

Journal of Chromatography  
Library — Volume 9

---

HPTLC  
HIGH PERFORMANCE  
THIN-LAYER  
CHROMATOGRAPHY

Editors

A. Zlatkis  
University of Houston,  
Houston, Texas

R. E. Kaiser  
Institute of Chromatography,  
Bad Dürkheim

Elsevier Scientific  
Publishing Company  
Amsterdam — Oxford — New York

Institute of Chromatography  
Bad Dürkheim  
1977

# ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

---

Редакторы  
А. ЗЛАТКИС, Р. КАЙЗЕР

Перевод с английского  
А. С. БОЧКОВА

под редакцией  
доктора хим. наук,  
профессора В. Г. БЕРЕЗКИНА

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»  
Москва 1979

## ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

В книге рассматривается новый вариант метода тонкослойной хроматографии, отличающийся повышенной эффективностью разделения, улучшенной экспрессностью, более высокой чувствительностью. Несмотря на небольшой объем книги, в ней достаточно полно обсуждаются теоретические основы метода, его особенности и аппаратура; подробно рассматриваются практические вопросы хроматографирования образцов и получения количественных результатов.

Предназначена для научных работников, аспирантов и студентов, специализирующихся в области аналитической, органической и биологической химии, для сотрудников заводских лабораторий, специалистов в области аналитического приборостроения.

*Редакция литературы по химии*

2603040000

В  $\frac{20503-079}{041(01)-79}$  079-79

Copyright © 1977 by Institute of Chromatography, Bad Dürkheim

© Перевод на русский язык, «Мир», 1979

Аналитические методы исследования имеют огромное значение при изучении окружающей нас природы, протекающих в ней процессов, а также при управлении технологическими процессами в промышленности. Образно говоря, аналитические методы — это новое особое «зрение», позволяющее исследователю видеть то, что недоступно при использовании других методов и приемов.

Методы разделения занимают в аналитической химии особое место. Окружающий нас мир — мир сложных смесей, а известные методы количественного анализа, как правило, эффективны только для определения индивидуальных веществ или смесей известного состава; их применение для анализа многокомпонентных смесей в общем случае ограничено. Поэтому в аналитической химии в последние десятилетия широкое распространение получили гибридные методы [1], сочетающие методы разделения и количественного определения. Одним из наиболее ярких примеров такого сочетания является хромато-масс-спектрометрия, в которой анализируемую смесь вначале разделяют на газовом или жидкостном хроматографе на отдельные компоненты, а затем проводят качественную идентификацию и количественное определение на масс-спектрометре. Большой вклад в развитие этого метода внесли В. Л. Тальрозе и его сотрудники [2].

Интенсивное развитие методов разделения отражается и в распределении публикаций в области органической аналитической химии: в 1975 г. почти половина (44%) публи-

каций была посвящена хроматографическим методам анализа; 31% — спектроскопическим (оптическим, ЭПР, ЯМР и т. д.), 18% электрохимическим и 7% весовым, титриметрическим и др.

Важное место среди хроматографических методов занимает тонкослойная хроматография — метод, предложенный советскими исследователями Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер в 1938 г. [3]. Широкое распространение и дальнейшее развитие этот метод получил благодаря работам Э. Шталя [4]. В 1975 — 1976 гг. на долю колоночной жидкостной хроматографии приходилось 39% публикаций в области органической аналитической химии, на долю тонкослойной хроматографии 28%, на долю газовой — 26%, публикации по бумажной хроматографии составляли всего 7%.

В тонкослойной, или плоскостной, хроматографии сорбент имеет плоскую форму. В наиболее распространенном варианте тонкослойной хроматографии слой используется однократно для одного разделения. После разделения анализируемой смеси на отдельные компоненты элюирование прекращают и проводят качественное и количественное определение вещества в хроматографических зонах. Для определения бесцветных соединений чаще всего используют детектирование в ультрафиолетовом свете, опрыскивание химическими реагентами и экстрагирование зоны вещества с сорбента для последующего исследования полученных таким образом окрашенных соединений физическими и химическими методами [5—7].

