной зоне пластины имеют $R_f = 0$. В частности, фирма “Мерк” выпускает три разновидности пластин с зоной концентрирования: *обычные, высокоэффективные* и для *препаративной ТСХ*.

В двухфазных пластинах другого типа (фирма “Ватман”) полоса шириной 3 см (2 см – для ВЭТСХ) покрыта силикагелем, модифицированным фазой RP-18, а остальная часть пластины – обычным силикагелем. На таких пластинах можно реализовать двумерную ТСХ сложных многокомпонентных смесей с разделением компонентов в обоих направлениях по разным механизмам (адсорбционная ТСХ и ОФТСХ).

Предложена *двухпластиночная* (“grafting”) ТСХ-система, на которой разделение проводят сначала на одной пластине в одном направлении, затем пластины соединяют таким образом, чтобы при хроматографировании во втором направлении вещества переходили на другую пластину, после чего осуществляется хроматографирование в другом направлении с использованием иного механизма разделения. Преимущество этой системы заключается в возможности непрерывного переноса вещества с одной пластины на другую.

Ведущие фирмы в области ТСХ выпускают также готовые пластины с оксидом алюминия, целлюлозой, смесью разных сорбентов и др.

В России пластины для аналитической и высокоэффективной ТСХ (АТСХ и ВЭТСХ) производят по технологии, разработанной в Институте высокомолекулярных соединений РАН. Пластины “Реахром” выпускаются в Армении, “Сорбфил” – в России. Основные их характеристики представлены в таблице 3. Пластины приготовлены с использованием силиказоля в качестве связующего, который при нагревании превращается в силикагель. Эти пластины отличаются высокой механической прочностью и химической стойкостью. Они предназначены для многократного использования, так как их можно регенерировать хромовой смесью с последующей отмывкой водой. Для детектирования используют коррозионно-активные реагенты (концентрированные кислоты). Аналогичные свойства имеют и так называемые пластины с перманентным покрытием (“sintered” TLC plates), в которых адсорбент спекается при высоких температурах со стеклянной подложкой при помощи стеклянного порошка (боросиликатный, известково-натриевый и др.). Однако эти пластины более адсорбционно-активны по сравнению с обычными пластинами со слоем того же сорбента.

Широкие перспективы для сложных разделений открывает возможность *модификации* готовых пластин самими исследователями с помощью химических реакций или импрегнированием их инертными веществами и реагентами, а также облучением в плазме. Наиболее часто применяют силанизирование пластин с силикагелем при погружении их в растворы силанизирующих агентов (диметилдихлорсилан, гексаметилдисилазан и др.). Предложена также обработка готовых пластин различными модификаторами в плазме тлеющего разряда. Модифицированные пластины могут быть использованы для разделения полярных компонентов смесей, сильно взаимодействующих с исходным, немодифицированным силикагелем.

Импрегнирование пластин можно проводить опрыскиванием, погружением или пропитыванием при движении по пластине раствора реагента в соответствующем растворителе. В качестве импрегнирующих реагентов применяют борную, пикриновую кислоты, тринитробензол, нитрат серебра, ионы цинка, кадмия, марганца и другие вещества, которые образуют комплексы или другие производные с компонентами разделяемой смеси.

Стабильные гидрофильные стационарные фазы получают при импрегнировании силикагеля формамидом, диметилформамидом, этиленгликолем, полиэтиленгликолем и различными буферными растворами. Гидрофобные пластины для ОФТСХ получают нанесением ундекана, силиконовых масел, жидких парафинов и других веществ. Для модификации физическими и химическими методами особенно хорошо подходят пластины с силиказолевым связующим, вследствие их химической и механической стойкости.

Для *ионообменной ТСХ* ряд фирм выпускают пластины, покрытые катионо- и анионообменными смолами на полимерной подложке [Chromatronix, Fixion (ВНР)]. Их применяют для разделения аминокислот, оснований, нуклеиновых кислот, нуклеотидов, пептидов и других соединений, образующих при растворении ионные формы (табл. 7). В таблице 8 приведены характеристики пластин для ионообменной ТСХ типа "Fixion".

Таблица 8

Характеристики пластин для ионообменной ТСХ

Тип	Свойства	Функциональная группа	Противоион
Fixion 50 x 8	Сильнокислый катионообменник	- SO ₃ ⁻	Na ⁺
Fixion 2 x 8	Сильноосновный анионообменник	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—H}_2\text{C—N—CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH ₃ COO ⁻

Для ионообменной ТСХ используют также пластины с производными целлюлозы типа карбоксиметилдиэтиламиноэтилцеллюлоза.

Для *лигандообменной* ТСХ фирма “Машерей и Нагел” выпускает так называемые хиральные пластины. Стеклопластиковая подложка покрыта силикагелем, импрегнированным хиральным агентом (производное пролина) и ионами двухвалентной меди. Эти пластины применяют для разделения рацематов и контроля оптической чистоты аминокислот и их галогенированных, N-метилированных, N-формилированных и α -алкиламинопроизводных, лактонов, дипептидов, тиазолидин-производных карбоновых кислот, а также фармацевтических препаратов.

Пластины на *полиамидных пленках* обладают существенными особенностями. Переход от фиксированных на подложке гранулированных сорбентов к пористым мембранам позволяет за счет увеличения гидравлической проницаемости хроматографического слоя и его большей регулярности значительно повысить скорость и чувствительность определения в ТСХ. Ряд фирм (“Шляйхер и Шуль”, “Пирс”, “Машерей и Нагел” и др.) выпускают полиамидные пластины (полиэтилентерефталатные пленки, покрытые с двух сторон пористым слоем полиамида), приготовленные по методу Ванга. Толщина слоя полиамида составляет 50 мкм. Такие пластины можно использовать многократно после промывки полярным растворителем. ТСХ на полиамидных слоях широко применяют в анализе биохимических объектов, фенолов, производных аминокислот, гетероциклических соединений, кислот и других веществ.

Глава 3. ПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ В ТСХ



Требования к подвижным фазам

Подвижная фаза должна отвечать следующим требованиям:

- растворять образцы;
- обладать определенной элюирующей силой;
- переносить пробу в область с заданной величиной R_f .

- по возможности быть нетоксичной, легко утилизируемой и достаточно дешевой;
- легко испаряться после завершения процесса хроматографирования;
- полярность компонентов подвижной фазы не должна сильно различаться, чтобы не произошло ее расслоение и образование нежелательного фронта на сорбенте.

Физические свойства подвижных фаз

В процессе хроматографирования необходимо учитывать некоторые физические свойства ПФ. Прежде всего, это поверхностное натяжение, вязкость и давление паров (уравнение 34).

Из данного уравнения можно сделать вывод: если поверхностное натяжение мало, а вязкость подвижной фазы велика, то скорость ее передвижения в неподвижной фазе также мала. В результате увеличивается время хроматографирования и размывание хроматографических зон.

Отношение поверхностного натяжения к вязкости называется *коэффициентом проницаемости* слоя. *Коэффициент проницаемости* показывает, какая площадь (в мм²) сорбента смачивается подвижной фазой за 1 секунду. Для нормализации этого параметра его относят к расстоянию миграции фронта равному 5 см. Чем больше коэффициент *k*, тем меньше времени требуется для хроматографирования.

Из уравнения 34 также видно, что по мере увеличения расстояния, пройденного подвижной фазой, скорость перемещения потока уменьшается. Установлено, что если указанное расстояние превышает 10 см, происходит ухудшение разделения и воспроизводимости результата. Все эти факторы должны быть учтены при выборе подвижной фазы для практических целей.

3.1. Подвижные фазы на основе органических растворителей

3.1.1. Предварительный выбор подвижной фазы

В качестве подвижной фазы используют как чистые растворители, так и их смеси. Одной из важных задач, которая стоит перед исследователем, является правильный подбор подвижной фазы. Треугольная диаграмма по Шталю (рис.12), дает возможность провести ориентировочную оценку хроматографической системы в целом и выбрать оптимальные условия хроматографирования. Применение принципов, указанных на диаграмме, требует предварительных знаний о свойствах анализируемых образцов, таких как полярность, растворимость и устойчивость во времени.

Один из углов вращающегося треугольника указывает на эти особенности (липофильность или гидрофильность). Характеристики

необходимых подвижных и неподвижных фаз считаются против двух других углов треугольника. Так, в адсорбционной ТСХ, если образец растворим в органическом растворителе (гексан, бензол, хлороформ и т.д.), то применяют нормально-фазовый вариант хроматографирования на активном (полярном) сорбенте в неполярной подвижной фазе. Наоборот, в случае растворимости образца в полярном растворителе (вода, спирты, кислоты) используют обращенно-фазовый вариант на неполярном сорбенте в полярном элюенте. Аналогичные закономерности наблюдаются и в распределительной хроматографии.

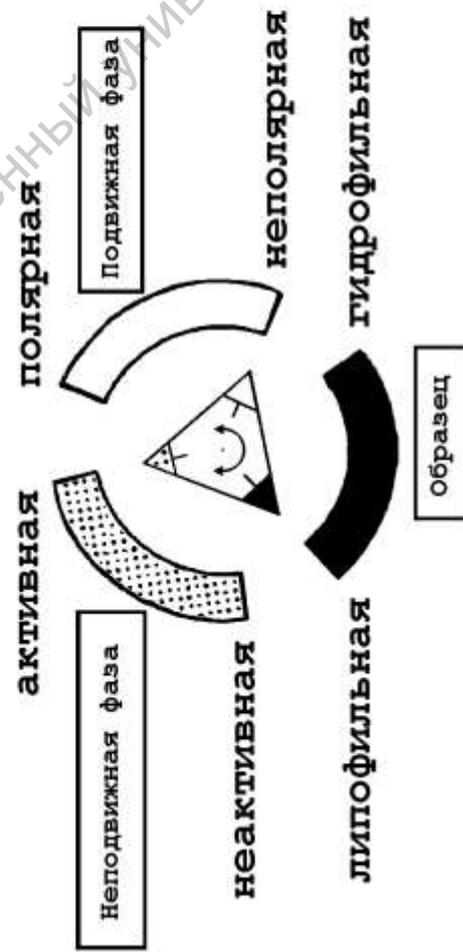
3.1.2. Классификации подвижных фаз

Существуют различные системы классификации подвижных фаз, основанные на их свойствах.

Классификация на основе элюотропных рядов

Впервые термин "*элюотропные ряды*" использовал Траппе в 1940 году. Его классификация основана на возрастающей силе элюирования ε° . Расположение растворителей в соответствии с возрастанием их элюирующей силы называют *элюотропным рядом*. Элюирующая сила растворителя - безразмерный параметр, который зависит от физических и химических свойств подвижной фазы. Физическими свойствами являются поверхностное натяжение и вязкость, химическими – полярность растворителя, которая влияет на его способность взаимодействовать с сорбентом и сорбатом. *Элюирующая сила растворителя* показывает, во сколько раз энергия сорбции данного элюента больше, чем энергия сорбции элюента, выбранного в качестве стандарта. За точку отсчета взята элюирующая сила пентана, для которого $\varepsilon^\circ = 0$. Для каждой комбинации сорбент -

Адсорбция



Распределение

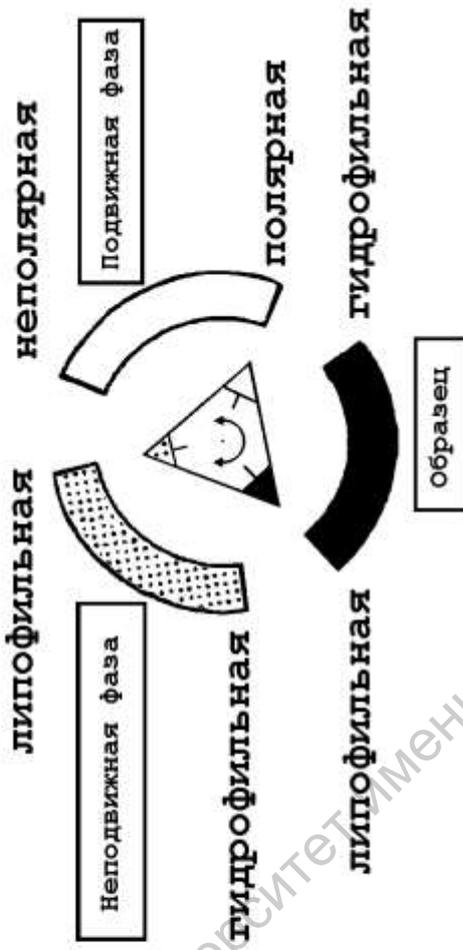


Рис.12. Треугольная диаграмма по Шталю

подвижная фаза элюирующая сила различна.

По элюирующей силе растворители делят на *слабые* и *сильные*. Слабые растворители слабо сорбируются неподвижной фазой, поэтому коэффициенты распределения сорбируемых веществ (сорбатов) между подвижной и неподвижной фазой высокие. Сильные растворители, наоборот, сорбируются сильно, поэтому коэффициенты распределения сорбатов низкие. Растворитель тем сильнее, чем выше растворимость в нем анализируемой пробы и чем сильнее взаимодействие растворитель – сорбат.

Последовательность расположения растворителей в элюотропном ряду зависит от полярности сорбента и, таким образом, вида хроматографии. В нормально-фазовой хроматографии с увеличением полярности растворителя элюирующая сила растет, в обращенно-фазовой – снижается. В жидкостной адсорбционной хроматографии элюотропный ряд Снайдера, например, имеет следующий вид (в скобках приведены значения элюирующей силы): пентан (0) < н-гексан (0.01) < гептан (0.01) < циклогексан (0.04) < CCl₄ (0.18) < бензол (0.32) < CHCl₃ (0.38) < ацетон (0.51) < этанол (0.88) < вода, CH₃COOH (очень большие). Для обращенно-фазовой хроматографии на силикагеле C₁₈ элюотропный ряд имеет вид: метанол (1.0) < ацетонитрил (3.1) < изопропанол (8.3) < н-пропанол (10.1) < диоксан (11.7).

В таблице 9 приведены физические свойства важнейших растворителей, расположенных в порядке увеличения ε^0 , для слоев сорбентов на основе силикагеля.

Таблица 9

Перечень наиболее важных растворителей в порядке увеличения элюирующей силы на силикагеле

Вязкость η , сп	Поверх- ностное натяже- ние γ , дин/см	Кoeffи- циент скорос- ти k^* , мм ² /с	Подвижная фаза	Диэлектри- ческая проницае- мость, ε' при 20°C	Давление пара, мбар при 20°C	Темпера- тура кипения, °C
1	2	3	4	5	6	7
0.40	20.4	9.2	н-гептан	1.97	36	98.4
0.31	18.4	12.5	н-гексан	1.89	120	68.9
0.24	16.0	10.6	н-пентан	1.84	430	36.1
1.84	25.5	5.4	циклогексан	2.02	78	80.7
0.94	27.0	6.1	четырёххлорис- тый углерод	2.24	90	76.5
0.57		8.1	трихлорэтилен	3.40	58	87.0
0.57	28.5	8.3	толуол	2.40	22	110.6
0.63	28.9	8.6	бензол	2.28	75	80.1
0.56	27.1	9.0	хлороформ	4.81	158	61.7
0.42	26.5	10.1	дихлорметан	9.08	340	40.0

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6	7
0.35	32.0	11.0	диизопропиловый эфир	3.88	135	68.0
2.82	20.7	1.0	третбутанол	12.2	31	82.3
0.65	36.8		нитрометан	35.9	27	101.0
0.36	29.3	12.6	ацетонитрил	37.5	73	81.6
2.80	24.6		2-бутанол	17.80		117.3
2.27	21.7	2.1	2-пропанол	18.3	32	82.4
0.45	23.9	9.2	этилацетат	6.00	73	77.1
2.15	23.8	2.3	1-пропанол	20.1	14	94.4
0.43	24.6	11.1	метилэтилкетон	18.5	79	79.6
0.32	23.7	12.7	ацетон	20.70	175	56.2
1.16	22.8	3.4	этанол	24.30	44	78.5
1.21	33.7	5.2	1,4-диоксан	2.21	31	101.6
0.47		10.9	ТГФ	7.40	150	67.0
0.58	22.6	5.6	метанол	32.63	96	65.0
0.97	38.0	6.3	пиридин	12.30	15	115.5
0.95	72.7		вода	80.30	18	100.0

* ТСХ пластинки, покрытые Si-60 F₂₅₄, камера насыщения, T=22°C, длина пробега подвижной фазы - 50 мм.

Между *силикагелем* и *оксидом алюминия*, разделение на которых протекает по адсорбционному механизму, обнаруживаются небольшие различия в элюирующей силе растворителей. Зная элюирующую силу для одного из сорбентов, можно рассчитать элюирующую силу для другого сорбента по приближенной формуле:

$$\varepsilon^{\circ} (\text{SiO}_2) = 0,77 \varepsilon^{\circ} (\text{Al}_2\text{O}_3).$$

Из формулы видно, что элюирующая сила растворителя на силикагельном сорбенте, составляет 3/4 от элюирующей силы растворителя на оксиде алюминия (табл.10).

Таблица 10

Сравнение элюотропных рядов для силикагеля и оксида алюминия в порядке возрастания элюирующей силы

СИЛИКАГЕЛЬ	ОКСИД АЛЮМИНИЯ
1	2
н-гексан	Пентан
Пентан	н-гексан
Циклогексан	Циклогексан
четырёххлористый углерод	Четырёххлористый углерод
Толуол	Толуол
Хлороформ	диэтиловый эфир
Дихлорметан	Хлороформ

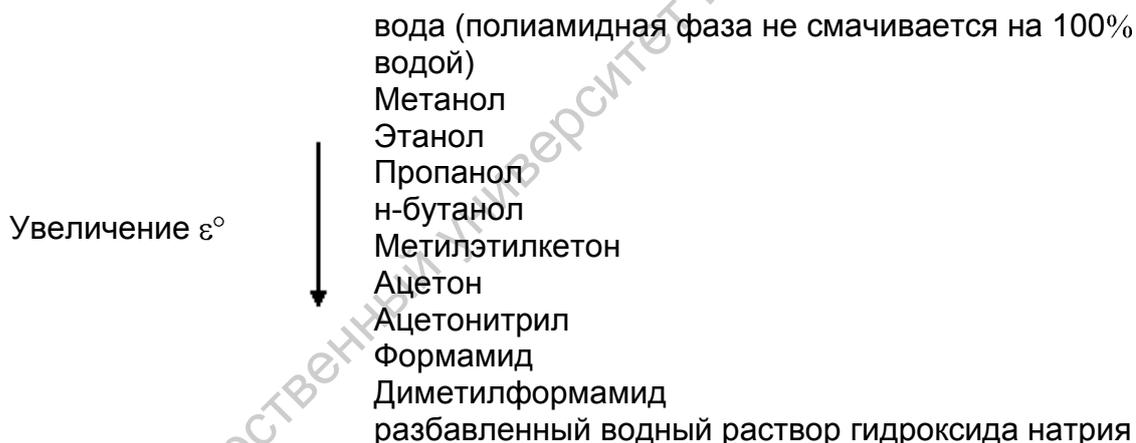
диэтиловый эфир	Дихлорметан
-----------------	-------------

Продолжение таблицы 10

1	2
уксусная кислота	Ацетон
Ацетон	уксусная кислота
Этанол	Пиридин
Метанол	Этанол
Пиридин	Метанол
Вода	Вода

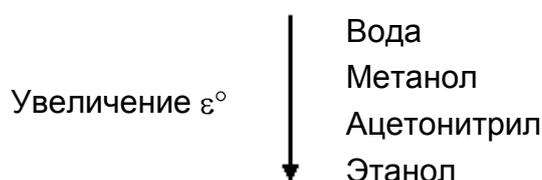
Полиамидные слои более гидрофобны, чем силикагель и оксид алюминия и проявляют как адсорбционные, так и распределительные хроматографические свойства. Естественно, что элюотропные ряды на полиамидных слоях отличаются от элюотропных рядов силикагеля и оксида алюминия. Эти различия объясняются наличием других видов химических взаимодействий с анализируемыми веществами и сорбентом.

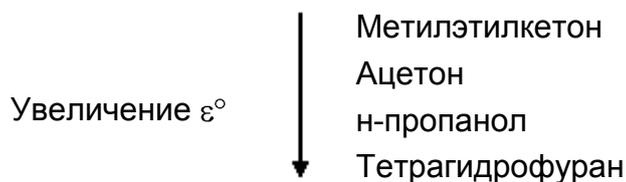
Ниже приведен элюотропный ряд для полиамидных сорбентов.



Элюирующая сила последовательно увеличивается при переходе от воды к спиртам, кетонам, амидам и, наконец, к разбавленному раствору гидроксида натрия.

Элюотропные ряды на гидрофобной поверхности обращенных фаз обратны рядам на гидрофильной поверхности силикагеля. Установленные закономерности объясняются, в основном, гидрофобными взаимодействиями, которые и определяют порядок изменения ϵ° растворителей.





При обращенно-фазовом разделении на смачиваемых водой слоях сорбентов рекомендуется использовать *полярные* подвижные фазы. Следует отметить, что в таких слоях модифицирована лишь небольшая доля силанольных групп, поэтому оставшиеся полярные группы обеспечивают возможность взаимодействий с полярными подвижными фазами. Слои с умеренной полярностью (пластинки ТСХ с диольной-, циано- и аминофазами) в сочетании с неполярными растворителями ведут себя как нормальные фазы при использовании водных подвижных фаз.

Классификация в соответствии с силой растворителя

В противоположность элюотропным рядам, основанным на элюирующей силе растворителя ϵ° , Снайдер разработал систему сравнения, основанную на различии *силы растворителя*. Он впервые разделил большинство обычных хроматографических растворителей на 8 групп по селективности. В нормально-фазовой ТСХ в основе этого деления лежат протон-акцепторные, протон-донорные свойства или дипольный момент растворителя. Указанные характеристики образуют на треугольнике углы селективности. Восемь групп растворителей располагаются внутри треугольника (рис.13).