В настоящее время в тонкослойной хроматографии сформировалось новое направление — высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ). Монография, вышедшая под редакцией известных ученых А. Златкиса и Р. Кайзера, является первой книгой, посвященной новому методу. ВЭТСХ возникла в результате работы многих ученых из разных стран. Большой вклад в развитие ВЭТСХ внесли советские исследователи. В работах Б. Г. Беленького и сотрудников большое внимание уделено разработке микротонкослойной хроматографии и развитию общей теории размывания в ТСХ [8, 9]; вклад Л. В. Андреева отмечается редакторами в предисловии. Новый метод имеет существенные преимущества по сравнению

с известными способами хроматографического разделения: к ним относятся высокая эффективность, экспрессность и высокая чувствительность. При оценке результатов хроматографического разделения широко применяется оптическое сканирование. Для проведения ВЭТСХ необходимы пластинки, покрытые тонким слоем сорбента с однородными частицами небольшого размера, а также особые условия разделения. По аналогии с газовой хроматографией ВЭТСХ можно рассматривать как вариант капиллярной хроматографии в тонкослойной хроматографии.

В начале книги дается краткое введение в теорию тонкослойной хроматографии. Следует отметить, однако, что в ней рассмотрены только вопросы удерживания разделяемых соединений, хотя при хроматографировании одновременно протекают два противоположных процесса — разделение максимумов хроматографических зон и их размывание. Вопросам связи параметров удерживания линейного и кругового вариантов в тонкослойной хроматографии посвящена отдельная глава.

Подробно рассмотрены методики эксперимента (нанесение проб, насыщение камер для элюирования парами подвижной фазы и т. д.), влияние параметров эксперимента на результаты разделения и особенности аппаратуры.

Важным этапом эксперимента является количественное определение вещества в хроматографической зоне. Ранее эта стадия была наиболее трудоемкой и длительной. В последние годы она выполняется автоматически, главным образом, путем оптического сканирования пластинки с разделенными зонами. Методы оптического сканирования изложены Ю. Хазел в главе, посвященной количественной ВЭТСХ. Приведены также примеры разделения с помощью ВЭТСХ.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что описанные в книге различные стороны ВЭТСХ — важного этапа развития тонкослойной хроматографии — представляют интерес для широкого круга читателей: химиков, биологов, геологов, медиков и других специалистов, применяющих методы тонкослойной хроматографии в своей работе. Использование методов, описанных в книге, несомненно, позволит улучшить основные характеристики конкретных

аналитических определений, выполняемых в настоящее время традиционными методами тонкослойной хроматографии.

*В. Г. Березкин*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Золотов Ю. А. Очерки аналитической химии. М.: Химия, 1977.
2. Труды международного симпозиума по хромато-масс-спектрометрии. М.: ИФХ АН СССР, 1969.
3. Измайлов Н. А., Шрайбер М. С. Фармация, № 3, 1 (1938).
4. Хроматография в тонких слоях. Под ред. Э. Шталя, М.: Мир, 1965.
5. Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1964.
6. Вольнец М. П. Тонкослойная хроматография в неорганическом анализе. М.: Наука, 1974.
7. Кибардин С. А., Макаров К. А. Тонкослойная хроматография в органической химии. М.: Химия, 1978.
8. Belenky V. G., Nesterov V. V., Gankin E. S., Smirnov M. M., J. Chromatogr., 31, 300 (1966).
9. Belenky V. G., Kolegov V. I., Nesterov V. V., J. Chromatogr., 107, 265 (1975).

## ПРЕДИСЛОВИЕ И ВВЕДЕНИЕ

Эта книга вышла в свет в период, когда многие исследователи-аналитики рассматривали тонкослойную хроматографию (ТСХ) как один из второстепенных методов. Другая довольно многочисленная группа ученых занималась проблемами высокоэффективной жидкостной колоночной хроматографии (ВЭЖЖХ), называемой иногда не совсем правильно жидкостной хроматографией высокого давления. В этом методе колонки для разделения редко используются при оптимальных условиях. Они характеризуются эффективностью, значительно превышающей 1000 теоретических тарелок. Применение ВЭЖЖХ подчас ограничено необратимой адсорбцией компонентов анализируемых смесей. Большинство недостатков этого метода можно устранить с помощью ТСХ.

Следует отметить, что предлагаемая монография посвящена не критике ВЭЖЖХ, а описанию нового, изящного, экспрессного, недорогого и достаточно точного аналитического метода, с помощью которого в ряде случаев можно подобрать условия разделения для ВЭЖЖХ.

Новый метод получил название «высокоэффективная тонкослойная хроматография» (ВЭТСХ). Возможности ВЭТСХ можно проиллюстрировать следующими конкретными данными. Разрешающая способность метода такова, что за один цикл анализа можно полностью разделить до 40 различных веществ. Эффективность разделения в среднем составляет более 5 компонентов в минуту.