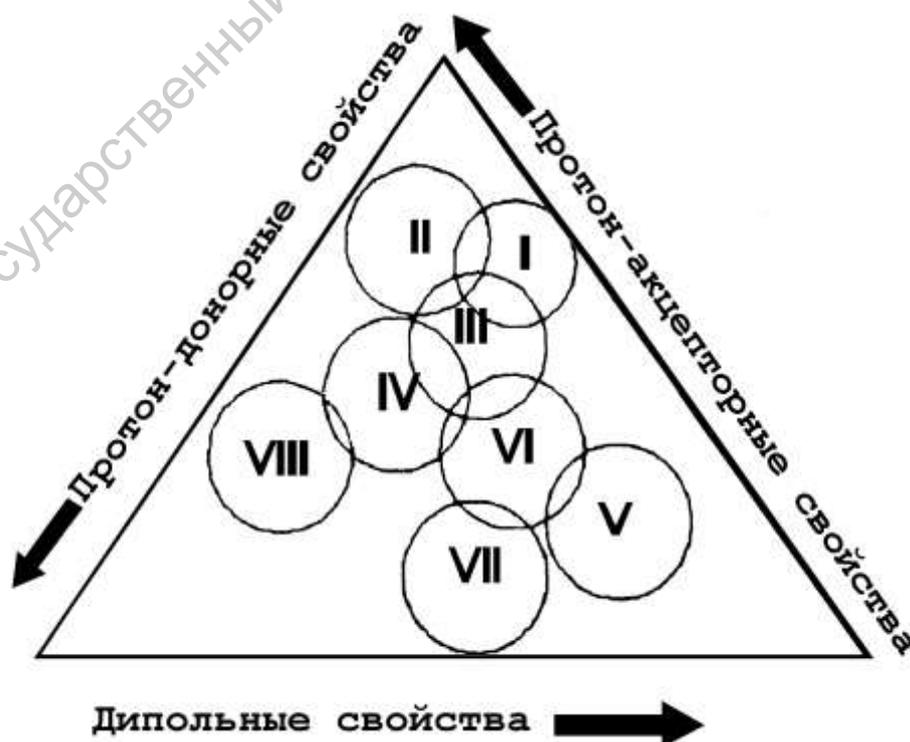


Рис.13. Треугольник селективности растворителей

Каждому растворителю приписывается величина силы растворителя на основе его хроматографических характеристик. Цифровые значения в таблице 11 относятся к нормальным фазам.

Таблица 11
Значения силы растворителя для нормальных неподвижных фаз

Группа	Растворитель	Сила растворителя (S_i)
I	н-гексан	0
	н-бутиловый эфир	2.1
	изопропиловый эфир	2.4
	метил-трет-бутиловый эфир	2.7
	диэтиловый эфир	2.8
II	н-бутанол	3.9
	2-пропанол*	3.9
	1-пропанол	4.0
	этанол*	4.3
	Метанол	5.1
III	тетрагидрофуран*	4.0
	пиридин	5.3
	метоксиэтанол	5.5
	диметилформамид	6.4
IV	ледяная уксусная кислота	6.0
	Формаид	9.6
V	дихлорметан*	3.1
	1,2-дихлорэтан	3.5
VI	этилацетат*	4.4
	метилэтилкетон	4.7
	диоксан*	4.8
	ацетон	5.1
	Ацетонитрил	5.8
VII	толуол	2.4
	бензол	2.7
	Нитробензол	4.4
VIII	хлороформ	4.1
	нитрометан	6.0
	Вода	10.2

В *нормально-фазовой* ТСХ для уменьшения силы других растворителей используют *разбавитель*, например, н-гексан с собственной силой растворителя равной 0.

В *обращенно-фазовой* ТСХ, для регулирования силы растворителя в качестве разбавителя используют воду, т.к. ее собственная сила растворителя также равна 0 (табл.12).

Количество растворителей, наиболее часто применяемых в нормально-фазовой и обращенно-фазовой ТСХ, невелико. Звездочками в таблицах 11 и 12 отмечены растворители, наиболее удобные для практического применения.

Таблица 12

Данные значений силы растворителя для обращенных фаз

Группа	Растворитель	Сила растворителя (S_i)
II	вода	0
	метанол*	2.6
	этанол	3.9
	2-пропанол	4.2
III	тетрагидрофуран	4.5
IV	Ацетонитрил	3.2

Перечисленные растворители редко используются в чистом виде. Обычно их смешивают и используют в виде многокомпонентных смесей. Сила растворителя такой смеси S_T может быть рассчитана из сил растворителей для индивидуальных компонентов S_i и объемных долей этих компонентов φ_i :

$$S_T = \sum S_i \cdot \varphi_i$$

3.2. Подвижные фазы на основе поверхностно-активных веществ

Анализ литературных данных показывает, что в ТСХ используются более 45 органических растворителей. На рис.14 представлены органические растворители, наиболее часто используемые в составе ПФ при разделении ионов металлов на прямой фазе.

Факторами, ограничивающими применение водно-органических элюентов в ТСХ, являются: резкий запах, токсичность или канцерогенность, летучесть и легкая воспламеняемость, а также агрессивность. Кроме того, из-за небольшого объема ПФ и разнообразия растворителей их достаточно сложно утилизировать.

Многие из указанных проблем, связанных с применением неводных и водно-органических ПФ, устраняются при использовании ПФ на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ). Последние не воспламеняются, имеют очень низкую токсичность, биоразлагаемы и достаточно дешевы. Поэтому такие ПФ стали важным дополнением, а в некоторых случаях и альтернативой традиционным неводным и водно-органическим ПФ и могут быть рекомендованы для применения не только для производственных и исследовательских целей, но и в учебных лабораториях. Анализ имеющихся данных позволяет заключить, что в состав указанных ПФ входят ПАВ различной природы. В связи с отсутствием сведений о ПАВ в учебной литературе по ТСХ, кратко рассмотрим физико-химические свойства растворов

ПАВ.

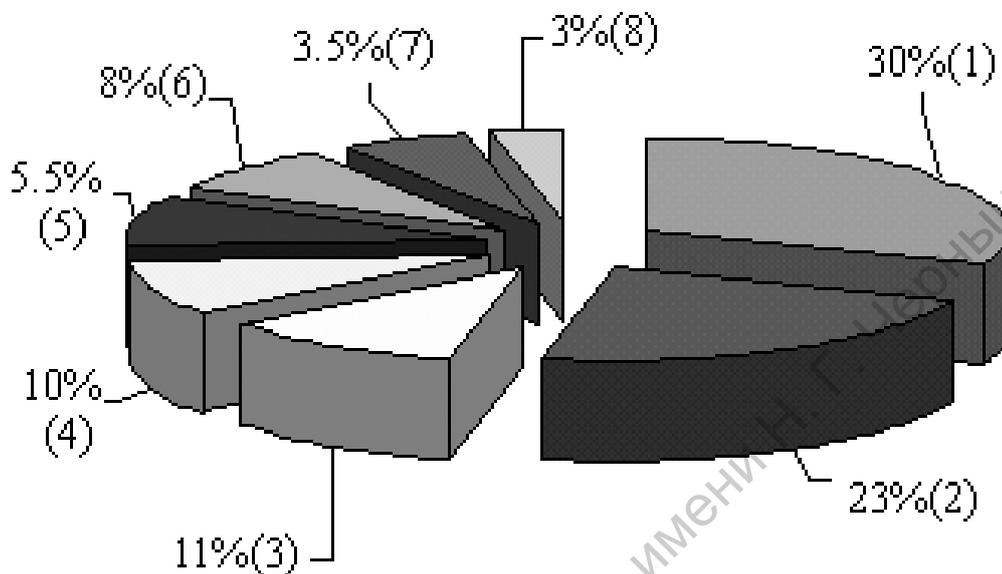
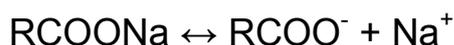


Рис. 14. Диаграмма использования органических растворителей в составе ПФ: 1 – бензол; 2 – хлороформ; 3 – ацетон; 4 – дихлорметан, толуол; 5 – тетрагидрид углерода; 6 – гексан, циклогексан; 7 – метанол; 8 – этанол.

3.2.1. Классификация ПАВ

ПАВ – органические соединения дифильной природы, содержащие длинный углеводородный радикал и полярную или ионную группу. По химической природе все ПАВ делятся на четыре большие группы: 1) анионоактивные; 2) катионоактивные; 3) амфолитные (или амфотерные); 4) неионогенные.

Анионоактивные ПАВ диссоциируют в воде, образуя отрицательно заряженные поверхностно-активные анионы, например



Катионоактивные ПАВ при диссоциации в воде образуют положительно заряженные поверхностно-активные катионы:

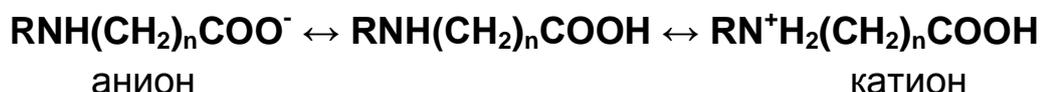


Амфолитные ПАВ содержат две функциональные группы, одна из

которых имеет кислый, другая – основной характер, например карбоксильную и аминную группы. В зависимости от среды амфолитные соединения обладают анионоактивными, либо катионоактивными свойствами:

щелочная среда

кислая среда



Неионогенные ПАВ, растворяясь в воде, не образуют ионов. Обычно это продукты конденсации оксида этилена с длинноцепочечными спиртами, карбоновыми кислотами, аминами, амидами, содержащими подвижный атом водорода.

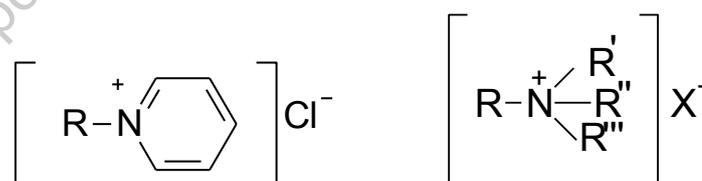
Ниже приведены важнейшие представители различных классов ионогенных и неионогенных ПАВ.

Анионоактивные ПАВ:

соли карбоновых кислот RCOOMe;
 алкилсульфаты – соли алкилсерных кислот ROSO₃Me;
 алкилсульфонаты – соли алкилсульфоновых кислот R-SO₃Me;
 алкиларилсульфонаты – соли алкилароматических сульфокислот R-C₆H₄-SO₃Me, где Me обычно катион натрия;
 вещества, содержащие другие типы анионных гидрофильных групп: фосфаты – соли неполных эфиров фосфорной кислоты;
 тиосульфаты – соли тиосульфокислот.

Катионоактивные ПАВ:

соли первичных, вторичных и третичных алифатических аминов и четырехзамещенных аммониевых оснований [RNR'₃]X, а также соли гетероциклических аминов:



Неионогенные ПАВ обычно классифицируют, учитывая класс исходного оксиэтилированного соединения, например, различают:

оксиэтилированные жирные кислоты RCOO(CH₂CH₂O)_nH (сложноэфирная связь);

оксиэтилированные жирные спирты RO(CH₂CH₂O)_nH (простая эфирная связь);

оксиэтилированные алкилфенолы RArO(CH₂CH₂O)_nH;

продукты оксиэтилирования других соединений с подвижным атомом водорода – аминов, амидов, меркаптанов и др.

В приведенных формулах ПАВ R – обозначает углеводородный

радикал с длинной цепью (обычно C_8-C_{18}); R' , R'' , R''' - радикалы с короткой цепью, арил или алкиларил; Ar – бензольное кольцо; X – неорганический анион (Cl^- , Br^- и др.); n – среднее число оксиэтильных групп в молекуле неионогенного ПАВ.

Важнейшей характерной особенностью ПАВ является способность образовывать в растворе ансамбли молекул (ионов) коллоидного размера – мицеллы. В общих чертах мицеллообразование заключается в следующем. При некоторой определенной для каждого ПАВ критической концентрации мицеллообразования (ККМ) отдельные молекулы (ионы) ПАВ самопроизвольно ассоциируют, образуя мицеллярные агрегаты. Внутренняя часть (ядро) возникающих мицелл содержит углеводородный радикал, а полярные группы обращены в водную макрофазу. Таким образом, мицелла представляет собой как бы ультрамикрочастицу углеводорода, заключенную в оболочку из гидратированных полярных групп (рис. 15а).

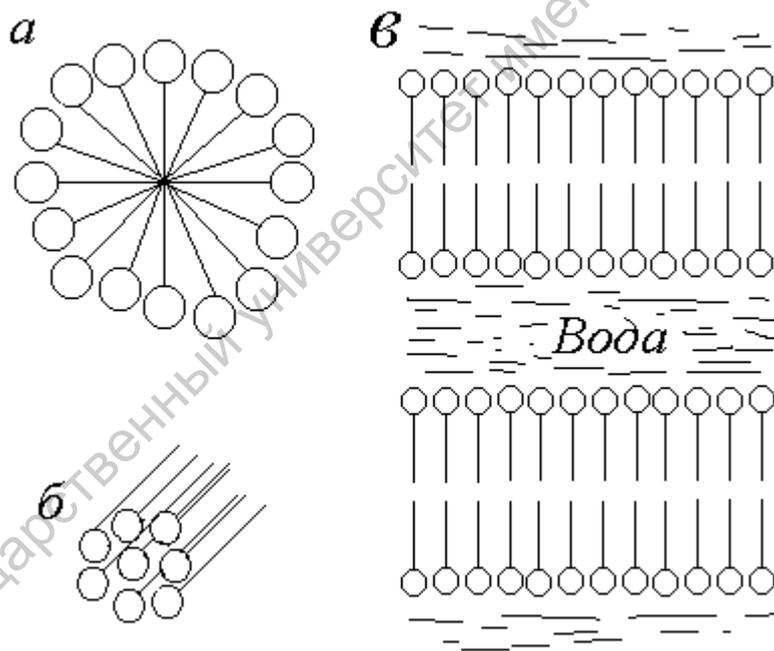


Рис.15. Строение мицелл: **а** – сферическая (мицелла Гартли); **б** – цилиндрическая; **в** – пластинчатая (мицелла Мак-Бэна).

При мицеллообразовании происходит резкое изменение различных физико-химических свойств растворов ПАВ, таких как, плотность, электропроводность, поверхностное натяжение, коэффициент преломления, рассеяние света и др. В результате на изотермах “свойство – концентрация ПАВ” в очень узкой области концентраций наблюдается излом. Величину точки излома, соответствующую ККМ, находят как пересечение касательных к ветвям этой кривой. Насчитывается более 80 разнообразных методов

определения ККМ. Мицеллообразование ПАВ протекает самопроизвольно, так как уменьшает свободную энергию системы.

Мицеллы ПАВ находятся в термодинамическом равновесии с молекулами (ионами), находящимися в водной среде, т.е. существует равновесие:

мицеллы разного размера \leftrightarrow молекулы (ионы)

Мицеллы возникают при ККМ и распадаются при разбавлении раствора. Мицеллярные растворы ПАВ гомогенны на макроуровне, но микрогетерогенны и двухфазны на микроуровне. Мицеллы могут рассматриваться только как зародыши новой фазы (псевдофаза), поскольку они не способны к безграничному росту с образованием макрофазы.

Способность ПАВ к мицеллообразованию возникает при определенном соотношении гидрофильных свойств молекул, обусловленных природой и количеством полярных групп, и гидрофобных свойств, связанных с длиной углеводородного радикала. Оптимальный баланс этих свойств характерен для ПАВ, в молекулах которых резко гидрофильные, чаще всего ионизированные полярные группы связаны с длинным углеводородным радикалом.

Относительно вида и формы мицелл не существует единой точки зрения. Общепринятыми являются представления, согласно которым в растворе ПАВ вблизи ККМ возникают мицеллы сферической формы (мицеллы Гартли) (рис.15,а), а при концентрациях значительно выше ККМ (в десятки и сотни раз) в растворе существуют цилиндрические (рис. 15,б) и затем пластинчатые мицеллы (мицеллы Мак-Бэна) (рис.15,в).

Среднее число ионов (молекул) ПАВ, приходящееся на одну мицеллу, называется *числом агрегации*. Для сферических мицелл оно изменяется примерно от 30 до 150 (в отсутствие электролитов).

Из-за диссоциации полярных групп поверхность мицелл ионогенных ПАВ электрически заряжена. Благодаря сильному электростатическому притяжению часть противоионов (около 60-70%) удерживаются у поверхности мицеллы, остальные располагаются в прилегающем слое воды, образуя диффузный электрический слой. В целом мицелла может рассматриваться как своеобразный крупный многозарядный ион (обычно он имеет до 30 электрических зарядов). Такие заряженные мицеллы участвуют в переносе электрического тока, хотя их подвижность меньше, чем подвижность неагрегированных ионов.

На величину ККМ оказывают влияние такие факторы, как длина и строение углеводородного радикала, присутствие электролитов, полярных органических веществ, а также температура.

3.2.2. Применение ПАВ в качестве подвижных фаз в ТСХ

В зависимости от концентрации ПАВ в подвижной фазе различают два основных варианта ТСХ:

- ион-парная ТСХ (ИПТСХ), когда концентрация ПАВ в водной ПФ ниже ККМ или в ее составе присутствуют значительные количества органического растворителя, препятствующего образованию мицелл, и ПАВ выполняют роль противоиона;
- мицеллярная ТСХ (МТСХ), когда концентрация ПАВ в растворе превышает ККМ и в ПФ присутствуют мицеллы.

Диапазон концентраций ПАВ, используемых в водной подвижной фазе достаточно велик: от 1,5 - 5 ККМ до 10 - 50 ККМ. Значительно отличается и время элюирования: от 10 - 20 минут до 1 - 3 часов.

В основе действия мицеллярных подвижных фаз (МПФ) лежит способность мицелл дифференцированно солюбилизировать (растворять) близкие по строению и свойствам частицы разделяемых соединений. Селективность разделения веществ с использованием МПФ зависит от специфики их распределения между неподвижной фазой и водой (I), ПФ и мицеллами ПАВ (II), а также распределения внутри самой ПФ, т.е. в системе вода – мицелла ПАВ (III) (рис. 16).

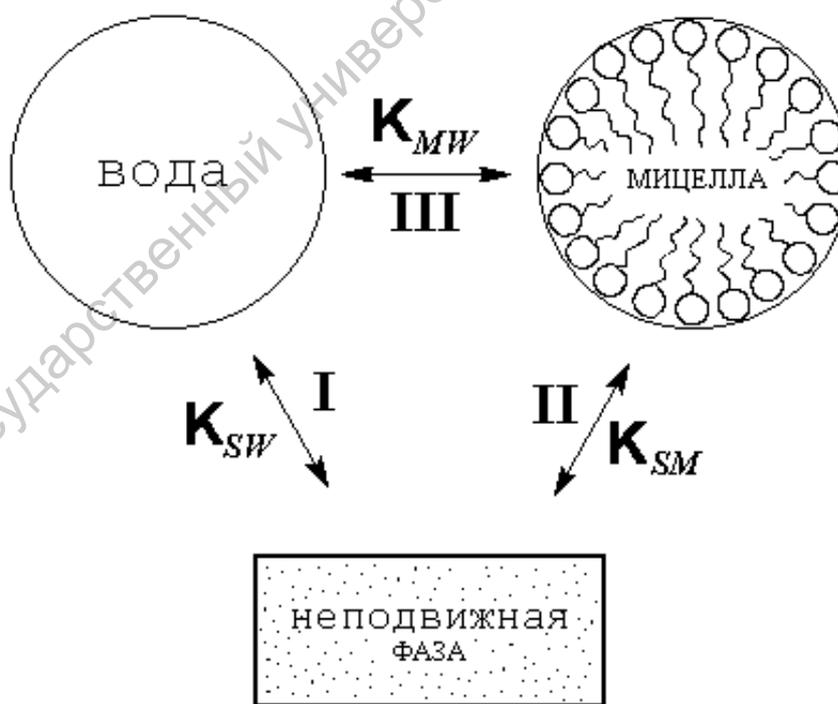


Рис.16. Схематическое представление “трехфазной” модели мицеллярной хроматографии

Для количественной оценки распределения реагентов в мицеллярных растворах ПАВ используют уравнение вида:

$$\frac{R_f}{1-R_f} = \frac{V_{\text{ПФ}}}{V_{\text{НФ}}} \times \left[\frac{(K_{\text{mw}} - 1)v}{K_{\text{sw}}} \right] \times C_m + \frac{V_{\text{ПФ}}}{V_{\text{НФ}}} \times \frac{1}{K_{\text{sw}}} \quad (36)$$

где

$V_{\text{НФ}}$ – объем неподвижной фазы,

$V_{\text{ПФ}}$ – объем подвижной фазы,

$V_{\text{НФ}}/V_{\text{ПФ}}$ – “фазовое отношение”; величина $V_{\text{НФ}}/V_{\text{ПФ}}$ численно равна $A_{\text{НФ}}/A_{\text{ПФ}}$ – отношению фаз в сечении слоя,

v – парциальный удельный объем (мл/г),

C_m – концентрация мицелл в подвижной фазе: $C_m = C - \text{ККМ}$, где C – полная концентрация поверхностно-активного вещества в ПФ, ККМ – критическая концентрация мицеллообразования, (г/мл),

K_{mw} – коэффициент распределения между МПФ и водой,

K_{sw} – коэффициент распределения между неподвижной фазой и водой.

Данное соотношение можно представить уравнением прямой $y = ax + b$, где

$$a = \frac{V_{\text{ПФ}}}{V_{\text{НФ}}} \times \left[\frac{(K_{\text{mw}} - 1)v}{K_{\text{sw}}} \right]; \quad b = \frac{V_{\text{ПФ}}}{V_{\text{НФ}}} \times \frac{1}{K_{\text{sw}}} \quad (37)$$

Из отношения коэффициентов “а” и “b” получаем зависимости (38) и (39)

$$\frac{a}{b} = \frac{V_{\text{ПФ}} \times (K_{\text{mw}} - 1)v \times K_{\text{sw}} \times V_{\text{НФ}}}{V_{\text{НФ}} \times K_{\text{sw}} \times V_{\text{ПФ}}} = (K_{\text{mw}} - 1)v \quad (38),$$

$$K_{\text{mw}} = \frac{a}{bv} + 1 \quad (39) ,$$

позволяющие определить коэффициенты распределения реагентов между водой и мицеллярной фазой (равновесный процесс III).

Используя уравнение (37), можно также рассчитать коэффициент распределения между водой и неподвижной фазой (равновесный процесс I). Для расчета коэффициентов распределения реагентов в системе вода – мицелла ПАВ снимают зависимости

подвижности исследуемых реагентов от мицеллярной концентрации ПАВ в подвижной фазе, строят графики в координатах $R_f/(1-R_f) = f(C_m)$ и рассчитывают величины K_{MW} по формуле (39).

В таблице 13 приведены коэффициенты распределения K_{MW} и K_{SW} для индикаторов ряда флуоресцеина и сульфифталейнов в мицеллы додецилсульфата натрия.

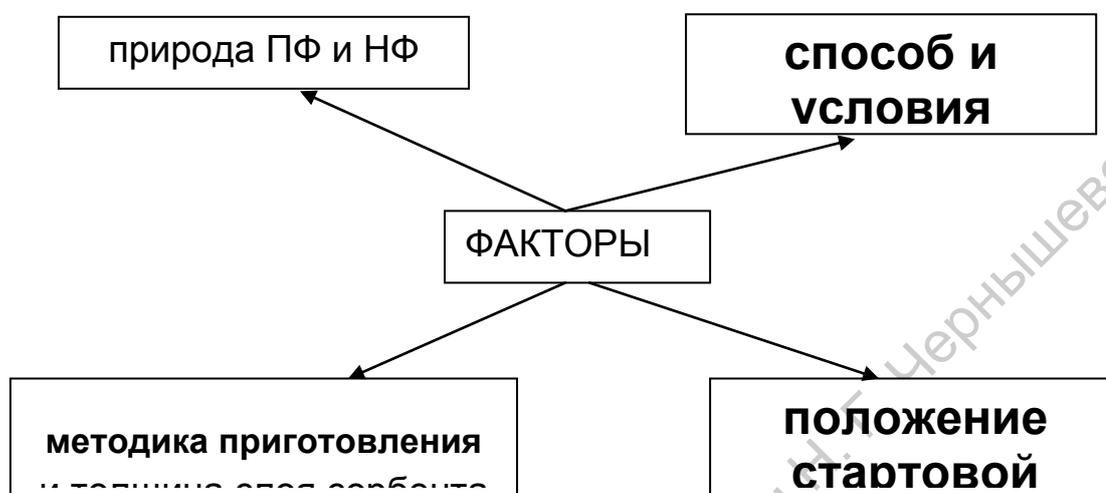
Таблица 13

Параметры уравнения (39) и коэффициенты распределения K_{mw} , K_{sw} реагентов из воды в мицеллы ДДС (T=297K)

Реагент	a	b	K_{mw}	K_{sw}
Флуоресцеин	42,6	4,07	13,1	0,30
Эозин	29,1	0,33	105	3,6
Эритрозин	37,4	0,10	431	11,7
Феноловый красный	59,3	2,14	33,2	0,50
Бромфеноловый красный	56,5	1,39	48,1	0,80
Бромфеноловый синий	35,5	0,38	108	3,1
Крезоловый красный	46,2	0,45	119	2,6
Тимоловый синий	37,1	0,060	681	18,6
Бромтимоловый синий	38,9	0,060	710	18,5

Анализ литературных данных показывает, что ПФ на основе ПАВ применяются для разделения смесей органических реагентов, хелатов и ионов металлов, анализа пищевых красителей, фармацевтических препаратов, а также для оценки степени чистоты органических реагентов.

Глава 4. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ТСХ



Большинство из этих факторов рассмотрены в соответствующих разделах ранее. В настоящей главе дается оценка влияния только температуры и рН подвижной фазы. Последний параметр является особенно существенным в ион-парной ТСХ.

4.1. Влияние температуры

Влияние температуры на результаты хроматографического разделения методом ТСХ обычно незначительно. Считается, что этот фактор следует учитывать при повышении температуры выше 24°C. Расчет изменения величины R_m проводят по уравнению:

$$R'_{m T} - R'_{m 24} = \left(\frac{297}{T} - 1 \right) \cdot \alpha \cdot f(X, S) \quad (40)$$

где R'_m - подвижность вещества при температуре T ;

R'_{24} - подвижность вещества при 24°C;

α - активность слоя сорбента;

$f(X, S)$ - функция, учитывающая свойства вещества X и растворителя S .

Считается, что в большинстве случаев произведение $\alpha f(X, S)$ равно 2. Повышение температуры выше комнатной не влияет на селективность хроматографируемой системы. Поэтому оно целесообразно в том случае, если анализируемое вещество плохо растворяется при более низкой температуре или вязкость элюента

слишком велика. Снижение температуры целесообразно, если исследуются соединения с высокой летучестью и низкой термической стабильностью.

4.2. Влияние pH

Кислотность среды влияет на хроматографирование соединений, проявляющих свойства кислот и оснований. Для таких соединений R_f зависит от следующих факторов: pH среды, констант ионизации K_a (для кислот) и K_b (для оснований), коэффициентов распределения ионной и молекулярной форм и ионной силы раствора. Уравнения, связывающие величины R'_f , R'_m и pH в тонкослойной хроматографии имеют вид:

$$R'_f = \frac{1}{1 + \left(\frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}} \right) \cdot D \left[1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a} \right]} \quad (41)$$

где $\frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}}$ - фазовое отношение; D - коэффициент распределения сорбата между неподвижной и подвижной фазами; $\text{p}K_a = -\lg K_a$.

$$R'_m = \lg D \left(\frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}} \right) + \lg \left[1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a} \right] \quad (42)$$

Из уравнений (41, 42) следует, что с увеличением pH раствора величина R'_f снижается, а R'_m , напротив, растет. В случае оснований члены pH и $\text{p}K_a$ меняют знаки:

$$R'_f = \frac{1}{1 + \left(\frac{A_{\text{НФ}}}{A_{\text{ПФ}}} \right) \cdot D \cdot \left[1 + 10^{\text{p}K_a - \text{pH}} \right]} \quad (43)$$

Из приведенных данных следует, что два электролита с разными значениями $\text{p}K$ могут быть разделены даже тогда, когда все остальные хроматографические параметры одинаковы.

Графические зависимости R_f от pH характеризуются точкой инверсии pH_i (точкой перегиба) (рис. 17):

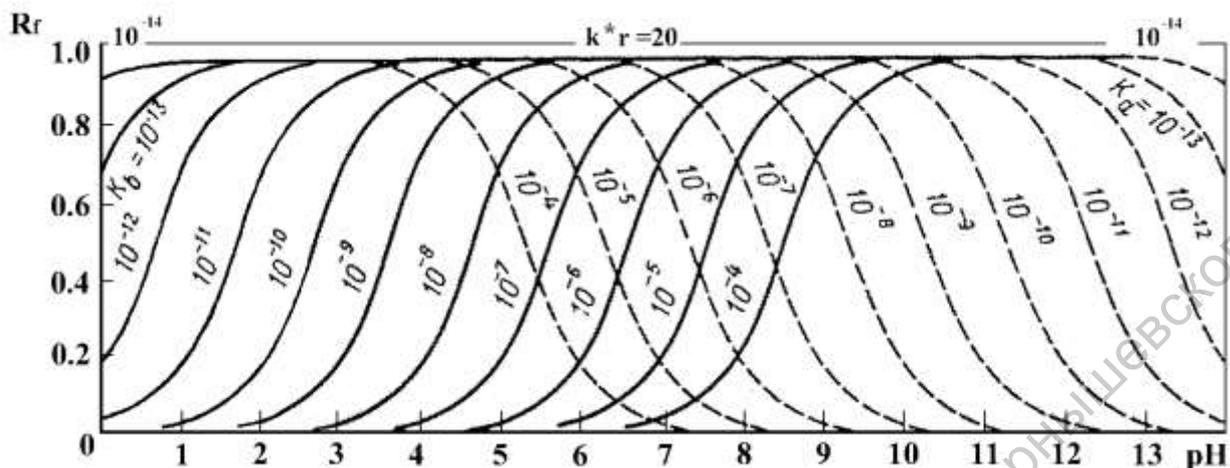


Рис.17. Зависимость величины R_f от pH: сплошные линии – основания, штриховые линии – кислоты

Значение точки инверсии можно рассчитать по уравнениям:

$$pH_i = pK_a + \lg(K^*r) \quad (\text{для кислот}) \quad (44)$$

$$pH_i = pK_a - \lg(K^*r) \quad (\text{для оснований}) \quad (45)$$

где K^* - величина, обратная коэффициенту распределения D ($K^* = 1/D$);

r – величина, обратная фазовому отношению ($r = A_{\text{фФ}}/A_{\text{нФ}}$).

Из уравнений следует, что pH_i определяется константой диссоциации и коэффициентом распределения электролита. Для сильных растворителей происходит сдвиг pH_i в область больших значений R_f для кислот и в область меньших значений R_f для оснований. Из приведенных данных также следует, что при хроматографическом определении K_a по величинам R_f и pH необходимо учитывать коэффициент распределения.

Оптимальное значение pH при разделении двух диссоциирующих веществ может быть определено по уравнению:

$$pH_{\text{opt}} = \frac{1}{2}(pK'_a + pK''_a) - \frac{1}{2}(\lg K^*'r + \lg K^*''r) \quad (46)$$

Приведенные выше уравнения, а также параметры их использования относятся как к нормальным, так и обращенным фазам. В первом случае буферный раствор является составляющей частью неподвижной фазы, во втором – подвижной.

Влияние pH в ион-парной хроматографии

Ион-парная хроматография может быть реализована в нормально-фазовом и обращенном (ОФ) вариантах, каждый из которых имеет свои преимущества. Более распространенной является ион-парная ОФ ТСХ. Селективность разделения в этом случае может быть легко изменена путем варьирования pH водной подвижной фазы. На рис.18 представлены теоретические зависимости R_f от pH для анионных форм кислот, имеющих разные значения pK_a .

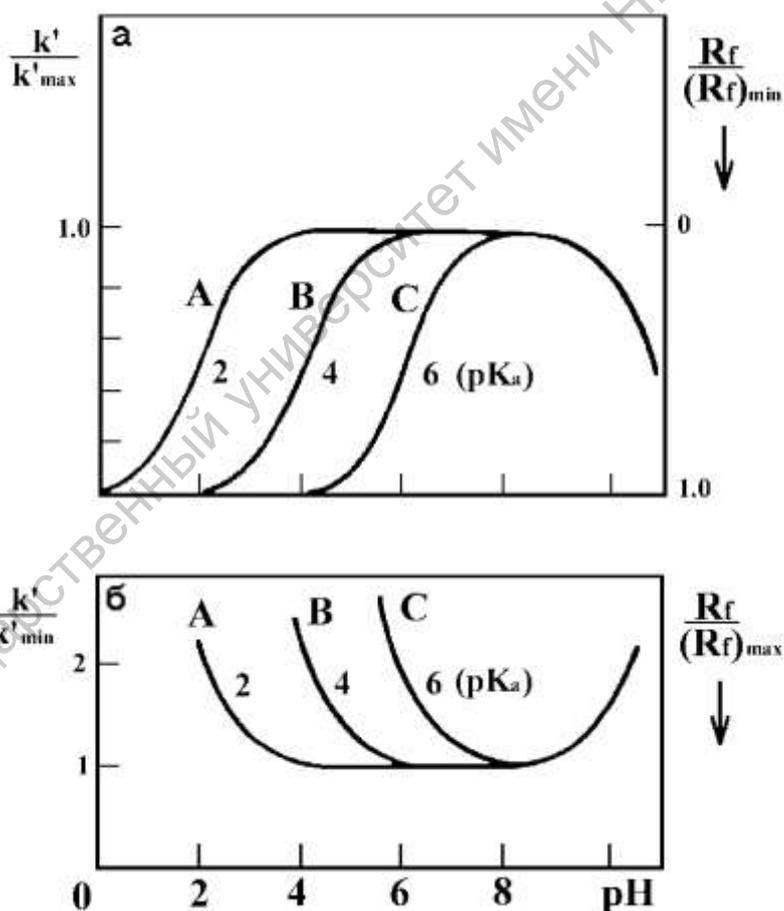


Рис.18. Изменение относительных величин удерживания в зависимости от pH в ион-парной жидкостной хроматографии анионов: **а** – вариант с обращенными фазами, **б** – вариант с нормальными фазами

В ион-парной ТСХ с обращенными фазами (рис.18а) минимальные значения R_f получают при промежуточных значениях

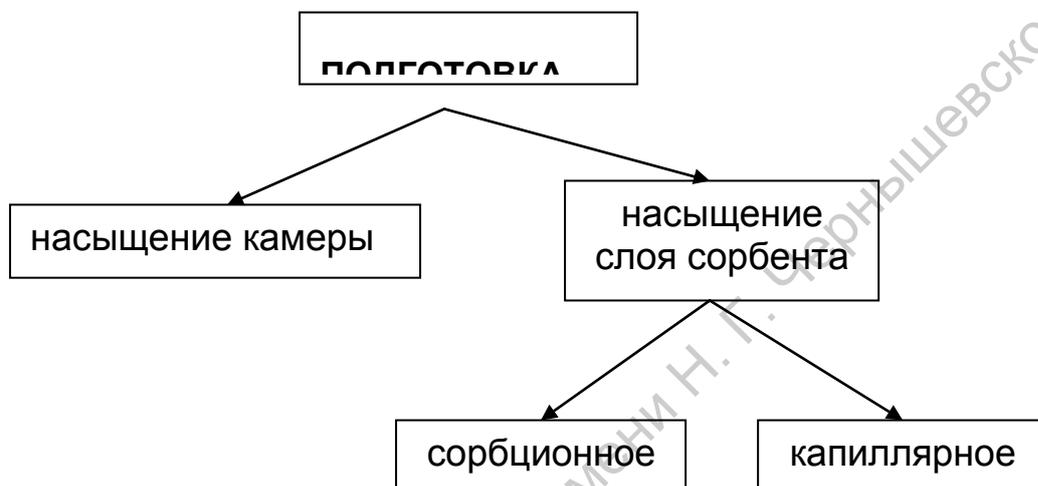
pH, когда компоненты пробы полностью ионизированы и образование ионных пар достигает максимума. По мере снижения pH подвижной фазы уменьшается количество ионных пар в неподвижной фазе и значения R_f каждого аниона уменьшаются.

Слабые кислоты или слабые основания обычно не применяются в качестве противоионов, так как это ограничивает возможность варьирования pH в ион-парной хроматографии. Соединения, обладающие как кислотной, так и основной группой, относительно нечувствительны к ион-парным эффектам.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ГЛАВА 5. ПОДГОТОВКА КАМЕРЫ И СЛОЯ СОРБЕНТА ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ. НАНЕСЕНИЕ ПРОБЫ. СПОСОБЫ ПРОВЕДЕНИЯ ТСХ

5.1. Подготовка камеры и слоя сорбента



Сухой сорбент обладает способностью насыщаться перед началом элюирования находящимися в газовой фазе молекулами растворителя. Подвижная фаза, поднимающаяся по слою сорбента за счет действия капиллярных сил, тоже взаимодействует с газовой фазой. Находящиеся в газовой атмосфере молекулы растворителя оказывают влияние на взаимодействие сорбента с растворителем и наоборот. Поэтому предварительное насыщение камеры и слоя сорбента растворителем, находящемся в газовой фазе, играет важную роль в процессе хроматографирования. Различают следующие виды насыщения: насыщение камеры, сорбционное и капиллярное насыщение слоя сорбента.

Под “насыщением камеры” подразумевается состояние, когда все компоненты подвижной фазы находятся в равновесии с газовой фазой как до элюирования и в его процессе. Насыщение камеры сопровождается сорбционным насыщением слоя сорбента.

Сорбционное насыщение слоя сорбента – состояние, когда несмоченный слой сорбента находится в равновесии со всеми компонентами газовой фазы, насыщенными компонентами растворителя. Сорбционное насыщение сорбента достигается в процессе предварительного насыщения камеры и сорбента.

Капиллярное насыщение слоя сорбента – процесс заполнения капилляров, представляющих собой часть свободного объема слоя сорбента V_m и отражает состояние слоя после завершения элюирования. Капиллярное насыщение является следствием

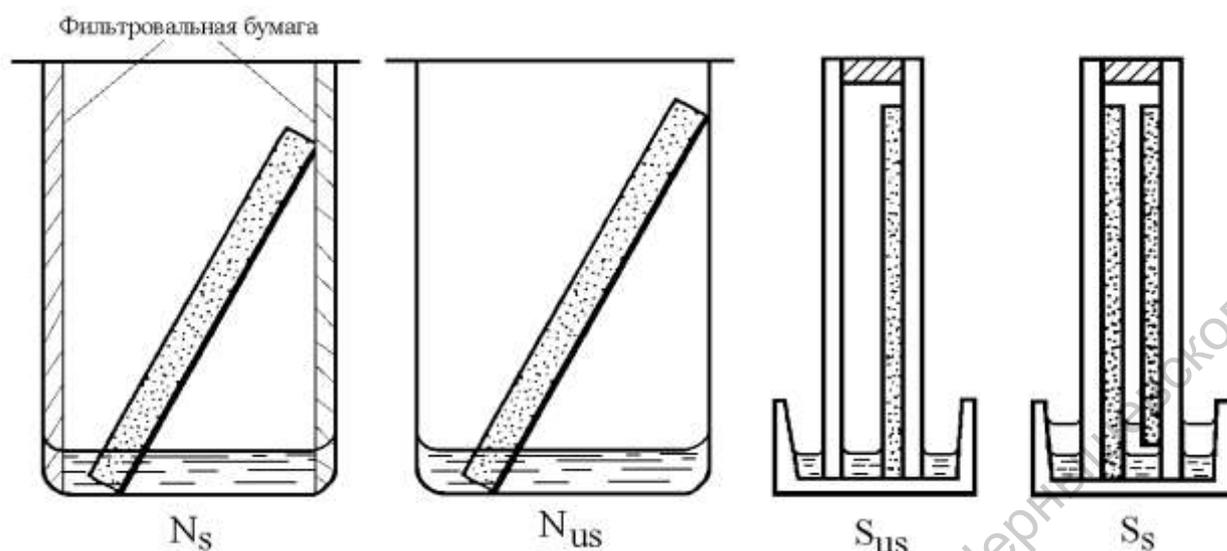


Рис. 20. Типы камер для тонкослойной хроматографии: N_s – насыщенная обычная камера; N_{us} – ненасыщенная обычная камера; S_{us} – ненасыщенная сэндвич-камера; S_s – насыщенная сэндвич-камера.

Сэндвич-камера имеет объем газового пространства менее 5 см^3 . Наиболее употребимым вариантом таких камер являются ненасыщенные сэндвич-камеры. Насыщенный вариант (S_s) применяется редко, т.к. с учетом конструкции S-камеры это сделать трудно.

При оптимальном режиме хроматографирования камеры должны удовлетворять следующим требованиям: воспроизводимость рабочих параметров (прежде всего значений R_f), универсальность, легкость в эксплуатации, отсутствие краевых эффектов. Этим требованиям в большей степени удовлетворяют насыщенные и ненасыщенные N-камеры. Сэндвич-камеры при использовании как однокомпонентных, так и многокомпонентных элюентов обнаруживают краевые эффекты, что ухудшает разделение смесей.

Насыщение камеры

В случае двухкомпонентной смеси растворителей в подвижной фазе отношение концентраций компонентов в газовой фазе устанавливается в соответствии с законом Рауля:

$$\frac{C_1}{C_2} = x_1 p_1^\circ (1 - x_1) p_2^\circ \quad (47) ,$$

где p_1° и p_2° – давление пара чистых растворителей;

x_1 и $(1 - x_1)$ – мольные доли компонентов в подвижной фазе.

С учетом возможного содержания в камере компонентов воздуха и паров воды суммарное давление p в камере определяется выражением:

$$P = 1 \text{ атм} = p_{\text{O}_2} + p_{\text{N}_2} + p_{\text{H}_2\text{O}} + \sum p_{\text{раств}} \quad (48)$$

В обычной камере состояние насыщения будет достигнуто примерно через 5-10 минут при использовании растворителя с температурой кипения ниже 100°C. Для насыщения камеры высококипящим растворителем требуется несколько часов.

Предварительное насыщение слоя сорбента

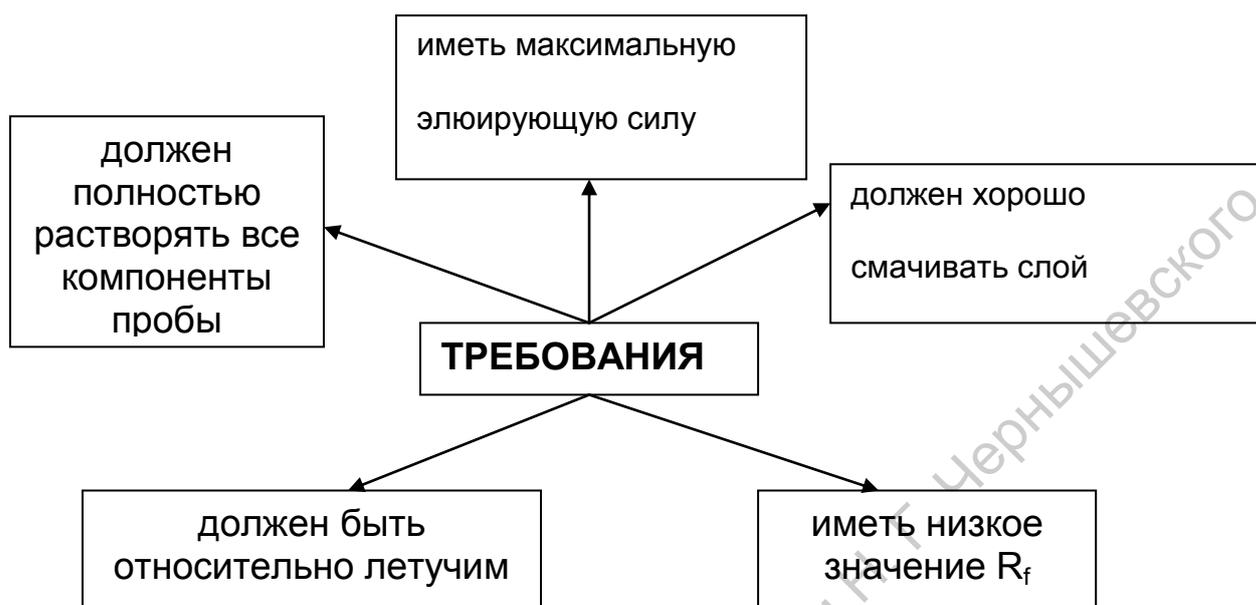
Предварительное насыщение слоя сорбента любым чистым растворителем увеличивает скорость перемещения фронта растворителя по слою и уменьшает значения R_f анализируемых веществ.