В качестве метода предварительного разделения одной пробы или группы веществ ВЭТСХ характеризуется широкими аналитическими возможностями. При проведении массовых анализов с помощью описываемого метода одновременно удается разделить:

- а) до 12 образцов, используя микрокруговой вариант;
- б) до 8 образцов, применяя макрокруговой метод;
- в) до 40 образцов, используя линейный вариант.

С помощью непрерывного варианта описанного метода удается проводить разделение более 10 образцов.

Качественный анализ круговым методом в U-камере позволяет получить истинные величины  $R_f$  со стандартным отклонением  $\pm 1\%$  (для  $R_f \sim 0,5$ ).

При проведении количественного анализа нанограммовых проб линейным методом стандартное отклонение результатов не превышает 2,3%. Для кругового метода анализа на пластинках размером  $100 \times 100$  мм соответствующая величина не превышает  $\pm 1-1,5\%$ .

В качественном анализе методом круговой ТСХ истинные величины  $R_f$  лежат в интервале от 0,01 до 1,00 (использование U-камеры, контроль потока элюента и известный состав газовой фазы).

В количественном анализе величины  $R_f$  изменяются от 0,5 до 0,7, причем количество вещества в зоне может изменяться в 10 000 раз. Метод ВЭТСХ пригоден для определения фемтограммовых количеств ( $10^{-15}$  г).

Воспроизводимость нанесения пробы объемом 100 нанолитров ( $10^{-9}$  л) на смоченный слой сорбента составляет  $\pm 1\%$ ; при этом отсутствует эффект необратимой адсорбции, а также систематические потери.

Данные, полученные ВЭТСХ, можно применять для ВЭЖКХ; перенос данных возможен также при разделении круговым непрерывным методом с помощью многокомпонентного элюента.

Анализ длится до 120 с.

Высокая эффективность метода является результатом ряда усовершенствований. К ним относятся:

а) применение сорбента с оптимизованными характеристиками; эффективность разделения на таком сорбенте превышает соответствующие параметры сорбентов для ВЭЖКХ;

- б) новый способ подвода элюента;
- в) новый способ кондиционирования сорбента;
- г) значительно улучшенный метод нанесения пробы;
- д) применение рациональной системы получения и обработки данных.

Описываемый метод сформировался постепенно. Первым исследователем, начавшим работать в этом направлении, был Э. Шталь. Исходя из полученных результатов и потенциальных возможностей ВЭТСХ, его создание можно назвать вторым рождением ТСХ.

Окончательное суждение должны вынести исследователи-практики.

Несмотря на практическую направленность книги, в ней сделана попытка исправить ряд ошибочных теоретических представлений. В монографии показано, что при оптимальных фазовых условиях на пластинках размером  $5 \times 5$  см за 150 с можно получить истинные значения  $R_f$  с очень высокой точностью. В ходе изложения будет продемонстрировано, что истинную величину  $R_f$  можно непосредственно перевести в более удобный с точки зрения хроматографического разделения коэффициент емкости  $k = t_s/t_m^*$ . Подобный перевод осуществим и в случае адсорбционной хроматографии, где элюенты обычно состоят из смесей органических растворителей разной полярности. В книге показано также, что в настоящее время в ТСХ целесообразно использовать понятие высоты тарелки. Необходимость точного измерения основных хроматографических параметров, таких, как, например, фазовое соотношение, с трудом измеряемое непосредственно, раскрыты в тексте книги. Детально описано применение ВЭТСХ для количественного анализа.

Описываемый метод был разработан совместно Хезел, Бломом, Ионхеном, Халпапом, Рипфаном и Кайзером.

Блом одним из первых оценил принципиальные преимущества круговой ТСХ и начал работать в этом направ-

\* В советской литературе коэффициент емкости называют также коэффициентом извлечения, определяемым как отношение времени нахождения вещества в неподвижной фазе к времени нахождения его в подвижной фазе. В колоночной хроматографии он равен отношению времени удерживания анализируемого вещества к мертвому времени колонки. — *Прим. ред.*

лени. Андреев продемонстрировал эффективность очень тонких слоев сорбента. Эйзенбейс приготовил пластинки\* с толщиной сорбирующего слоя 5 мкм без связующего и разделил на них 10 красителей за 13 с [1]. Ионхен сконструировал лабораторный прибор, объединив в нем в единую систему прототип новых камер, систему дозирования и вспомогательные приспособления к дозирующему устройству фирмы «Самаг». Халпаап изготовил универсальные ВЭТСХ-пластинки. Авторы книги пользовались только этими пластинками. В период подготовки книги промышленность освоила выпуск пластинок для адсорбционной ВЭТСХ.