При использовании многокомпонентных подвижных фаз основные эффекты, вызванные предварительным насыщением слоя, оказываются теми же, что и при работе с чистыми растворителями: снижаются значения R_f и образуется два фронта растворителя. Для таких систем предварительное насыщение является необходимым, так как позволяет избежать расслоения подвижной фазы на отдельные компоненты в процессе элюирования. Этот процесс особенно наблюдается при использовании ненасыщенных сэндвич-камер.

Предварительному насыщению подвергаются как нормальные, так и обращенные фазы. При разделении на нормальных фазах предпочтительно для насыщения слоя сорбента использовать полярные составляющие многокомпонентных элюентов. При разделении на обращенных фазах – неполярные. На пластинках с обращенной фазой предварительное насыщение повышает скорость продвижения фронта водных подвижных фаз. В нормально-фазовой ТСХ насыщение увеличивает скорость продвижения фронта неполярной подвижной фазы.

В случае предварительного насыщения ни одно из веществ не может иметь $R_f = 1$. Максимальный уровень R_f снижается ~ до 0.7 даже для наиболее быстро перемещающихся зон и при наиболее “сильном” растворителе. Кроме того, предварительное насыщение сорбента парами растворителя снижает содержание воды в слое при равновесных условиях, т.е. повышает активность неподвижной фазы. Возможность предварительного насыщения слоя сорбента специфична для ТСХ и не применяется в колоночной жидкостной хроматографии, так как доступ к слою сорбента закрыт.

5.2. Требования к растворителю и способу нанесения пробы



При нанесении проб на пластину для получения воспроизводимых результатов необходимо соблюдать ряд требований. Ширина стартовой зоны на пластинке должна быть по возможности минимальной, для ТСХ – 2-3 мм, для ВЭТСХ ~ 1 мм. Существенным является постоянство расстояния линии нанесения проб от нижнего края пластины (обычно 1 – 2 см) и линии погружения пластины в элюент (≈ 0.5 см).

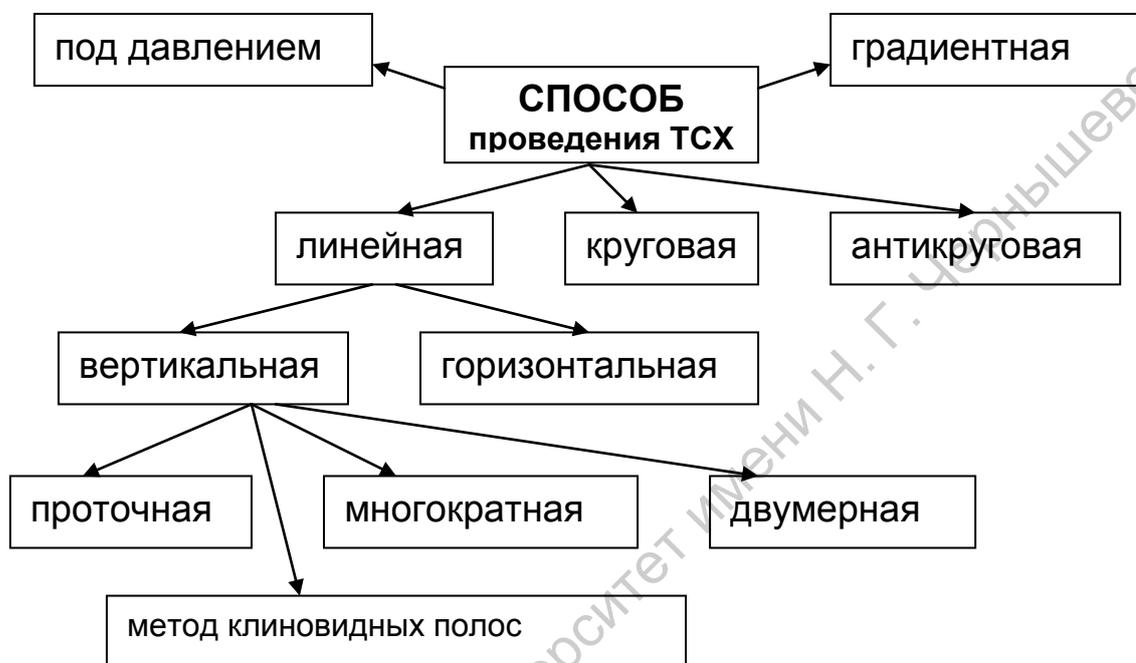
Для нанесения проб используют стеклянные или платино-иридиевые капилляры, микропипетки, шприцы, а также специальные дозирующие устройства. В ВЭТСХ для нанесения нанолитровых объемов разработаны самозаполняющиеся платино-иридиевые капилляры с максимальным объемом дозирования 22 нл на 1 м длины. При отборе одной и той же пробы подобным капилляром воспроизводимость введения пробы составляет ± 0.7 % от ее объема. В случае ТСХ объемы проб составляют 0.5 – 3 мкл, для ВЭТСХ ~ 200 нл.

Для сохранения активности слоя адсорбента рекомендуется во время нанесения проб покрывать адсорбент выше линии нанесения стеклянной пластиной и наносить пробу по возможности быстро и тщательно высушивать перед хроматографированием.

При подготовке пробы для ТСХ необходимо использовать чистые растворители, так как примеси в них при концентрировании пробы также концентрируются и в дальнейшем могут исказить результаты ТСХ. Растворимость анализируемого вещества в выбранном растворителе должна быть не менее 1%. Для нормально-фазовой ТСХ используется как можно более неполярный

растворитель, поскольку вещества в этом случае имеют высокое сродство к неподвижной фазе и поэтому остаются на старте. Для обращенно-фазовой ТСХ по аналогичным причинам для растворения пробы используются полярные растворители.

5.3. Способы хроматографирования в ТСХ



В колоночной жидкостной хроматографии возможно только линейное движение элюента. В ТСХ, благодаря открытому слою сорбента, можно осуществить три типа хроматографирования: линейное, круговое и антикруговое (рис.21).

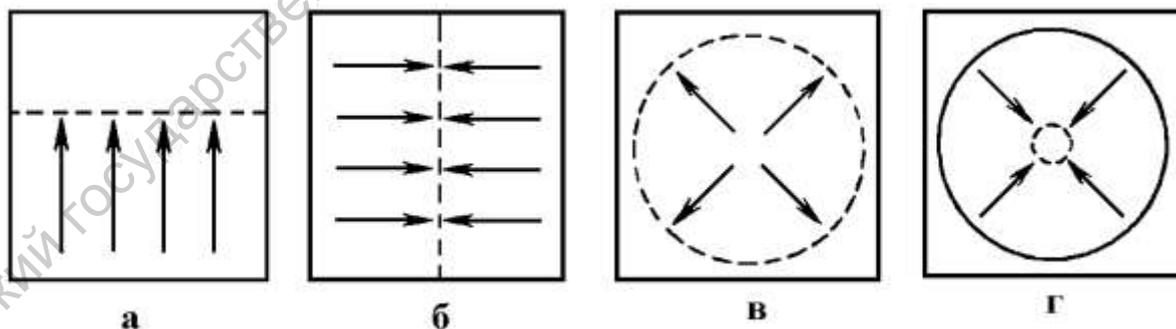


Рис.21. Типы элюирования в ТСХ: **а** – линейное (вертикальное), **б** – линейное (горизонтальное), **в**- круговое, **г** – антикруговое

Кроме того, можно дополнительно реализовать ряд других методик хроматографирования, позволяющих значительно увеличивать эффективность разделения: проточную, многократную, градиентную и двумерную ТСХ.

Линейная, круговая и антикруговая ТСХ

Наиболее широко используют *линейный* вариант хроматографирования. В этом случае пробы наносят на стартовую линию параллельно одной из сторон. Пластину помещают вертикально в хроматографическую камеру, на дно которой налит элюент, и проводят восходящую ТСХ (рис. 21,а). Можно также использовать нисходящую вертикальную ТСХ, когда элюент движется сверху вниз по слою сорбента. Линейное развитие хроматограмм можно осуществить и при горизонтальном положении пластины с подачей на нее элюента с одной или с обеих сторон (рис. 21,б). Для восходящей линейной ТСХ в качестве хроматографической камеры можно использовать любой сосуд прямоугольной или цилиндрической формы. В подобных камерах можно проводить ТСХ с насыщением (стенки камеры покрывают фильтровальной бумагой, смоченной элюентом, что стабилизирует условия разделения) или без насыщения.

Существуют коммерческие двойные ("twin") камеры для ТСХ, в которых можно осуществлять три варианта хроматографии: без насыщения, с предварительным насыщением и с насыщением в процессе хроматографирования (рис. 22). Расход элюента в этих камерах значительно меньше.

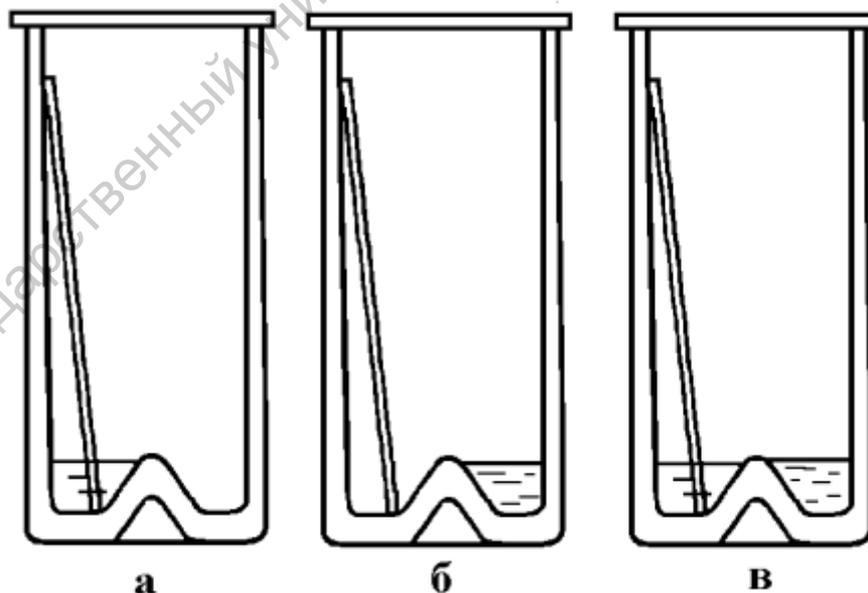


Рис.22. Камеры для ТСХ: **а** – обычная ТСХ, **б** – ТСХ с предварительным насыщением слоя парами элюента, **в** – ТСХ с насыщением слоя парами элюента (одновременно с хроматографированием).

В *круговой* ТСХ пробы наносят на некотором расстоянии от центра пластины по окружности, а элюент подают в центр (см. рис.

21,в). Оптимальное разрешение достигается круговой хроматографией при $R_f = 0.009$, т.е. хорошо разделяются вещества с низкими значениями R_f . При этом у старта пятна симметричные и компактные, а ближе к фронту сжимаются в направлении элюирования и вытягиваются по окружности.

В *антикруговой* ТСХ пробы наносят по окружности по периферии пластины и элюент подают в направлении к центру пластины (см. рис. 21,г). При этом хроматографические зоны сжимаются по мере движения по пластине. В антикруговой ТСХ одновременно можно анализировать наибольшее количество проб. Это наиболее быстрый метод ТСХ. Антикруговая ТСХ дает хорошие результаты при разделении веществ с высокими значениями R_f (оптимальное разрешение при $R = 1$, $R_f \approx 0.5$).

Для реализации круговой и антикруговой ТСХ выпускаются специальные, так называемые, U-камеры. Их применение повышает воспроизводимость результатов ТСХ за счет исключения влияния паровой фазы (элюент вынесен за пределы камеры) и возможности проведения ТСХ в атмосфере инертного газа. Круговую и антикруговую ТСХ можно реализовать и более простым способом при использовании чашки Петри для круговой ТСХ и двух чашек Петри, вставленных одна в другую для антикруговой ТСХ.

Элементы круговой и антикруговой ТСХ могут быть реализованы и в вертикальном варианте в обычных камерах. Это ТСХ по Маттиасу (рис. 23) и треугольная ТСХ.

Метод клиновидных полос (способ Маттиаса) представляет собой видоизменение круговой хроматографии и проводится как бы на секторе круга. Его применяют для разделения веществ с близкими значениями R_f . Он дает более резко разграниченные зоны и особенно удобен при разделении значительного количества одного вещества наряду с малым количеством другого.

При использовании этого метода пластинку подготавливают, как показано на рисунке 23. Часть слоя сорбента внутри шестиугольников снимают с пластинки. Смесь веществ наносят в узкой части слоя. После грубого фракционирования вещества передвигаются в более широкую часть пластинки, в месте расширения слоя разделяются как при круговой хроматографии, образуя узкие поперечные зоны.

В *методе треугольного элюирования* используют слой, имеющий вид треугольника.

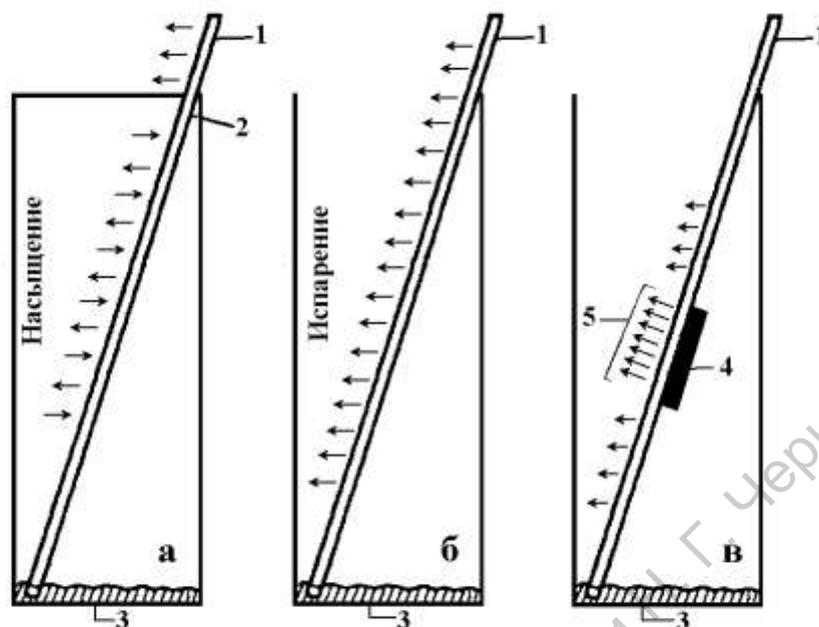


Рис.24. Проточная ТСХ: **а** – закрытая камера; **б** – открытая камера; **в** – локальное испарение. **1** – ТСХ-пластина, **2** – отверстие в хроматографической камере, **3** – элюент, **4** – нагревательный элемент, **5** – зона наиболее эффективного разрешения.

большими R_f следует оптимизировать селективность элюента (уменьшив его адсорбционную активность) или использовать испарительную ТСХ с локальным нагревом.

Многократная ТСХ

Многократная ТСХ (МТСХ) – это повторяющееся развитие хроматограммы в одном или двух направлениях, в одном или разных элюентах с постоянным или переменным расстоянием элюирования. В этом варианте ТСХ фронт растворителя многократно пересекает зону вещества и с каждым разом все больше сжимает ее в направлении движения элюента (рис. 25). После каждого акта элюирования пластину сушат. Как видно из рис.25, сначала фронт элюента касается нижней границы зоны, затем, пересекая зону, поджимает ее, а дальше зона движется независимо от фронта элюента, размываясь по обычным законам хроматографии.

Относительное расстояние, на которое продвигается зона вещества после n ступеней хроматографирования (nR_f), можно рассчитать по уравнению:

$$nR_f = 1 - \frac{1 - w_R}{w_R}^{\bar{n}} \quad (49) ,$$

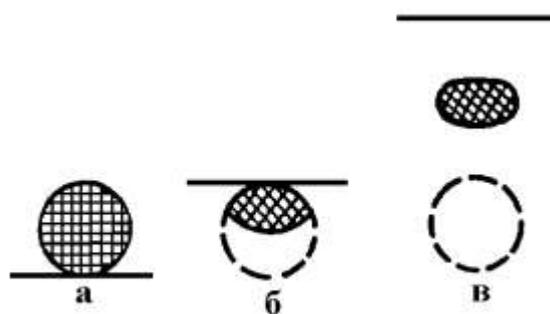


Рис. 25. Механизм сжатия зоны при многократной ТСХ: а – фронт элюента касается нижней границы зоны, б – фронт элюента проходит через зону, сжимая ее в направлении своего движения, в – зона движется после сжатия независимо от движения фронта элюента.

где w_R – средняя относительная скорость движения зон.
 Оптимальное число ступеней хроматографирования:

$$n_{opt} = -\frac{1}{\ln(1-w_R)} \quad (50)$$

Максимальное разделение двух зон:

$$\Delta X_{n,opt} = n(1-w_R)^{\bar{n}-1} \Delta w_R \quad (51)$$

где Δw_R – разница средних скоростей движения двух зон.

Применение пластин для ВЭТСХ при МТСХ позволяет оптимизировать разделение сложных смесей, так как дает возможность уменьшить длину пробега и время в каждом цикле. Комбинация МТСХ и испарительной ТСХ позволила создать инструментальный метод ТСХ высокого разрешения МТСХ (ПМТСХ). Это повторяющаяся ТСХ в одном элюенте в одном направлении с постепенно увеличивающимися расстояниями пробега элюента. Между циклами растворитель удаляют с пластины испарением, проводящимся под автоматическим контролем, не прерывая ее контакта с элюентом (рис. 26).

При МТСХ сжатие зон происходит дважды: при пересечении ее с фронтом элюента (поджимается нижняя граница зоны) и за счет медленного его отступления при испарении, при этом верхняя граница зоны не движется или движется вниз, а нижняя продолжает двигаться вверх, пока фронт не остановится. В результате зона сильно

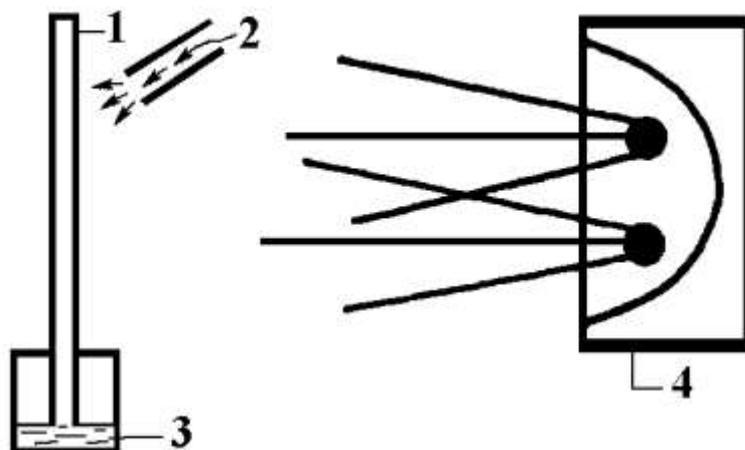


Рис.26. Схема многократной ТСХ с программированием подачи элюента на пластину: 1 – пластина, 2 – инертный газ, 3 – элюент, 4 – рефлектор для высушивания пластины

сжимается при увеличении циклов, что существенно увеличивает эффективность хроматографирования.

Двумерная ТСХ

При двумерной ТСХ (ДТСХ) пробу наносят в левый угол пластины на расстоянии 1 – 1.5 см от каждой из сторон и хроматографируют в двух взаимно перпендикулярных направлениях в разных элюентах с промежуточным высушиванием.

При отсутствии корреляции между коэффициентами распределения в обоих элюентах пиковая емкость в одномерной ТСХ увеличивается до n^2 в двумерном варианте. Таким образом, гипотетически на пластине 6 x 6 см можно в принципе разделить смесь из 50 и более компонентов (в реальных условиях меньше). Могут быть различные варианты ДТСХ. При использовании двухфазных пластин (с обращенной и прямой фазами) разделение компонентов смеси может происходить по разным механизмам в разных направлениях элюирования. Можно изменять свойства сорбента после ТСХ в первом направлении, например пропиткой различными реагентами (комплексообразователи, AgNO_3 и др.). После ТСХ в первом направлении можно изменить свойства разделяемых компонентов смеси с помощью химических реакций на пластине (окисление, восстановление, дериватизация). Выбор того или иного приема определяется особенностями хроматографируемых систем.

Градиентная ТСХ

По сравнению с обычными условиями хроматографирования использование различных видов градиента позволяет значительно улучшить разделение анализируемой смеси и расширяет возможности этого метода. В тонкослойной хроматографии наиболее часто используются несколько типов градиента.

Градиент подвижной фазы может быть вызван изменением концентрации элюирующего раствора (градиент концентрации), изменением полярности элюирующих растворов (градиент полярности), изменением рН в процессе хроматографирования (градиент рН).

Градиент неподвижной фазы может быть вызван изменением структуры и состава применяемых сорбентов; введением в сорбент разной концентрации импрегнирующего вещества; изменением характера активности сорбента (градиент активности).

Градиент среды может быть обусловлен изменением температуры, толщины слоя сорбента, летучести растворителей при хроматографировании, влажности камеры, а также некоторыми другими факторами.

Градиентные условия возможны в круговой и антикруговой, испарительной и многократной ТСХ за счет градиента скорости элюента.

ТСХ с принудительным движением элюента

Ограничением всех методов ТСХ, движение элюента в которых происходит за счет капиллярных сил, является невозможность реализации высоких эффективностей ($N > 5000$ т.т.) в одномерном варианте. Методы с принудительным движением элюента позволяют снять эти ограничения.

Наиболее широко используют метод *ТСХ под давлением* (ТСХД, OPLC), разработанный Тийхаком с сотрудниками. В камерах для ТСХД можно проводить сэндвич-, круговую, треугольную, антикруговую, двумерную, линейную в одном и двух направлениях, а также аналитическую и препаративную одномерную ТСХ при низком, среднем и высоком давлении на пластинах разного размера на разных подложках, покрытых сорбентом с малым диаметром частиц (< 5 мкм). При этом можно применять элюенты с высокой вязкостью.

Преимуществами метода ТСХ под давлением являются:

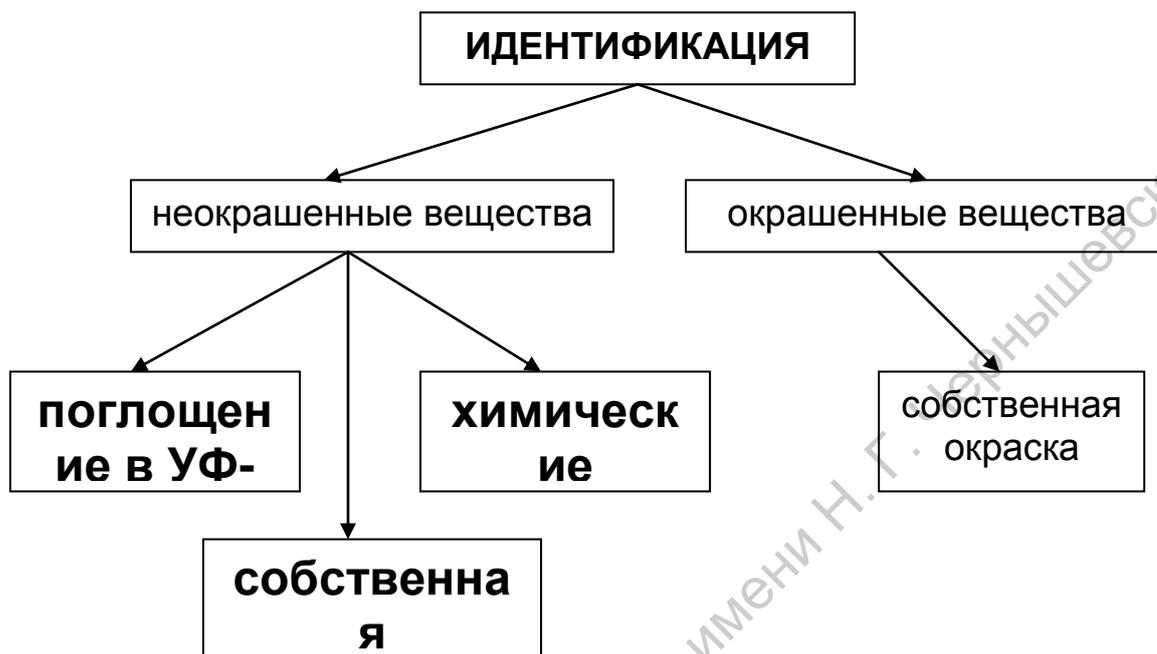
- автоматизация метода;
- параллельное, быстрое и эффективное разделение большого числа проб;
- возможность элюирования на большие расстояния при использовании сорбента с малым диаметром зерна и вязких элюентов при одновременном сокращении времени анализа;
- легкая реализация проточной ТСХ;
- возможность очистки пластин током элюента;
- моделирование условий ВЭТСХ;
- возможность препаративного выделения.

Особенно важно, что в этом варианте ТСХ можно использовать сорбент с малым диаметром частиц сорбента с элюированием на расстояние 8 – 11 см. Процесс разделения можно наблюдать с помощью УФ-ламп. Время разделения – 1 – 1.5 минуты на образец.

Рассмотренные способы хроматографии в тонких слоях необходимо оценивать с точки зрения простоты и быстроты их выполнения и тех результатов, которые можно с их помощью получить. В этом отношении наибольшее распространение получил метод линейной восходящей хроматографии. Нисходящая хроматография применяется гораздо реже, требует специального устройства, сравнительно сложна, трудоемка и поэтому не имеет каких-либо преимуществ перед восходящей хроматографией. Горизонтальная круговая хроматография используется также редко, обычно для быстрого подбора необходимого растворителя. Определенный интерес представляет хроматография с непрерывным испарением растворителя. При помощи этого метода удастся проводить разделение соединений с весьма близкими значениями R_f .

Применение метода градиентной хроматографии в значительной мере расширяет возможности хроматографии в тонких слоях. Однако следует отметить, что этот метод более сложен и требует специального аппаратного оформления. Наиболее перспективен метод ТСХ под давлением, который пока мало распространен из-за достаточно высокой стоимости оборудования.

Глава 6. ПРОЯВЛЕНИЕ ХРОМАТОГРАММ И СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ ТСХ



Идентификация по регистрации поглощения веществ в УФ-области или их собственной флуоресценции основана на введении в слой адсорбента флуоресцентных индикаторов (люминофоров), которые при облучении УФ-светом возбуждаются при такой длине волны, при которой детектируемые вещества поглощают. При этом, они становятся хорошо видны в виде темных зон на зеленоватом светящемся фоне сорбента. Выпускаются пластины с флуоресцентными индикаторами $\lambda = 254$ и 365 нм.

Одним из наиболее чувствительных является способ детектирования, в котором наблюдают собственную флуоресценцию вещества при облучении пластин УФ-светом соответствующей длины волны. Имеются специальные средства, усиливающие флуоресценцию некоторых веществ. Многие вещества, не флуоресцирующие и не фосфоресцирующие в УФ-свете при комнатной температуре, становятся видимыми при температуре жидкого азота.

При детектировании с помощью химических реагентов в качестве универсальных проявляющих реагентов используют концентрированные кислоты, в первую очередь – серную кислоту. После опрыскивания пластин некоторые соединения видны на холоду, многие проявляются после нагревания при разных температурах. Для обнаружения химически инертных соединений к серной кислоте добавляют 5% азотную кислоту или окислители (KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Широко применяют в ТСХ пары иода, особенно для обнаружения

непредельных органических веществ. Опрыскивание пластин обычно проводят метанольным раствором иода.

Многочисленную группу составляют *специфические реагенты* на индивидуальные соединения и отдельные классы соединений, растворами которых также опрыскивают пластину. Особенностью ТСХ является возможность последовательного использования нескольких реагентов для детектирования разных классов соединений или соединений с разными функциональными группами (таблица 14).

Для опрыскивания пластин применяют пульверизаторы разной конструкции или коммерческие препараты реагентов в аэрозольной упаковке. Точность количественных определений сильно зависит от качества и воспроизводимости детектирования, в особенности при опрыскивании хроматограмм.

Широко используют в ТСХ предварительную или пост-дериватизацию исследуемых соединений, основанную на получении производных определяемых веществ. Целью дериватизации является повышение чувствительности анализа за счет введения хромофоров или флуорофоров в молекулы исследуемых соединений. Предварительная хроматографическая дериватизация может повысить специфичность разделения компонентов смеси, увеличить их стабильность, изменить адсорбционную активность, улучшить растворимость или другие свойства анализируемых веществ. Однако эта стадия является дополнительной в хроматографическом процессе; она может быть достаточно трудоемкой и длительной.

Таблица 14

Реагенты для обнаружения и идентификации органических соединений в ТСХ

Реагент	Обнаруживаемые соединения	Окраска пятен
10 %-ный раствор бихромата натрия в 50 %-ной серной кислоте	Органические кислоты	Светло-голубая на оранжевом фоне
10 %-ный спиртовой раствор фосфатно-молибденовой кислоты	Органические кислоты, фенолы	Темно-голубая на желтом фоне
0.25 %-ный раствор родамина Б в этаноле	Органические кислоты	Розово-лиловая
5 %-ный раствор хлорного железа в метаноле	Фенолы	Темные пятна на белом фоне
Пары иода	Многие органические соединения	Коричневая на бледно-желтом фоне
Раствор 50 мг флуоресцеината натрия в 100 мл 50 %-ного метанола	Ароматические и гетероциклические соединения	Флуоресцирующие пятна, обнаруживаемые при помощи

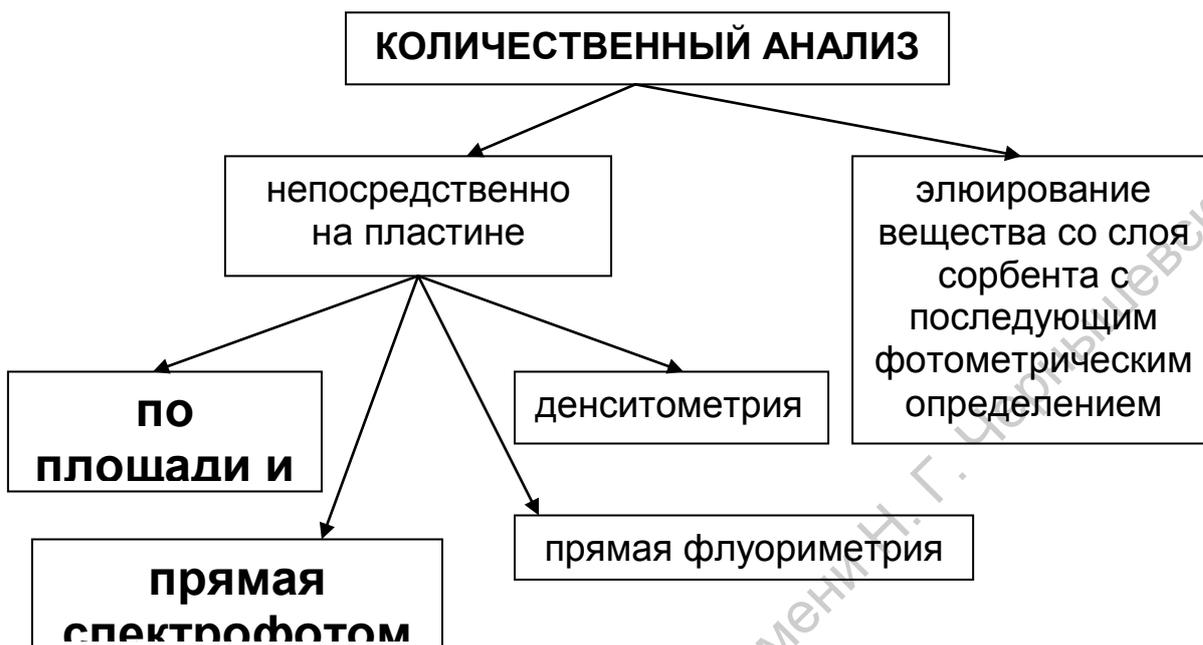
		кварцевой лампы
--	--	-----------------

Пост-хроматографическая дериватизация – это практически также метод детектирования уже разделенных компонентов. Преимущество этого метода в том, что дериватизация всех компонентов пробы происходит одновременно и не влияет на хроматографическое разделение химически близких веществ.

Дополнительным способом идентификации веществ является определение R_f разделенных соединений и сравнение их с R_f стандартных образцов, хроматографируемых в тех же условиях. Его можно использовать вместе со специфическими реагентами и определением структуры веществ независимым методом, например ИК-спектроскопией.

Новые возможности для идентификации многокомпонентных смесей дает спектроденситометрический метод, который позволяет получить информацию как о качественном, так и количественном составе пробы на основании электронных спектров диффузионного отражения. По полученным спектрам выбирают оптимальную длину волны для количественного определения исследуемых соединений.

Глава 7. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ В ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ



7.1. Методы определения анализируемых соединений непосредственно на пластине

Определение площади пятна. Простейшим способом площадь пятна измеряют при помощи планиметра или миллиметровой бумаги. Предварительно для ее оценки строят градуировочный график. Зависимость между площадью пятна и логарифмом количества искомого вещества выражается уравнением:

$$\sqrt{Q} = a \lg g + b \quad (52) \quad ,$$

где g - количество вещества, Q - площадь пятна, a и b - константы. Эта зависимость справедлива при содержании вещества в пятне от 1 до 80 мкг.

Другим вариантом является *метод внутреннего стандарта*. При этом готовят три раствора: 1) с известной концентрацией определяемого вещества; 2) разбавленный в 10 раз первый раствор; 3) второй раствор с добавлением определенного количества стандарта. Эти растворы в равных стандартных объемах наносят на пластину, и после проведения ТСХ определяют количество неизвестного образца по формуле:

$$\lg \left[\frac{(q_x d + q)}{q_x} \right] = \left[\frac{(\sqrt{\tilde{S}_x + S} - \sqrt{S_x})}{(\sqrt{S_x} + \sqrt{\tilde{S}_x})} \right] \lg d \quad (53) ,$$

где q_x – масса раствора с неизвестной концентрацией,
 q – масса раствора с неизвестной концентрацией, разбавленного в 10 раз,
 d – масса разбавленного раствора с добавлением определенного количества стандарта,
 S_x – площадь пятна неизвестного образца,
 \tilde{S}_x – площадь пятна неизвестного образца в разбавленном растворе,
 S – площадь пятна стандартного образца с известной концентрацией.

В дополнение к методам, основанным на измерении площади пятна, существуют способы количественной оценки соединений *по размерам пятен*. В этих способах учитывают только ширину и длину пятен или максимальный и минимальный диаметры пятен и оптическую плотность в центре пятна. Расчет проводят по формуле:

$$g = K \cdot A \cdot D \cdot d \quad (54) ,$$

где g – масса определяемого вещества,
 K – коэффициент пропорциональности,
 A – оптическая плотность в центре пятна,
 D и d – максимальный и минимальный диаметры пятна.

Способ имеет высокую чувствительность, позволяя определять до 10^{-11} - 10^{-9} г вещества. Он основан на допущении, что максимум оптической плотности в центре пятна прямо пропорционален количеству определяемого вещества. Для расчета результатов по этому методу необходим спектрофотометр, соединенный с источником света и микроскопом. Следует отметить, что использование специальной аппаратуры существенно повышает чувствительность, уменьшает погрешность, но увеличивает сложность метода и стоимость аппаратуры.

Предел допустимой погрешности, в методе измерения площади или размера пятна достигает 20 %. На величину погрешности оказывает влияние неравномерность распределения вещества в пятне и некоторые другие причины.

Денситометрический метод связан с определением интенсивности проходящего или отраженного света, падающего на пластинку. Этот метод требует применения специальных приборов –

денситометров или спектроденситометров. Между количеством определяемого вещества, величиной и интенсивностью окраски пятна должна быть линейная зависимость. Существенное значение при денситометрии имеет равномерная окраска пятен, стандартизация условий хроматографирования, соответствие размеров пятен ширине щели денситометра и т.д.

Достоинства метода заключаются в быстроте измерений, отсутствии каких-либо дополнительных операций, которые могут привести к загрязнению или потере вещества, достаточно хорошей точности метода. К недостаткам относятся - необходимость строгого соблюдения требований к подготовке хроматографируемых веществ и гарантия постоянства качества пластин ТСХ, поскольку воспроизводимость результатов в значительной степени зависит от характера и интенсивности окраски пятна. На результат определения также влияет тип прибора, используемого для измерения сигнала. Кроме перечисленных причин, погрешность определения зависит также от толщины и влажности сорбента на пластинке, свойств связующего материала, растворителей и ряда других факторов.

Прямая спектрофотометрия на пластинках - быстрый и чувствительный метод количественной оценки в ТСХ. Следует отметить, что для этого метода необходимы специальные спектрофотометры, желательно с автоматическим отсчетом измерений. В современных спектрофотометрах измерения такого типа могут проводиться как по пропусканию, так и отражению света.

Пластинки, подвергаемые фотометрированию, помещают горизонтально на специальную подставку, которая может передвигаться с постоянной скоростью по направлению к щели, пропускающей свет определенной длины волны на слой сорбента на пластинке.

Прямая флуориметрия на пластинках. Метод основан на измерении как самой флуоресценции, так и ее тушения. Для измерения флуоресценции исследуемого вещества на пластинке применяют специальные приборы - флуориметры. В последнее время начинают использовать аппараты, сочетающие флуориметрический метод определения с техникой денситометрии - флуороденситометры, обеспечивающие непосредственную флуориметрическую оценку результатов хроматографии в тонких слоях.

Погрешность количественного определения с применением перечисленных методов не превышает 10 %.

7.2. Количественная хроматография в тонких слоях с использованием элюирования

Метод количественного переноса пятна сорбента, содержащего разделяемый компонент смеси, с пластинки в приемник с

последующим элюированием вещества довольно широко применяется в ТСХ. Суть его в том, что по окончании хроматографического процесса и проявления пятен, их вместе с адсорбентом последовательно и количественно переносят в приемник. Затем каждое вещество вымывают с адсорбента соответствующим растворителем, разбавляют до постоянного объема, центрифугируют и переносят в кювету для измерения оптической плотности.

При применении этого метода необходимо учитывать ряд факторов, которые могут вызвать ошибки:

- чистота сорбента, поскольку примеси, содержащиеся в нем, могут оказать влияние на результат фотометрического определения;
- качество адсорбционных слоев - они должны быть однородными и по возможности плотными;
- растворители, применяемые в ТСХ, не должны содержать примеси;
- неодинаковый объем проб вещества, наносимого на пластинку с адсорбентом;
- повреждение поверхностного слоя адсорбента;
- неполное элюирование анализируемых соединений.

Присутствие добавок к адсорбенту, при их переводе в элюирующий раствор, также может быть причиной дополнительных ошибок.

Ошибки, возникающие при переносе сорбента с веществом, обычно зависят от метода измерения аналитического сигнала и составляют для спектрофотометрии 4 - 6 %, для флуориметрии – 4 - 9 %, в некоторых случаях 15 %.

Одним из вариантов метода является *препаративная ТСХ*, используемая для разделения сравнительно больших количеств вещества. Самая ответственная операция в данном случае - перенос вещества сорбента с пластинки в приемник. По первому способу пятно с веществом соскабливают в приемник и элюируют. Второй способ основан на использовании вакуум-перегонки. Для этого участок сорбента, подлежащий переносу, предварительно обводят кончиком иглы. Затем стеклянный аспиратор или воронку с пористым фильтром одним концом подключают к водоструйному насосу, а другим концом с насаженной узкой трубкой, согнутой под углом, собирают участок сорбента с пятном. Для летучих соединений можно применять отгонку в вакууме при нагревании. Предложено также использовать промывание хроматограмм растворителем. Растворитель, перемещаясь по пластинке, элюирует нанесенное на пластинку вещество, которое собирают.

Преимущества препаративной ТСХ по сравнению с колоночной хроматографией заключаются в быстроте выполнения операции, небольших объемах используемых растворителей, возможности

быстрого подбора системы растворителей, четкости и быстроте определения хроматографических зон, сравнительно легкого выделения сорбированных компонентов. К недостаткам относится сравнительно малое количество получаемого индивидуального вещества.

7.3. Перенос результатов ТСХ-разделений на варианты колоночной жидкостной хроматографии

Весьма интересные перспективы открываются при использовании метода ТСХ в сочетании с различными другими методами и способами разделения и идентификации соединений. Так, хорошие результаты дает сочетание методов тонкослойной и колоночной хроматографии (КЖХ), так называемая пилот-техника. Благодаря быстроте определения исследуемых компонентов, экономичности, наглядности ТСХ может быть использована для предварительного подбора и оценки сорбентов, элюирующих растворов - растворителей, а также для выбора условий работы с последующим применением их в колоночной хроматографии. В том случае, если сорбент и растворители в ТСХ и КЖХ одинаковы, а разделение компонентов осуществляется по одним и тем же механизмам, возможен перенос результатов ТСХ на КЖХ.

Связь между основными параметрами удерживания в обоих методах дает уравнение переноса, предложенное Гейссом и Шлиттем:

$$\frac{V_s}{V_m} = K'_{\text{КЖХ}} = K_{\text{пер}} \left[\frac{1}{(R'_f)_{\text{ТСХ}}} - 1 \right] \quad (55) ,$$

где V_s – чистый удерживаемый объем;

V_m – мертвый объем колонки;

$K_{\text{пер}}$ – коэффициент переноса;

$K'_{\text{КЖХ}}$ – фактор (коэффициент) емкости в колоночной хроматографии;

$R'_{f \text{ ТСХ}}$ – подвижность вещества в методе ТСХ.

Общий удерживаемый объем может быть рассчитан по формуле:

$$V_m + S = V_m (1 + K_{\text{КЖХ}}) \quad (56)$$

Коэффициент переноса (поправочный коэффициент), учитывающий различную плотность заполнения колонки и плотность сорбента на пластинке, определяется соотношением:

$$K_{\text{пер}} = \frac{\left(\frac{W_a}{V_m} \right)_{\text{КЖХ}}}{\left(\frac{W_a}{V_m} \right)_{\text{ТСХ}}} \quad (57) ,$$

где W_a – масса сорбента.