В главе «Преимущества, область применения и недостатки кругового метода разделения» дан краткий обзор развития ТСХ за последние 150 лет\*\*. В ней показано, что уже в начале развития хроматографии на тонких слоях сорбента были очевидны преимущества кругового варианта по сравнению с линейным. ТСХ имеет своеобразную историю: первые открытия в этой области знаний были забыты, и только в результате повторных исследований ТСХ получила всеобщее признание.

Следует отметить, что экспрессность современного метода не является результатом последних исследований. Исключением являются усовершенствования, введенные Эйзенбейсом (они будут обсуждаться позже). Контролируемое дозирование непрерывного потока элюента применяли и другие исследователи.

Каждый новый метод анализа должен удовлетворять ряду требований, к которым, в частности, относятся: надежность получаемых результатов, экспрессность и эко-

\* Сорбирующий слой был получен из силикагеля 60 (очень узкая фракция). Этот слой не обладал механической прочностью, но легко смачивался элюентом. Результаты анализа: число разделений более 20, длина пути разделения 20 мм, за время 13 с удалась полностью разделить смесь из 10 компонентов. После двух лет хранения проницаемость слоя возросла при сохранении стабильного разделения.

\*\* Авторами тонкослойной хроматографии являются Н. А. Измайлов и М. С. Шрайбер, которые опубликовали в 1938 г. первую работу по разделению алкалоидов на пластинке с оксидом алюминия (Фармация, 1938, № 3, 1). Это является общепринятой точкой зрения. — *Прим. ред.*

номичность. В ходе исследований можно пойти на некоторое ухудшение этих параметров ради получения большей точности определения и более системного подхода к анализу и обработке результатов. Одним из важных источников ошибок является неправильное истолкование полученных результатов.

Голдман и Гудал описали [2—8] разделение в тонком слое сорбента за 60 с при длине пути разделения 20 мм. Шталь исследовал влияние размера частиц сорбента на время анализа [9]. Халпаап [10] впервые проследил зависимость между размерами частиц, с одной стороны, и длительностью разделения, величинами  $R_f$  и высотой тарелки — с другой.

Много внимания ВЭТСХ уделял Андреев. Полученные им результаты экспрессного разделения методом микротонкослойной хроматографии опубликованы в научных журналах. Еще более интересные данные представлены Андреевым на симпозиуме в Новаки, ЧССР, в 1973 г. Эти результаты действительно важны для сокращения времени анализа [11].

Для получения цельной картины развития описываемого метода необходимо всесторонне рассмотреть области приложения и перспективы использования ВЭТСХ, уделяя особое внимание различным направлениям применения пластинок с оптимизированными свойствами. Использование старых методических приемов в ВЭТСХ приводит к получению неудовлетворительных результатов, поскольку применявшийся ранее способ нанесения пробы сводит на нет высокую эффективность разделения оптимизированных слоев сорбента.

Использование круговых камер для разделения на ВЭТСХ-пластинках позволяет существенно улучшить результаты. Так, например, можно за несколько секунд получить точные данные, уменьшить размеры пластинок на 60%, сократить объем применяемого элюента в 1000 раз, а длительность анализа в 10 раз. По сравнению с обычной ТСХ точность анализа возрастает в десятки раз. Улучшение именно этих параметров и составляет сущность ВЭТСХ. Благодаря большим аналитическим возможностям новый метод найдет широкое признание у исследователей, занимающихся ТСХ. Теперь специалисты в области коло-

ночной жидкостной хроматографии получили возможность выбора между ВЭЖКХ и ВЭТСХ. В тех случаях, когда требуются лишь удовлетворительная точность и воспроизводимость анализа, можно обойтись без дорогостоящего оборудования и проводить анализ практически в любых условиях. Аппаратура, ТСХ-системы и применяемые реактивы могут быть стандартизованы.

В первой главе настоящей книги дается краткое введение в теорию ТСХ; во второй и третьей главах изложены теория и практика кругового метода. Четвертая глава посвящена U-камерам. ВЭТСХ можно использовать как для точного определения величин  $R_f$  в поточных анализах, так и для быстрого подбора условий разделения в ВЭЖКХ. Важной разновидностью метода является непрерывная микро-ТСХ. Пятая глава книги посвящена стандартизованной технике дозирования в ВЭТСХ, являющейся основой для получения точных количественных результатов анализа. Описанные приемы и методы дозирования упоминаются и в последующих главах.