Расчет $K_{\text{пер}}$ по уравнению (57) является довольно трудоемким, поэтому на практике больше пользуются уравнением:

$$K_{\text{пер}} = \frac{K'_k}{K'_n} \quad (58) ,$$

где K'_k и K'_n – факторы емкости сорбента в колонке и на пластинке. K'_k и K'_n можно рассчитать по уравнениям:

$$K'_k = \frac{V_s}{V_m} \quad (59)$$

$$K'_n = \left[\frac{1}{R_{f \text{набл}}} - 1 \right] \quad (60)$$

ТСХ иногда сочетают и с газовой хроматографией. В этом случае ТСХ может быть использована в качестве дополнительного метода для оценки и идентификации хроматографических пиков, получающихся при газо-жидкостной хроматографии.

Интересные результаты получены при сочетании ТСХ с электрофорезом и радиоизотопным методом. Высокая чувствительность радиоизотопного метода удачно сочетается с большой избирательностью ТСХ. Для обнаружения радиоактивных веществ на пластинке чаще всего используют метод

радиоавтографии. Кроме того, была предложена комбинация хроматографической камеры со счетчиком Гейгера-Мюллера в качестве детектора для счета радиоактивных частиц при анализе радиоактивных соединений на тонкослойных хроматограммах.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Глава 8. СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ТСХ

8.1. Высокоэффективная ТСХ

Высокоэффективный вариант ТСХ появился в середине 70-х годов 20 столетия. Основное отличие ВЭТСХ от ТСХ состоит в применении пластинок, частицы сорбента которых имеют меньший диаметр и более узкое распределение их по размерам (рис.27).

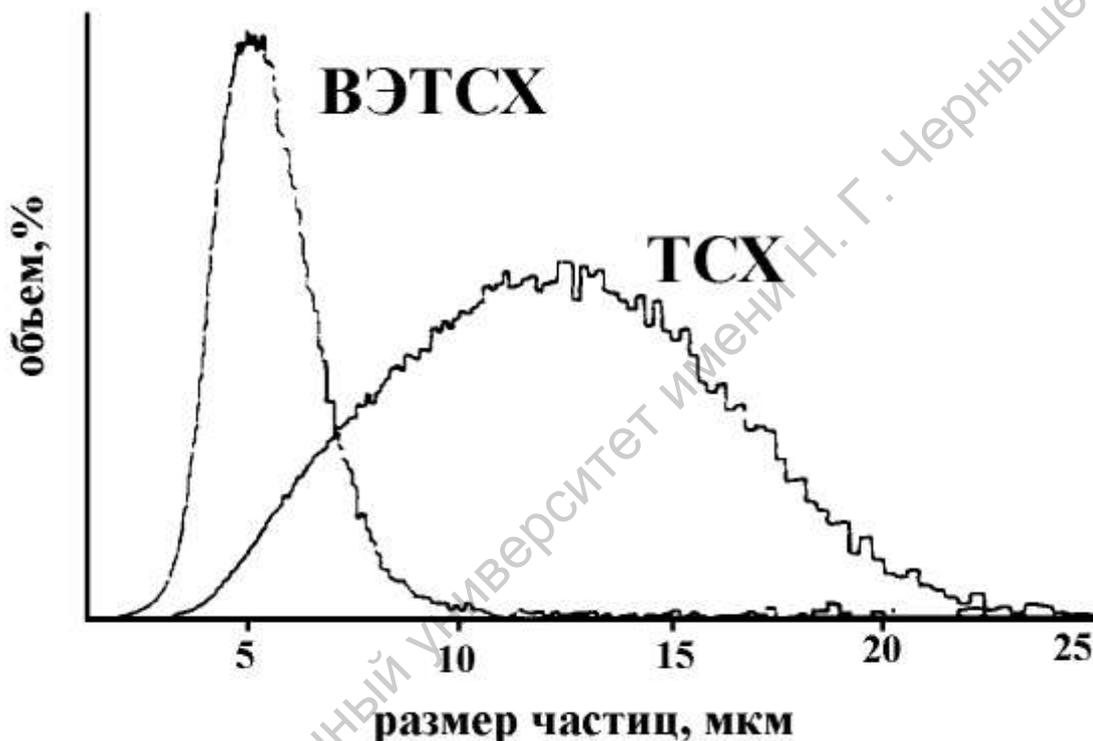


Рис.27. Типичное распределение частиц по размерам (массовое распределение) сорбента. Силикагель 60 для ТСХ и ВЭТСХ

Существует определенное соотношение между средним размером частиц сорбента, длиной хроматографируемой зоны и её емкостью. При использовании пластинок для высокоэффективной ТСХ с размером зерен 3 - 5 мкм зоны получаются более компактными, а длина миграции фронта растворителя обычно не превышает 5-6 см, что удобно для детектирования пятен методом сканирующей денситометрии.

Появление ВЭТСХ позволило снизить высоту теоретической тарелки H со 100 до 2 мкм. Слой сорбента пластинок в ВЭТСХ имеет меньшую толщину и его поверхность более однородна, чем у пластинок ТСХ. За счет этого снизился фоновый шум и менее трудоемкой стала калибровка, предшествующая количественному анализу.

Повышенная эффективность слоя нового поколения пластинок привела к меньшему размыванию хроматографических зон и, следовательно, к более высокой селективности и чувствительности обнаружения разделяемых веществ. Однако на мелкозернистых слоях разделение более медленное, что и является причиной уменьшения длины пробега элюента. В обычном варианте ТСХ с потоком элюента, движущимся под действием капиллярных сил, оптимальной разрешающей способности удается достичь на относительно длинных пластинках (10-15 см) с однородным слоем достаточно крупных частиц сорбента (10-15 мкм). Поэтому ТСХ целесообразно использовать для быстрых и несложных разделений. ВЭТСХ лучше применять при сложных разделениях, когда временной фактор не является основным. В ряде случаев ВЭТСХ эквивалентна по числу возможных анализируемых веществ хроматографической колонке эффективностью до 20 – 50 тыс. теоретических тарелок. В таблице 15 кратко перечислены некоторые типичные особенности двух поколений пластинок для тонкослойной хроматографии.

Таблица 15

Сопоставление характеристик пластинок для ТСХ и ВЭТСХ.

Параметр	Пластинки для обычного варианта ТСХ	Пластинки для ВЭТСХ
Размер пластинки, см	20x20, 15x15	10x10
Наносимый объем образца, мкл	1-5	0,1-0,2
Диаметр пятна на старте, мм	3-6	Не более 1
Диаметр разделившихся пятен, мм	6-15	2-5
Путь, проходимый фронтом растворителя (Z_f), см	10-15	3-6
Пределы обнаружения: по поглощению света, нг по флуоресценции, нг	≈ 1 $\approx 0,006$	0,1 0,001

8.2. ТСХ с управляемой газовой фазой (ТСХ-УГФ)

Метод тонкослойной хроматографии с управляемой газовой фазой (ТСХ-УГФ) появился в начале 2000-ых годов XXI столетия.

Метод ТСХ-УГФ основан на направленном изменении в динамическом режиме физико-химических свойств хроматографической системы в результате контакта пластинки, содержащей разделяемые соединения, с газовой фазой определенного химического состава, создаваемой в хроматографической камере. Активную газовую фазу получают либо

пропусканием газа через хроматографическую камеру, либо при образовании паров растворителя, находящегося в другом отделении камеры. Управление составом газовой фазы позволяет программировать состав и свойства подвижной фазы непосредственно в процессе разделения за счет абсорбции и адсорбции вводимого газа подвижной и неподвижной фазами. В существующих вариантах ТСХ изменять состав ПФ можно было только после остановки хроматографирования и замены предыдущего элюента новой смесью растворителя. Число таких замен могла быть не более 2-3, процесс терял преимущество в экспрессности. В методе ТСХ-УГФ адсорбция газа и изменение химических свойств ПФ протекает в аналитическом режиме во времени, что позволяет использовать различие в протолитических и сольватационных свойствах сорбатов для разделенного во времени изменения их химических форм и, следовательно, соответствующих сорбционных равновесий. Следствием указанных процессов является изменение селективности и эффективности разделения компонентов.

8.3. Другие варианты современной ТСХ

Характерными чертами современной ТСХ являются использование более совершенных сорбционных слоев (меньший размер частиц сорбента и уменьшение распределения частиц по размерам) (Рис. 27), что способствует более быстрому и эффективному разделению смесей. Другое направление связано с расширением ассортимента сорбционных свойств сорбентов, позволяющее оптимизировать селективность разделения. Третье направление – это инструментализация и автоматизация метода на всех стадиях анализа: при нанесении пятен, их хроматографировании, детектировании, регистрации аналитического сигнала непосредственно на пластинке и количественной обработке хроматограмм. Следствием инструментализации является переход на использование ТСХ для *количественного* определения веществ. Появились также устройства, позволяющие сочетать разделение методами ТСХ и ВЭЖХ в едином аналитическом цикле.

Сорбенты для ТСХ достаточно полно описаны в главе 2. Наряду с традиционными сорбентами все шире используют модифицированные сорбенты (например, неорганическими солями, органическими реагентами или полимерами) со специфическими свойствами или неорганические ионообменные сорбенты (TiO_2 , ZrO_2). Новым сорбентом является хитозан – аминированный аналог целлюлозы.

Для *подготовки пробы* при проведении ТСХ нашли применение готовые пластинки с двухфазным слоем. Анализируемый раствор наносят на слой предварительного концентрирования, а сам процесс

разделения проходит на основном слое. Для исключения мешающих компонентов пробы предварительно очищают экстракцией, осаждением, электрофорезом и затем концентрируют. Иногда селективную очистку проводят на специально разработанных фазах, обладающих и липофильными и ионообменными свойствами. Сочетание ТСХ с твердофазной экстракцией позволило автоматизировать процедуру пробоподготовки и повысить чувствительность определений методом ТСХ. Оборудование для комбинации ТСХ и пробоподготовки выпускают фирмы Merk, Zymark, Tescan.

Автоматизированное нанесение проб в виде круга или полосок и использование специальных дозаторов в сочетании с денситометрией позволило резко улучшить воспроизводимость результатов анализа, снизив погрешность определения до 2-3%. Улучшают воспроизводимость и специальные устройства для насыщения слоя сорбента парами подвижной фазы.

Повышению эффективности метода ТСХ способствует применение целого ряда *методических приемов*: градиентное, многократное, двумерное элюирование, непрерывное элюирование с управляемым потоком элюента, проведение хроматографического процесса под давлением, концентрирование зон на пластинках и т.д. Вместо пластин иногда используют покрытые сорбентом стержни, которые после хроматографического разделения вводят в атомизатор спектрального прибора.

Наибольший эффект дало применение новых способов элюирования, которые привели, фактически, к разработке новых инструментальных методов ТСХ. Одним из таких приемов является *проточная ТСХ* (ПТСХ). В этом методе проба вводится в поток элюента, находящийся в равновесии с сорбентом. Компоненты пробы, двигаясь от точки ввода к зоне испарения элюента, пересекают зону детектирования вещества денситометром и «сами себя» сканируют. Пластинки в ПТСХ, в отличие от обычной ТСХ, используют многократно (до сотни раз). Разработана конструкция прибора для ПТСХ.

Достаточно хорошо известным способом является тонкослойная хроматография *под давлением*, реализованная в различном аппаратном оформлении. Первоначально её называли Overpressured layer chromatography (OPLC), затем персональной OPLC, а позднее – Optimum performance laminar chromatography (OPLC). Прибор для проведения анализа включает несколько модулей. Первым модулем является разделительная камера, имеющая кассетную конструкцию. Второй модуль – управляемая компьютером система подачи жидкости, включающая гидравлическую систему и систему подачи элюента. Используется однократное или трехступенчатое градиентное элюирование. Такой вид

хроматографии, основанный на принудительной подаче элюента, получил также название forced flow ТСХ.

Возможно как аналитическое, так и препаративное использование прибора, который, фактически, напоминает прибор для ВЭЖХ, где вместо колонки используется пластинка. Вследствие высокого внешнего давления в камере для хроматографирования характеристики эффективности разделения методом OPLC намного лучше, а время разделения меньше, чем в обычной ТСХ. На базе комбинации этого метода с биоавтографией создан прибор «БиоАрена» для изучения биохимических процессов в живом организме. Все приборы этого типа выпускает фирма CAMAG.

Разработаны управляемые компьютером приборы для определения следовых количеств анализа сложных смесей методом автоматизированного многократного хроматографического проявления (Automated Multiply Development, AMD). Образец и стандарты наносят на пластинку ТСХ по специальной программе, затем пластины размещают в камере прибора. Из камеры откачивают воздух для удаления следов растворителей из пробы, заполняют ее азотом и закачивают насосом первую подвижную фазу. Примерно через минуту создают вакуум, удаляют растворитель и пластину сушат. Затем осуществляют второй прогон подвижной фазы и такую операцию повторяют несколько раз. Во время каждого прогона фронт растворителя успевает пройти 1–3 см.

Такой прибор объединяет преимущества ступенчатого и многократного хроматографического проявления с сохранением преимуществ, которое дает градиентное элюирование. При этом, в отличие от градиентной ВЭЖХ, подвижная фаза с максимальной полярностью используется в начале работы. Данный метод позволяет компенсировать размывание хроматографических зон за счет концентрирования веществ в каждом цикле и улучшает разрешение трудноразделяемых компонентов за счет оптимизации селективности растворителя. Такой метод особенно важен для разделения смесей с сильно различающейся полярностью компонентов, когда трудно подобрать нужную систему растворителей.

Постоянно растут возможности детектирования пятен непосредственно на пластинке ТСХ. Наиболее распространены *фотометрический* и *флуоресцентный* детекторы, сканирующие спектр диффузного отражения света или флуоресценции в области 200–800 нм. Требуемую длину волны создают светофильтрами или с помощью монохроматора. Преобразование нелинейной зависимости сигнала от концентрации осуществляется на основе функции Кубелки-Мунка.

Кроме этого для детектирования используют диффузную отражательную ИК-спектроскопию с Фурье-преобразованием (ИК-Фурье-спектроскопию), позволяющую получать информацию о

функциональных группах неизвестных веществ. Однако гораздо более перспективен метод, именуемый SERRS (surface enhanced Raman resonance spectroscopy). Другой метод анализа поверхности – рентгено-флуоресцентный анализ – позволяет характеризовать зоны диаметром 0.1-1 мм с пределом обнаружения 10^{-9} - 10^{-10} грамма.

Перспективными являются сканирующий фотоакустический спектрометр и масс-спектрометр. В масс-спектрометр вводят участок хроматограммы, на котором адсорбировались разделенные вещества. Масс-спектры распыленных ионов разделенных веществ идентичны масс-спектрам индивидуальных соединений, введенных в масс-спектрометр стандартным способом.

Таким образом, наиболее перспективными отечественными и зарубежными разработками для ТСХ можно считать:

- в области сорбентов – создание мелкодисперсных сорбентов, в том числе модифицированных, с узким распределением фракций по размерам зерен;
- в области оборудования – использование автоматизированных устройств для нанесения пробы и детектирования веществ на хроматограммах;
- в области методических приемов – проведение процесса хроматографирования под давлением или в непрерывном потоке элюента;
- в области элюентов – использование организованных сред (мицеллярных, циклодекстриновых) и хиральных элюентов.

ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ СОВРЕМЕННОЙ ТСХ

Новые способы и методические приемы хроматографирования

- автоматическое многократное (техника AMD)
- автоматическое многомерное
- автоматическое градиентное: линейное и кольцевое (рН, полярность ПФ, температура)
- автоматическое непрерывное проточное
- под давлением
- центростремительное (антикруговое)
- круговое
- с концентрированием зон
- изменение конфигурации пластин
- ТСХ с управляемой газовой фазой (ТСХ-УГФ)

Новые сорбенты и пластины для ТСХ

- уменьшение размера зерна и улучшение его однородности (ТСХ 12 ± 8 мкм; ВТСХ 5 ± 2 мкм)
- модификация сорбентов путем ковалентной прививки гидрофобных (RP-2, RP-8, RP-18) групп функциональных ($-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$, диол) хиральных групп
- модификация импрегнированием (соли металлов, органические реагенты, ПАВ)
- динамическая модификация в ПФ, содержащих ПАВ
- новые сорбенты на основе целлюлозы и ее производных (DEAE, сульфэтил-), ионообменников, особенно неорганических (фосфаты Th, Zr, Pt ...)
- смешанные сорбенты
- пластины с несколькими зонами (преадасорбционными, концентрирующими, прямыми и обращенными фазами ...)
- расширение круга связующих материалов

Совершенствование техники работы

- применение автоматических устройств для повышения точности отбора и нанесения проб
- использование специальных хроматографических камер для работы под давлением и в потоке

- использование камер, позволяющих сочетать ТСХ с электрофорезом, твердофазной или сверхкритической флюидной экстракцией, ВЭЖХ
- использование бесфитильного способа подачи элюента
- использование пульверизаторов со сменной форсункой
- хроматографирование в расплавах органических соединений при t° 50-200 $^{\circ}$ C
- использование спецприемов для элюирования пятен с хроматограммы
- ксерокопирование, фотографирование пятен

Автоматизация и расширение способов детектирования

Денситометрия:

- отражательная адсорбционная (УФ/вид)
- флуоресцентная спектроскопия
- ИК-, КР- (SERRS) спектроскопия
- Рентгеновская спектроскопия
- Фотоакустическая спектроскопия
- сканирующая β - или γ -спектроскопия
- масс-спектрометрия

Спектрофотометрия и флуориметрия (для прозрачных подложек)

Электрохимическое детектирование (для проточной ТСХ)

Глава 9. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

Работа 1. Разделение и идентификация дикарбоновых кислот методом ТСХ в водно-органических подвижных фазах

Нанесенные на пластину дикарбоновые кислоты перемещаются по тонкому слою сорбента с различными скоростями. Чем больше молекулярная масса кислоты, тем с большей скоростью перемещаются ее молекулы, на чем и основано разделение. Формулы некоторых дикарбоновых кислот представлены в таблице 1.

Таблица 1. Исследуемые дикарбоновые кислоты

Кислота	Формула
Щавелевая	HOOC-COOH
Янтарная	HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH
Глутаровая	HOOC-(CH ₂) ₃ -COOH
Адипиновая	HOOC-(CH ₂) ₄ -COOH
Себациновая	HOOC-(CH ₂) ₈ -COOH

РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Камера стеклянная для ТСХ диаметром 150 мм, высотой 250 мм из химически стойкого стекла.
2. Пульверизатор для опрыскивания хроматограмм.
3. Сушильный шкаф.
4. Трубки капиллярные стеклянные, диаметром 1.0-1.2 мм.
5. Стандартные этанольные растворы дикарбоновых кислот с массовой долей 0.5%. (см. таблицу)
6. Индикатор бромкрезоловый пурпурный, 0.04%-ный раствор 50% этаноле с подщелачиванием 0.1 М NaOH до pH 10.
7. Пластинки Силуфол, покрытые тонким слоем силикагеля.
8. Подвижная фаза : этанол, аммиак, дистиллированная вода, смешанные в объемном соотношении 100 : 16 : 12.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

В камеру для проведения анализа вставляют полоску фильтровальной бумаги, ширина которой равна высоте камеры. Наливают 45-50 мл подвижной фазы, закрывают камеру стеклом и оставляют в таком состоянии на 1-1,5 часа до полного насыщения парами подвижной фазы.

На хроматографической пластинке карандашом проводят линию старта на расстоянии 20 мм от края. При помощи капилляра на нее

наносят капли стандартных и анализируемых растворов с интервалом 15 мм. Диаметр наносимых капель не должен превышать 3-5 мм.

ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

Пластинку с нанесенными на нее каплями помещают в подготовленную камеру таким образом, чтобы пятна были выше уровня подвижной фазы. Пластинку выдерживают в закрытой камере до тех пор, пока фронт растворителя поднимается на высоту 12 см до линии финиша, нанесенной заранее карандашом. Затем ее вынимают из камеры, высушивают в сушильном шкафу при температуре 110°C в течение 60 мин. до полного удаления подвижной фазы.

После охлаждения пластинку опрыскивают из пульверизатора раствором бромкрезолового пурпурного, подсушивают в шкафу при температуре 80-90°C в течение 3-6 мин. Карандашом отмечают желтые пятна, которые соответствуют положению дикарбоновых кислот.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Для идентификации дикарбоновых кислот рассчитывают значения R_f стандартных растворов кислот и исследуемого вещества, нанесенного на эту же пластинку:

$$R_f = \frac{l}{L}, \text{ где}$$

l – расстояние от линии старта до центра пятна

L - расстояние от линии старта до линии финиша растворителя

Результаты измерений заносят в таблицу 2.

Таблица 2. Результаты хроматографического разделения кислот.

Анализируемая кислота	l	L	R_f
1. Щавелевая			
2. Адипиновая			
3. Янтарная			
4. Себациновая			
5. Глутаровая			
Исследуемое вещество			
Пятно № 1			
Пятно № 2			
Пятно № 3 и т.д.			

На основании данных таблицы 2 делают вывод о качественном составе анализируемой смеси, сравнивая значения R_f пятен смеси и стандартных растворов.

Полученные данные используют для оценки эффективности хроматографического разделения. Рассчитывают высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ), и число теоретических тарелок (N):

$$N = 16 \left(\frac{l}{w} \right)^2, \quad \text{где}$$

l – расстояние от стартовой линии данного вещества до нижней границы пятна, образованного зоной этого вещества,
 w – расстояние от нижней до верхней границы того же пятна.

$$\text{ВЭТТ} = \frac{l}{N} = \frac{w^2}{16l}$$

Работа 2. Разделение смеси геометрических изомеров азобензола методом препаративной адсорбционной ТСХ

РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Пластины для препаративной ТСХ с насыпным слоем оксида алюминия толщиной 1.5 мм.
2. Металлический станок с валиком для приготовления пластин с незакрепленным слоем сорбента.
3. Проявительная камера, специально предназначенная для пластин с незакрепленным слоем сорбента, имеющая лунку для подвижной фазы и кронштейн для удерживания пластины в рабочем положении.
4. Столик с феном для просушки пластин после их проявления.
5. Пипетки объемом 5 мл.
6. Микроаспиратор.
7. Стеклянные фильтры Шотта № 4 (2 шт.).
8. Колбы круглодонные емкостью 25-50 мл.
9. Весы аналитические.
10. Растворители - петролейный эфир (гексан, гептан или циклогексан квалификации х.ч.) и диэтиловый эфир («медицинский»). Требуемые количества растворителей для одного препаративного цикла – 60 и 4 мл соответственно.

Объект хроматографирования – 5% по массе раствор азобензола в петролейном эфире.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

Используя станок, готовят пластину с незакрепленным слоем сорбента (толщина слоя должна составлять ~ 2 мм). На стартовую линию с помощью пипетки наносят 5 мл анализируемого образца (порциями по 0.2 мл) в виде полосы. Образующаяся полоса должна отстоять от боковых сторон пластины и от нижнего края на 15 мм и по ширине не превышать 5 мм.

В лунку проявительной камеры вводят подвижную фазу - петролейный эфир и диэтиловый эфир в соотношении (60 : 4). С помощью полоски фильтровальной бумаги, опущенной в элюент, проводят насыщение проявительной камеры в течение 15-20 минут.

ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

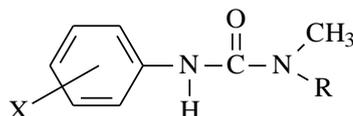
Подготовленную пластинку помещают в проявительную камеру на специальный кронштейн так, чтобы ее нижний край касался подвижной фазы. Закрыв камеру крышкой, наблюдают проявление хроматограммы. После того, как визуально будет зафиксировано

образование двух окрашенных полос *цис*-изомера (нижняя полоса) и *транс*-изомера (верхняя полоса) азобензола, и расстояние между ними составит не менее 1 см, пластину извлекают из камеры и испаряют остатки подвижной фазы.

С помощью микроасpirатора, подключенного к водоструйному насосу, отделяют последовательно полосы сорбента с разделенными изомерами и собирают каждый из них на стеклянные фильтры Шотта. Индивидуальные изомеры азобензола смывают с сорбента тремя порциями (общий объем 10 мл) диэтилового эфира в предварительно взвешенные колбы-приемники. После отсасывания эфира в вакууме водоструйным насосом до образования сухого остатка колбы вновь взвешивают и по разности масс находят количественное соотношение *цис*- и *транс*-изомеров.

Работа 3. Адсорбционное разделение смеси гербицидов методом ТСХ

Гербициды являются химическими средствами обработки растений и применяются при выращивании монокультур, в частности пшеницы. Существует несколько классов гербицидов, общая формула хлорсодержащих гербицидов имеет следующий вид:



Примеры гербицидов этого класса представлены в таблице 1

Таблица 1. Хлорсодержащие гербициды

Вещество	R	X
Монолинурон	-OCH ₃	4 – Cl
Линурон	-OCH ₃	3,4 – Cl
Хлорбромурон	-OCH ₃	3 – Cl, 4 – Br
Бутурон	$\begin{array}{c} \text{—CH—CH}_3 \\ \\ \text{C=CH} \end{array}$	4 - Cl
Небурон	-C ₄ H ₉	3,4 – Cl
Диурон	-CH ₃	3,4 – Cl
Хлорооксурон	-CH ₃	4 – фенокси – 4' - Cl
Метоксурон	-CH ₃	3 – Cl, 4 – OCH ₃

Природа заместителя R в остатке мочевины определяет расположение веществ на хроматограмме.

РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Камера стеклянная для ТСХ диаметром 150 мм, высотой 250 мм из химически стойкого стекла.
2. Капилляры стеклянные, диаметром 1.0-1.2 мм.
3. Исследуемые растворы гербицидов: 10 мг препарата, растворенные в 100 мл ацетона.
4. Подвижная фаза: дихлорметан – метанол (50 : 3).
5. Пластины ТСХ, покрытые слоем кизельгеля 60 F254.
6. Источник УФ-излучения.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

На пластинке карандашом проводят линию старта на расстоянии 15 мм от края. При помощи капилляра на нее наносят капли анализируемого раствора и свидетелей. Диаметр наносимых капель не должен превышать 3-5 мм. На расстоянии 10 см от линии старта наносят линию финиша.

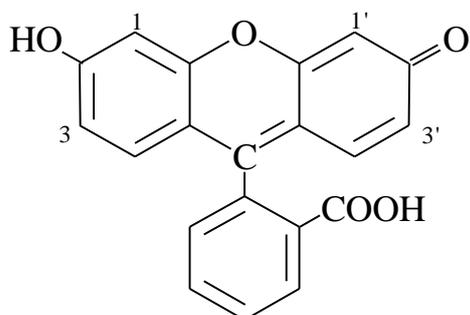
ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

Пластинку с нанесенными на нее каплями помещают в хроматографический стакан, в который предварительно наливают 15-20 мл подвижной фазы. Пластинка должна погружаться в раствор таким образом, чтобы пятна нанесенных реагентов не касались подвижной фазы. Пластинку выдерживают в закрытой камере до тех пор, пока фронт растворителя поднимается до линии финиша. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе до полного удаления подвижной фазы.

Для обнаружения разделенных гербицидов, высушенную пластинку облучают в коротковолновом УФ-диапазоне при $\lambda = 254$ нм.

Работа 4. Сравнение эффективности разделения флуоресцеина и эритрозина в водно-органических и мицеллярных подвижных фазах

Флуоресцеин (Фл) и эритрозин (Эр) являются представителями трифенилметановых реагентов ксантенового ряда. Структурные формулы реагентов имеют следующий вид:



Флуоресцеин - 1,1',3,3' - Н

Эритрозин - 1,1',3,3' - J

РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Стаканы стеклянные для ТСХ из химически стойкого стекла – 2 шт.
2. Капилляры стеклянные, диаметром 1.0-1.2 мм.
3. Водно-спиртовые растворы Фл и Эр концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М.
4. Исходный водный раствор додецилсульфата натрия (ДДС), концентрации 0.3 М.
5. Ацетатно-аммиачный буферный раствор, pH = 10.
6. Мицеллярная подвижная фаза - $2.5 \cdot 10^{-2}$ М раствор ДДС, pH = 10 (соответствующую аликвоту исходного раствора ДДС разбавляют буферным раствором до необходимого объема подвижной фазы).
7. Водно-органическая подвижная фаза – диоксан, 25 %-ный аммиак, изопропанол, смешанные в объемном соотношении 2 : 1 : 1.
8. Пластинки Силуфол, покрытые тонким слоем силикагеля.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

На хроматографических пластинках карандашом проводят линию старта на расстоянии 15 мм от края и линию финиша на расстоянии 10 см от линии старта. При помощи капилляра на линию старта наносят капли анализируемых растворов Фл и Эр. Диаметр наносимых капель не должен превышать 3-5 мм.

ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

В один хроматографический стакан наливают по 15-20 мл мицеллярной подвижной фазы, в другой - водно-органической подвижной фазы. Стакан с водно-органической ПФ закрывают и оставляют на 30 минут для насыщения, мицеллярную ПФ используют без насыщения. Подготовленные пластинки помещают в стаканы таким образом, чтобы пятна были выше уровня элюента. Пластинки выдерживают в закрытых камерах до тех пор, пока фронт растворителя поднимается до линии финиша. Затем их вынимают и высушивают на воздухе до полного удаления подвижной фазы.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Идентификацию реагентов проводят по собственной окраске, обращая внимание на порядок их элюирования в водно-органической и мицеллярной подвижных фазах. Рассчитывают значения R_f по формуле

$$R_f = \frac{l}{L}, \text{ где}$$

l – расстояние от линии старта до центра пятна

L - расстояние от линии старта до линии финиша растворителя

Полученные данные используют для оценки эффективности хроматографического разделения в обеих фазах. Рассчитывают высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ), и число теоретических тарелок (N):

$$N = 16 \left(\frac{l}{w} \right)^2, \text{ где}$$

l – расстояние от стартовой линии данного вещества до нижней границы пятна, образованного зоной этого вещества,

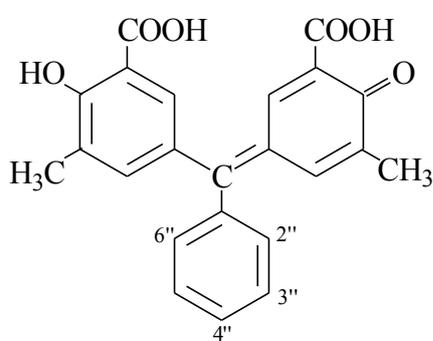
w – расстояние от нижней до верхней границы того же пятна.

$$\text{ВЭТТ} = \frac{l}{N} = \frac{w^2}{16l}$$

Работа 5. Определение степени чистоты фенолкарбоновых кислот на пластинках Плазмахром в подвижных фазах, содержащих додецилсульфат натрия

Фенолкарбоновые кислоты (ФКК) трифенилметанового (ТФМ) ряда широко используются в фотометрическом и титриметрическом методах анализа как индикаторы и хелатообразующие реагенты. Их коммерческие препараты обычно загрязнены примесями несulfированных продуктов и исходных компонентов синтеза. Это затрудняет получение корректных результатов при определении ионов металлов, расчете констант устойчивости, состава хелатов и требует контроля чистоты их препаратов.

Общая формула фенолкарбоновых кислот имеет вид:



Хромазурол S	- 2'', 6'' – Cl, 3'' – SO ₃ H
Эриохромцианин R	- 2'' – SO ₃ H
Эриохромазурол B	- 2'', 6'' – Cl
Сульфохром	- 2'', 4'' – SO ₃ H

РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. стакан стеклянный для ТСХ из химически стойкого стекла.
2. Пульверизатор для опрыскивания хроматограмм.
3. Капилляры стеклянные, диаметром 1.0-1.2 мм.
4. Водные растворы фенолкарбоновых кислот концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М.
5. Хлорид алюминия (III), водный раствор концентрации 0.1 М.
6. Исходный водный раствор додецилсульфата натрия (ДДС), концентрации 0.3 М.
7. Ацетатно-аммиачный буферный раствор, pH = 7.
8. Подвижная фаза - $2.5 \cdot 10^{-2}$ М раствор ДДС, pH = 7 (соответствующую аликвоту исходного раствора ДДС разбавляют буферным раствором до необходимого объема подвижной фазы).
9. Пластинки Плазмахром, покрытые тонким слоем силикагеля с привитой фазой C₃.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

На хроматографической пластинке карандашом проводят линию старта на расстоянии 15 мм от края и линию финиша на расстоянии 10 см от линии старта. При помощи капилляра на линию старта наносят капли анализируемых растворов препаратов ФКК. Диаметр наносимых капель не должен превышать 3-5 мм.

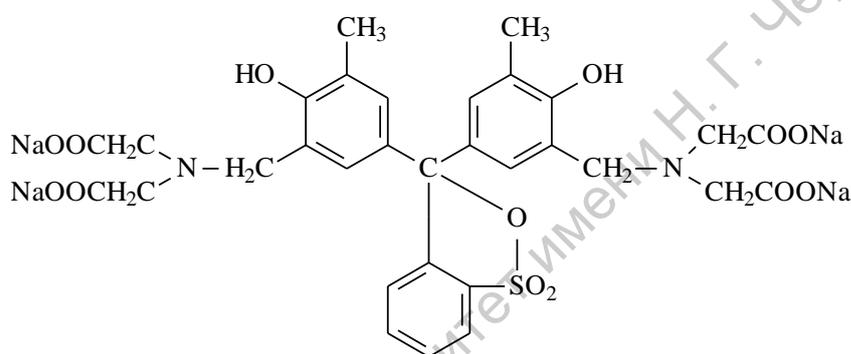
ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

В хроматографический стакан наливают 15-20 мл подвижной фазы и опускают подготовленную пластинку таким образом, чтобы пятна были выше уровня. Пластинку выдерживают в закрытой камере до тех пор, пока фронт растворителя поднимается до линии финиша. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе до полного удаления подвижной фазы.

Опрыскивают из пульверизатора раствором хлорида алюминия (III), подсушивают и карандашом отмечают зоны, окрашенные в фиолетовый цвет, которые соответствуют основному веществу.

Работа 6. Определение степени чистоты препарата ксиленолового оранжевого на пластинках Силуфол в подвижных фазах, содержащих додецилсульфат натрия

Ксиленоловый оранжевый (КО) является представителем органических реагентов класса аминополикарбоновых кислот трифенилметанового ряда и широко используется в титриметрических и фотометрических методах анализа. Коммерческие препараты КО обычно сильно загрязнены побочными продуктами его синтеза, что является причиной плохой воспроизводимости результатов определений металлов. Формула ксиленолового оранжевого имеет вид:



РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Стакан стеклянный для ТСХ из химически стойкого стекла.
2. Пульверизатор для опрыскивания хроматограмм.
3. Капилляры стеклянные, диаметром 1.0-1.2 мм.
4. Водные растворы коммерческого препарата ксиленолового оранжевого, концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М.
5. Серная кислота для проявления хроматограмм, концентрации 1.44 М.
6. Исходный водный раствор додецилсульфата натрия (ДДС), концентрации 0.1 М.
7. Ацетатно-аммиачный буферный раствор, $\text{pH} = 8.8 \pm 0.2$.
8. Подвижная фаза: $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор ДДС, $\text{pH} = 8.8 \pm 0.2$, 2-4 об.% этанола (к аликвоте исходного раствора ДДС добавляют этанол и разбавляют буферным раствором до объема подвижной фазы).
9. Пластинки Силуфол, покрытые тонким слоем силикагеля.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

На пластинке Силуфол карандашом проводят линию старта на расстоянии 15 мм от края. При помощи капилляра на нее наносят капли анализируемого раствора КО. Диаметр наносимых капель не

должен превышать 3-5 мм. На расстоянии 10 см от линии старта наносят линию финиша.

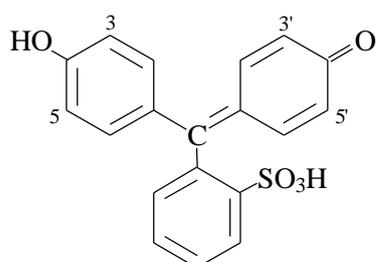
ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

Пластинку с нанесенными на нее каплями помещают в хроматографический стакан, в который предварительно наливают 15-20 мл подвижной фазы. Пластинка должна погружаться в раствор таким образом, чтобы пятна нанесенных реагентов не касались подвижной фазы. Пластинку выдерживают в закрытой камере до тех пор, пока фронт растворителя поднимается до линии финиша. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе до полного удаления подвижной фазы.

Пластину опрыскивают из пульверизатора раствором серной кислоты, подсушивают и карандашом отмечают зону, соответствующую основному веществу (при обработке серной кислотой она из малиновой становится желто-оранжевой).

Работа 7. Расчет коэффициентов распределения сульфопфталеиновых реагентов трифенилметанового ряда в системе вода – мицелла ПАВ.

В работе показана возможность применения мицеллярной ПФ для количественной оценки распределения сульфопфталеиновых реагентов трифенилметанового ряда в системе вода – мицелла ПАВ. Структурные формулы реагентов имеют следующий вид:



Феноловый красный - 3,3',5,5' – H
Бромфеноловый красный - 3,3' – Br, 5,5' – H
Бромфеноловый синий - 3,3',5,5' – Br

РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. стакан стеклянный для ТСХ из химически стойкого стекла – 3 шт.
2. Капилляры стеклянные, диаметром 1.0-1.2 мм.
3. Водно-этанольные (50 об.%) растворы сульфопфталеиновых реагентов, концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М.
4. Исходный водный раствор додецилсульфата натрия, концентрации 0.3 М.
5. Ацетатно-аммиачный буферный раствор, pH = 10.
6. Подвижная фаза: $2.5 \cdot 10^{-2}$, $5.0 \cdot 10^{-2}$, $7.5 \cdot 10^{-2}$ М растворы додецилсульфата натрия, pH = 10 (соответствующие алиquotы исходного раствора додецилсульфата натрия разбавляют буферным раствором до объема подвижной фазы).
7. Пластинки Плазмахром, покрытые тонким слоем силикагеля с привитой фазой C₃.
8. Концентрированный аммиак.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

На хроматографических пластинках карандашом проводят линию старта на расстоянии 15 мм от края и линию финиша на расстоянии 10 см от линии старта. При помощи капилляра на линии старта наносят капли анализируемых растворов препаратов сульфопфталеинов. Диаметр наносимых капель не должен превышать 3-5 мм.

ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

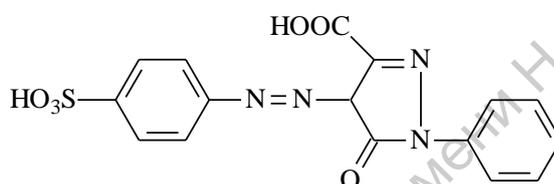
В хроматографические стаканы наливают подвижные фазы объемом 15-20 мл с различной концентрацией додецилсульфата натрия ($2.5 \cdot 10^{-2}$, $5.0 \cdot 10^{-2}$, $7.5 \cdot 10^{-2}$ М) и опускают подготовленные пластинки таким образом, чтобы пятна были выше уровня. Пластинки выдерживают в закрытой камере до тех пор, пока фронт растворителя поднимается до линии финиша. Затем пластинки вынимают из камеры, высушивают на воздухе до полного удаления подвижной фазы. Идентификацию реагентов проводят по собственной окраске или после обработки пластин парами аммиака.

Для расчета коэффициентов распределения получают зависимости подвижности реагентов от мицеллярной концентрации ДДС в подвижной фазе, на основании которых строят графики в координатах $R_f/(1-R_f) = f(C_{\text{ДДС}})$ и рассчитывают величины K_{MW} , K_{SW} , K_{SM} по формулам представленным в разделе 3.2.2.

Работа 8. Количественное фотометрическое определение тартразина в напитках с предварительной идентификацией методом ТСХ

Тартразин широко используется в производстве безалкогольных напитков, кондитерских изделий, сливочного масла, лекарственных препаратов. Он не обладает острой токсичностью, но при большом избытке может проявлять канцерогенные, мутагенные или аллергенные свойства. Рекомендуемые дозировки тартразина лежат в пределах 5-50 мг/л в зависимости вида пищевого продукта. Ежедневно допустимая доза для человека составляет 7.5 мг на 1 кг веса.

Формула тартразина имеет следующий вид:



РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Стакан стеклянный для ТСХ из химически стойкого стекла.
2. Камера с покровным стеклом для импрегнирования неподвижной фазы.
3. Капилляры стеклянные, диаметром 1.0-1.2 мм.
4. 0.2% раствор коммерческого препарата тартразина в этаноле.
5. Исходный метанольный раствор бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ), концентрации 0.1 М.
6. Подвижная фаза: $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор ЦТАБ в смеси вода – метанол (1 : 4).
7. Пластины Плазмахром, покрытые тонким слоем силикагеля с привитой фазой C_3 .
8. Хроматографическая колонка, заполненная полиамидным порошком.
9. 2 М раствор аммиака.
10. Колбы мерные объемом 50 мл.
11. Спектрофотометр СФ-46.
12. Анализируемый напиток, содержащий тартразин.

ПОДГОТОВКА ПЛАСТИН К РАБОТЕ

Для импрегнирования пластины погружают на 1 минуту в 0,1 М исходный метанольный раствор ЦТАБ, затем высушивают на воздухе. На импрегнированной хроматографической пластинке

карандашом проводят линию старта на расстоянии 15 мм от края и линию финиша на расстоянии 10 см от линии старта. При помощи капилляра на линию старта наносят капли анализируемого и стандартного растворов препаратов тартразина. Диаметр наносимых капель не должен превышать 3-5 мм.

ПОДГОТОВКА ОБЪЕКТА

100 мл анализируемого напитка пропускают через хроматографическую колонку, заполненную полиамидом. Получаемый элюент не анализируют. Тартразин вымывают с поверхности сорбента аммиаком до получения бесцветного раствора. Раствор концентрируют до объема 5 мл выпариванием. После охлаждения полученный раствор реагента наносят на линию старта с помощью микрошприца.

ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

В хроматографический стакан наливают 15-20 мл подвижной фазы и опускают подготовленную пластинку таким образом, чтобы пятна были выше уровня. Пластинку выдерживают в закрытой камере до тех пор, пока фронт растворителя поднимается до линии финиша. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе до полного удаления подвижной фазы. Идентификацию тартразина проводят по собственной окраске реагента.

Для количественного определения тартразина слой сорбента тщательно счищают и переносят в приемник. Тартразин вымывают этанолом и подвергают суспензию центрифугированию для отделения сорбента. Кислотность элюента доводят до значения $\text{pH}=6.0 - 6.1$ уксусной кислотой, затем разбавляют до 50 мл. Содержание тартразина определяют по градуировочному графику.

Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика в мерные колбы емкостью 50 мл вносят 2, 4, 5, 10, 20, 30, 40 мл $1 \cdot 10^{-4}$ М (39,1 мг/л) стандартного раствора тартразина и разбавляют до метки дистиллированной водой. В случае необходимости, значение pH полученных растворов предварительно доводят до $\text{pH} = 6.0 - 6.1$. Оптическую плотность измеряют сразу после приготовления растворов на спектрофотометре СФ-64 при $\lambda_{\text{max}} = 426$ нм и $l = 1$ см. По полученным значениям оптической плотности строят градуировочный график.

Работа 9. Количественное определение аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах методом ТСХ

Известно, что между площадью пятна и содержанием анализируемого соединения существует логарифмическая зависимость, которая выражается следующим уравнением:

$$\sqrt{S} = a \cdot \lg q + b$$

где S – площадь хроматографической зоны;
 q – содержание анализируемого вещества;
 a, b – константы.

Данная зависимость справедлива при содержании вещества в пятне от 1 до 80 мкг в пробе.

РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Стандартный раствор аскорбиновой кислоты (5 мг/мл) в 5% уксусной кислоте.
2. Уксусная кислота (70 %).
3. Ацетон.
4. Этанол.
5. Этилацетат.
6. Фармацевтический препарат, содержащий аскорбиновую кислоту.
7. Камера стеклянная для ТСХ.
8. Пластины для ТСХ «Силуфол».
9. Микрошприц.
10. Ступка фарфоровая.
11. Воронка, фильтр бумажный (красная лента).
12. Колба мерная (25 мл).