В главе «Исследование воспроизводимости ТСХ разделения» Йонхен уделяет особое внимание результатам последних исследований и тем деталям методик, о которых обычно не сообщается в литературе. К таким особенностям относятся проблема относительной влажности сорбента в адсорбционной ТСХ и аналогичные вопросы в распределительной ТСХ.

В гл. 8, написанной Ют Хезел, показано большое практическое значение круговой микро-ТСХ, с помощью которой можно получить точные и воспроизводимые количественные результаты разделения.

Девятая глава, посвященная применению нового метода ВЭТСХ в количественной ТСХ, написана Рипфаном и Халпапом. В процессе подбора оптимальных характеристик ТСХ-пластинок, обеспечивающих высокую эффективность разделения, авторы исследовали большое количество сорбирующих материалов. Они пришли к выводу, что при неправильном нанесении пробы на слой сорбента, в результате чего получаются пятна диаметром порядка 1 мм, нельзя реализовать преимущества ВЭТСХ. Для регулирования и контроля физических и физико-химических параметров газовой, жидкой и твердой фаз в ТСХ

можно пользоваться различными приемами, в том числе и миниатюризацией. При правильном выборе условий анализа получаются очень интересные результаты.

В книгу включено несколько таблиц, где представлены новые результаты Халпапа, относящиеся в основном к полярности силикагеля в различных подвижных фазах. Эти данные в ранее опубликованных материалах были интерпретированы неверно.

Обозначения, используемые в этой книге, в основном заимствованы из монографии Гейсса [12].

Чистое время удерживания  $t_s$  и мертвое время  $t_m$  (время удерживания несорбирующегося вещества) используют для того, чтобы подчеркнуть принципиальную теоретическую связь ВЭТСХ с элюентными методами. Необходимо помнить, что  $t_s$  и  $t_m$  соответствуют длине пути разделения, точнее, относительным расстояниям. В книге все данные, характеризующие хроматографический процесс, являются в основном относительными величинами.

Авторы настоящей книги показали, что с помощью ВЭТСХ — нового метода, успешно конкурирующего с другими способами анализа, — можно решать сложные задачи разделения.

Редакторы надеются, что приведенные в книге материалы будут полезны читателю.

А. Златкис  
Р. Е. Кайзер

Ноябрь 1976 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Eisenbeiss F.*, частное сообщение, Bad Dürkheim, 1973.
2. *Goldman J., Goodall R. R.*, J. Chromatogr., 32, 24 (1968).
3. *Goldman J., Goodall R. R.*, J. Chromatogr., 40, 345 (1969).
4. *Goldman J., Goodall R. R.*, J. Chromatogr., 47, 386 (1970).
5. *Goldman J., Goodall R. R.*, J. Chromatogr., 71, 297 (1972).
6. *Goldman J., Goodall R. R.*, J. Chromatogr., 73, 161 (1972).
7. *Goldman J., Goodall R. R.*, J. Chromatogr., 78, 7 (1973).
8. *Goldman J., Goodall R. R.*, J. Chromatogr., 78, 153 (1973).
9. *Stahl E.*, Z. f. Analytische Chemie, 235, 294—310 (1968).
10. *Halpaap H.*, J. Chromatogr., 78, 77—78 (1973).

11. Андреев Л. В., Татариунас Т., Карнаузов В. Н. — Биофизика живой клетки. 1971, № 2, с. 84; Клар Л. Л., Соколов М. С., Перфилова Н. В., Андреев Л. В. — В сб.: Поведение, превращение и анализ пестицидов и их метаболитов в почве, Пушкино на Оке, 1973, с. 152.
12. Geiss F., «Die Parameter der Dünnschicht Chromatographie, eine moderne Einführung in Grundlagen und Praxis», published by Friedr. Vieweg + Sohn Braunschweig, now Wiesbaden, BDR (1972).

## Глава 1

## УПРОЩЕННАЯ ТЕОРИЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Р. Е. Кайзер

Kaiser R. E., Institute of Chromatography,  
Bad Dürkheim, BDR

В настоящей главе описано практическое применение некоторых основных формул при выборе оптимальных условий для серийных анализов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Данные ВЭТСХ можно использовать в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Такое изложение не охватывает все теоретические вопросы ТСХ, но все же