ПОДГОТОВКА ОБЪЕКТА

К точной навеске фармацевтического препарата, растворенного в порошок, постепенно приливают 5%-ный раствор уксусной кислоты в кратном соотношении к навеске (не менее 3 мл на 1 г навески). После растирания смесь настаивают в ступке в течении 10 мин.

После настаивания, содержимое ступки количественно переносят в мерную колбу емкостью 25 мл. Допускается непосредственное перенесение навесок хорошо растворяющихся объектов в мерную колбу для растворения в ней и настаивания. После этого содержимое колбы перемешивают и фильтруют через фильтр для просветления. Полученные растворы хранят на холоду в темных склянках.

ПОДГОТОВКА ПЛАСТИН К РАБОТЕ

На пластине «Силуфол» карандашом проводят линию старта на расстоянии 15 мм от края. На расстоянии 13 см от линии старта наносят линию финиша.

ПОСТРОЕНИЕ ГРАДУИРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Для построения градуировочного графика на линию старта хроматографической пластины с помощью микрошприца наносят 1, 2, 3, 4, 5, 10 мкл стандартного раствора аскорбиновой кислоты (5 мг/мл) и 1-5 мкл раствора фармпрепарата. Далее пластину помещают в хроматографический стакан, насыщенного парами водно-органического реагента в течении 30 мин. Хроматографирование проводят методом классической восходящей ТСХ до тех пор, пока подвижная фаза (ПФ) не достигнет линии финиша (20-25 мин). В качестве ПФ используют смесь состава: этилацетат – ацетон – уксусная кислота – этанол – вода (5:3:1:1:2). Идентификацию зон проводят визуальным путем после нагревания пластин при 120⁰ С в течении 5-7 мин до появления бурых пятен, соответствующих окисленной форме аскорбиновой кислоты.

После проявления и визуального определения хроматографические зоны обводят карандашом и определяют площадь полученных пятен с помощью миллиметровой бумаги.

Градуировочный график строят в координатах $\sqrt{S} = f(\lg C_{AK})$.

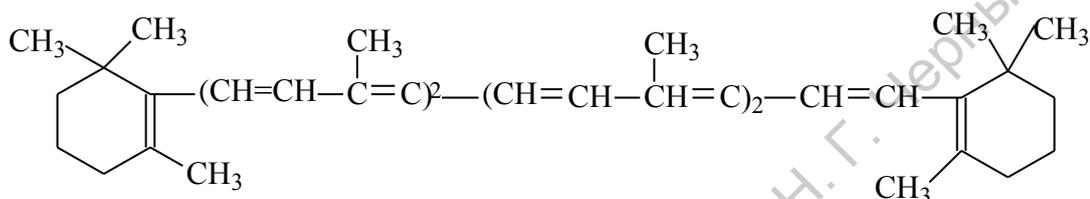
Построенный градуировочный график используют для определения аскорбиновой кислоты в различных фармацевтических препаратах.

Работа 10. Хроматографическое определение каротиноидов в плодах рябины обыкновенной (*Fructus Sorbi*) методом ТСХ

К группе сильно насыщенных углеводородов терпенового характера относятся желтые растительные красящие вещества – каротины.

Каротин $C_{40}H_{56}$ всегда содержится в зеленых листьях, во многих цветах и желтоокрашенных плодах, а также в животном организме (в жире, молоке, сыворотке крови и т.д.).

Структурная формула β -каротина имеет следующий вид:



РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Рябина обыкновенная (сушеная).
2. Хлороформ, ч.д.а.
3. Циклогексан, ч.д.а.
4. Диэтиловый эфир, ч.д.а.
5. Фосфорномолибденовая кислота, 10% этанольный раствор.
6. В-Каротин.
7. Хроматографические пластины «Силуфол».
8. Хроматографический стакан.
9. Колба, вместимостью 25 мл.
10. Воронка стеклянная.
11. Пульверизатор.
12. Капилляры стеклянные.
13. Вата гигроскопическая.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Хроматографическую пластину активируют в течении 5 минут при температуре $105-108^{\circ}C$ и помещают в эксикатор.

1 г измельченных плодов рябины заливают 5 мл хлороформа в колбе вместимостью 25 мл, экстрагируют 1.5 часа, после чего фильтруют и полученное извлечение наносят капилляром на стартовую линию пластины. Пластинку помещают в предварительно насыщенную хроматографическую камеру с системой растворителей циклогексан – эфир (80:20), хроматографирование проводят в течении $\approx 25-30$ мин. (пробег растворителя ≈ 13 см). После этого

хроматограмму высушивают на воздухе. Затем обрабатывают 10%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты в этиловом спирте и нагревают 5-7 мин при температуре 60-70⁰ С. Каротиноиды проявляются в виде пятен синего цвета на желто-зеленом фоне.

После хроматографирования рассчитывают подвижность R_f разделенных компонентов.

$$R_f = \frac{X}{Y}, \text{ где}$$

X – расстояние от стартовой линии до середины пятна, см.

Y – расстояние от стартовой до финишной линии, мм.

Идентификацию каротина проверяют по свидетелю (рисунок).

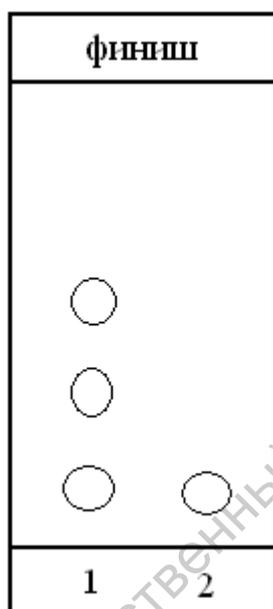
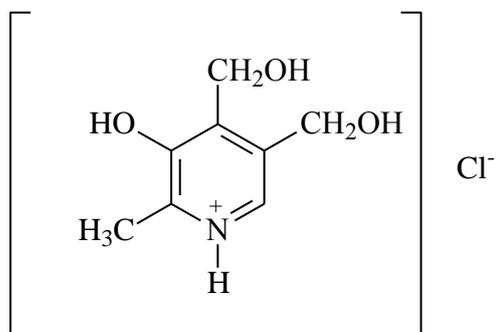


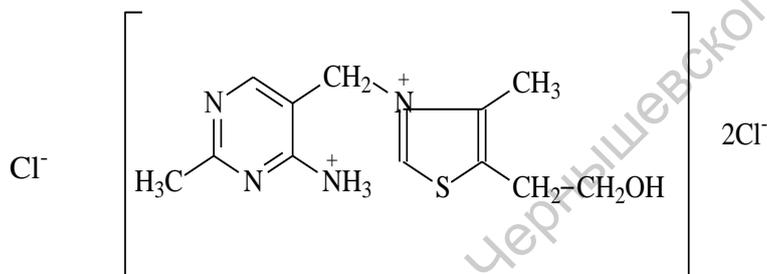
Рисунок. Хроматограмма каротиноидов (1) и β -каротина (2) на пластине Смлуфол с ПФ: циклогексан-эфир (80:20 об.%)

Работа 11. Определение витаминов группы В

Тонкослойная хроматография может быть использована для определения витаминов В₁, В₆ и В₁₂, которые входят в состав многих поливитаминных комплексов. Структурные формулы витаминов В₁ и В₆ представлены ниже:



Витамин В₁



Витамин В₆

РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Препараты В₁, В₆, В₁₂, «Sigma», США
2. Лекарственный препарат.
3. Бутанол-1, ч.д.а.
4. Хлороформ, ч.д.а.
5. Метанол.
6. Ледяная уксусная кислота, ч.д.а.
7. Вода дистиллированная.
8. Хроматографические пластины «Сорбфил», ПТСХ-УФ, 10*15 см
9. Хроматографический стакан.
10. Колба, вместимостью 25 мл.
11. Воронка стеклянная.
12. Пульверизатор.
13. Капилляры стеклянные.
14. Вата гигроскопическая.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Хроматографирование проводят методом восходящей хроматографии в насыщенной камере, время насыщения камеры 45 мин при 20⁰С. В качестве ПФ применяют смесь растворителей: бутанол-1 – хлороформ – метанол – ледяная уксусная кислота – вода (8.0:1.5:2.0:0.5:2.5). Время разделения составляет 45 мин, фронт элюента 8.0 см.

В качестве неподвижной фазы используются пластины Сорбфил ПТСХ-УФ, промытые непосредственно перед анализом смесью хлороформ – метанол (1:1), высушенные при 20⁰ С в течение 15 минут и активированные при 110⁰С в течение 30 мин.

Визуализацию пятен на хроматограммах проводят на Видеоденситометре при длине волны 254 нм. Витамины В₁, В₆ и В₁₂ имеют темную окраску на зеленом фоне.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Работа 12. Количественное определение индигокармина в капсуле лекарственного препарата

Известно, что пищевые красители широко используются не только как добавки к различным пищевым продуктам, но и лекарственным препаратам. Установлено, что пищевые красители не обладают токсичными свойствами, но могут проявлять аллергенные и мутагенные свойства, накапливаясь в организме в больших количествах. Поэтому их содержание в пищевых продуктах и лекарственных препаратах должно быть строго нормировано.

РЕАГЕНТЫ И АППАРАТУРА

1. Индигокармин, ч.д.а
2. Лекарственный препарат.
3. β -Циклодекстрин, хроматографически чистый.
4. Калий хлористый, ч.д.а.
5. Соляная кислота, х.ч.
6. Вода дистиллированная.
7. Хроматографические пластины «Полиамид», Германия.
8. Хроматографический стакан.
9. Колба, вместимостью 50 мл.
10. Воронка стеклянная.
11. Пульверизатор.
12. Капилляры стеклянные.
13. Вата гигроскопическая.
14. Спектрофотометр СФ-46.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В мерных колбах объемом 50 мл, последовательным разбавлением стандартного раствора индигокармина ($C=1 \cdot 10^{-1}$ М) дистиллированной водой, готовят рабочие растворы с концентрациями $1 \cdot 10^{-6} \div 1 \cdot 10^{-2}$ М. Хроматографирование проводят в ПФ состава: $9 \cdot 10^{-3}$ М β -ЦД в присутствии 0.01 М КСІ. Общий объем ПФ равен 5 мл. Объем аликвоты, наносимой на стартовую линию пластины, составляет 1 мкл. По полученным значениям $S_{отн}$ строят градуировочный график, измеряя площадь пятна на денситометре.

Для анализа объекта лекарственного препарата, цветную часть капсулы растворяют в HCl и разбавляют раствор в мерной колбе на 50 мл до метки дистиллированной водой. Определение содержания индигокармина проводят по градуировочному графику.

Для количественного определения индигокармина спектрофотометрическим методом слой сорбента на пластине тщательно счищают и переносят в приемник. Индигокармин вымывают этанолом. Элюент разбавляют дистиллированной водой (50 мл). Содержание индигокармина определяют по градуировочному графику. Оптическую плотность растворов измеряют сразу после приготовления на спектрофотометре СФ-46 при $\lambda_{\max}=610$ нм и $l=1$ см.

ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ МЕТОДА ТСХ

- 1938** Г. – Н.А. ИЗМАЙЛОВ, М.С. ШРАЙБЕР – КАПЕЛЬНО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА
КОНЕЦ 40-Х, НАЧАЛО 50-Х - ПОЯВЛЕНИЕ ЗАКРЕПЛЕННОГО СЛОЯ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СВЯЗУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ
- 1956** Г. – ПОЯВЛЕНИЕ НАЗВАНИЯ «ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ»
ВТОРАЯ ПОЛОВИНА 50-Х – СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДИК ПРОВЕДЕНИЯ ТСХ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ СОРБЕНТОВ
- 1964** Г. – ПРОЯВЛЕНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ДЕНСИТОМЕТРИИ, ПРОМЫШЛЕННЫХ (ГОТОВЫХ) СЕРИЙНЫХ ПЛАСТИНОК ДЛЯ ТСХ,
СЕРИИ ПЕРВЫХ МОНОГРАФИЙ ПО ТСХ ЗА РУБЕЖОМ И В СССР (1965 Г. – А.А. АХРЕМ И А.И. КУЗНЕЦОВА)
- 70-Е** Г.Г. – ПЛАМЕННО-ИОНИЗАЦИОННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРООСМОТИЧЕСКОГО ПОТОКА (СОЧЕТАНИЕ С ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ), ПОЯВЛЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТСХ (ВЭТСХ), МИЦЕЛЛЯРНОЙ ТСХ, ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СОРБЕНТОВ, ПЛАСТИНОК С ПРЕДАДСОРБЦИОННОЙ ЗОНОЙ
- СЕРЕДИНА 80-Х** – ПОЯВЛЕНИЕ ВИДЕОДЕНСИТОМЕТРИИ, МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ПОВЕРХНОСТИ, МЕТОДА АВТОМАТИЧЕСКОГО МНОГОКРАТНОГО ЭЛЮИРОВАНИЯ (AUTOMATED MULTIPLE DEVELOPMENT – AMD-TLC), ДВУМЕРНОЙ ТСХ
- 90-Е** Г.Г. – АВТОМАТИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ, ОБРАБОТКИ ДАННЫХ И СОЗДАНИЕ БАЗ ДАННЫХ;
- АВТОМАТИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ И НАНЕСЕНИЯ ПРОБЫ НА ПЛАСТИНКУ (В ТОМ ЧИСЛЕ РОБОТ)
- МНОГОКРАТНОЕ И ДВУМЕРНОЕ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЕ
- АВТОМАТИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ДЕТЕКТИРОВАНИЯ И ОБРАБОТКИ СПЕКТРАЛЬНЫХ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПОЛОС
ПОЯВЛЕНИЕ ТСХ ПОД ДАВЛЕНИЕМ (ОPLC) (С ПРИНУДИТЕЛЬНЫМ ПОТОКОМ (FORCED FLOW)), ПРОТОЧНОЙ ТСХ (ПТСХ), ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАЗЕРНОЙ КР-СПЕКТРОСКОПИИ (SERRS), СОЧЕТАНИЕ ТСХ С ВЭЖХ, ТВЕРДОФАЗНОЙ ИЛИ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ЭКСТРАКЦИЕЙ.
- 2000-Е** Г.Г. - ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ С УПРАВЛЯЕМОЙ ГАЗОВОЙ ФАЗОЙ (ТСХ-УГФ)

КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ОСНОВНЫХ ТЕРМИНОВ

Хроматография	метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на различии в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз
Планарная хроматография	способ хроматографии, в котором процесс разделения смеси веществ осуществляется в плоском слое сорбента
Тонкослойная хроматография	планарная хроматография, в которой процесс разделения смеси веществ осуществляется в тонких слоях сорбента (нанесенного на инертную твердую подложку) или в пленках пористого полимерного материала
Адсорбционная ТСХ	хроматография, в которой разделение смеси веществ происходит в результате различия в константах их адсорбции
Распределительная ТСХ	хроматография, в которой разделение смеси веществ происходит в результате различия в их коэффициентах распределения между подвижной и неподвижной фазами
Нормально-фазовая ТСХ	жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза более полярна, чем подвижная
Обращенно-фазовая ТСХ	жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная
Мицеллярная ТСХ	жидкостная хроматография, в которой подвижной фазой является раствор поверхностно-активного вещества с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования
Ион-парная ТСХ	жидкостная хроматография, в которой подвижная фаза содержит сорбируемое ионогенное вещество (ион-парный реагент) и разделение смеси веществ происходит за счет различия в способности веществ к образованию ионных пар и/или в коэффициентах распределения ионных пар между подвижной и неподвижной фазами
Аналитическая ТСХ	хроматография, используемая для качественного анализа смеси и/или количественного определения отдельных компонентов смеси
Препаративная ТСХ	хроматография, используемая для выделения чистых компонентов или фракций из смеси

Хроматографическая система	совокупность несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз с развитой межфазной границей (поверхностью)
Подвижная фаза	поток жидкости, перемещающий компоненты разделяемой смеси вдоль неподвижной фазы и вступающий в физико-химическое взаимодействие с ними
Неподвижная фаза	твердый сорбент или несмешивающаяся с подвижной фазой жидкость, на которой осуществляется дифференцированное удерживание и разделение компонентов смеси
Сорбент	пористый материал, способный к поглощению вещества в результате сорбции
Адсорбент	твердый сорбент, концентрирующий растворенные вещества на своей поверхности
Абсорбент	твердый или жидкий сорбент, растворяющий в своем объеме компоненты жидких смесей
Сорбат	вещество, поглощаемое сорбентом в процессе сорбции
Сорбция	поглощение газов, паров или растворенных твердых веществ сорбентом на пластине
Элюент	растворитель или система растворителей, используемые в качестве подвижной фазы
Элюат	поток подвижной фазы с компонентами разделяемой смеси, выходящий с пластинки
Элюирование	Процесс вымывания анализируемых веществ с поверхности пластины под действием подвижной фазы
Селективность	способность конкретной системы "подвижная фаза/неподвижная фаза" к хроматографическому разделению пары веществ A/B
Разрешение	Параметр, характеризующий качество разделения двух веществ и равный отношению расстояния между центрами двух соседних хроматографических зон (пятен) к сумме полуширин этих зон

Литература

1. Ахрем А.А., Кузнецова А.И. Тонкослойная хроматография. – М: Наука, 1964. – 175 с.
2. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Шталя. – М: Мир, 1965. – 508 с.
3. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А. и др. Аналитическая хроматография. - М.: Химия, 1993. – 463 с.
4. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии / Под ред. В.Г. Березкина. – М.: Химия, 1999. – Т. 1 и 2.
5. Руководство по современной тонкослойной хроматографии / Под ред. О.Г. Ларионова. – М.: Химия, 1994. – 311 с.
6. Кибардин С.А., Макаров К.А. Тонкослойная хроматография в органической химии. – М.: Химия, 1978. – 128 с.
7. Кайер Р.Е., Блом Ж., Халапаан Х. и др. Высокоэффективная ТСХ. / Под ред. А.Златкис, Р.Е. Кайер. – М.: Мир, 1979. – 246 с.
8. Березкин В.Г., Бочков А.С. Количественная тонкослойная хроматография. – М.: Наука, 1980. – 183 .
9. Волынец М.П. Количественная тонкослойная хроматография в неорганическом анализе. – М.: Наука, 1993. – 240 с.
10. Практическая газовая и жидкостная хроматография: Учеб. пособие / Б.В. Столяров, И.В. Савинов, А.Г. Виттенберг и др. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербург. ун-та, 1998. – 612 с.
11. Штыков С.Н., Сумина Е.Г., Паршина Е.В., Лопухова С.С. // Журн. аналит. химии. 1995. Т.50. №.7. С.747.
12. Штыков С.Н., Сумина Е.Г. // Журн. аналит. химии. 1998. Т.53. №.5. С.508.
13. Shtykov S.N., Sumina E.G., Smushkina E.V., Tyurina N.V. // J. Planar Chromatogr. 1999. V.12. №.2. P.129.
14. Shtykov S.N., Sumina E. G., Smushkina E. V., Tyurina N. V. // J. Planar Chromatogr. 2000. V.13. №.3. P.182.
15. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. // Изв.вузов. Химия и хим.технол. 2001. Т.44. № 4. С.10.
16. Сумина Е.Г., Ермолаева Е.В., Тюрина Н.В., Штыков С.Н.// Заводск. лаб. 2001. Т.67. №5. С.5.
17. Сумина Е.Г., Смушкина Е.В., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. // Заводск. лаб. 2001. Т.67. №10. С.13.
18. Штыков С.Н., Сумина Е.Г., Тюрина Н.В. // Журн. аналит. химии. 2002. Т.57. №.4. С.383.

Содержание

	Стр.
Введение	3
Глава 1 Хроматографический процесс и его характеристики в тонкослойной хроматографии	5
1.1 Изотерма адсорбции	6
1.2 Параметры тонкослойной хроматографии	8
1.3 Количественные характеристики эффективности разделения в ТСХ	18
1.4 Типы классификаций в ТСХ	22
1.5 Основные механизмы разделения в ТСХ	23
Глава 2 Сорбенты и пластинки в ТСХ	26
2.1 Полярные сорбенты	30
2.2 Органические сорбенты средней полярности	33
2.3 Органические неполярные фазы	36
Глава 3 Подвижные фазы в ТСХ	44
3.1 Подвижные фазы на основе органических растворителей	45
3.1.1 Предварительный выбор подвижной фазы	45
3.1.2 Классификации подвижных фаз	46
3.2 Подвижные фазы на основе поверхностно-активных веществ	53
3.2.1 Классификация ПАВ	54
3.2.2 Применение ПАВ в качестве подвижных фаз в ТСХ	58
Глава 4 Факторы, влияющие на разделение в ТСХ	61
4.1 Влияние температуры	61
4.2 Влияние pH	62
Глава 5. Подготовка камеры и слоя сорбента для хроматографирования. Нанесение пробы. Способы проведения ТСХ	66
5.1 Подготовка камеры и слоя сорбента	66
5.2 Требования к растворителю и способу нанесения пробы	70
5.3 Способы хроматографирования в ТСХ	71
Глава 6. Способы обнаружения и идентификации веществ методом ТСХ	80
Глава 7. Количественный анализ в тонкослойной хроматографии	83
7.1 Методы определения анализируемых соединений непосредственно на пластинке	83
7.2 Количественная хроматография в тонких слоях с использованием элюирования	85
7.3 Перенос результатов ТСХ-разделений на варианты колоночной жидкостной хроматографии	87

Глава 8	Современные направления развития ТСХ	90
8.1	Высокоэффективная ТСХ	90
8.2	ТСХ с управляемой газовой фазой (ТСХ-УГФ)	91
8.3	Другие варианты современной ТСХ	92
Глава 9	Практические работы	98
	Этапы развития метода ТСХ	123
	Краткий словарь основных терминов	124
	Литература	126

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского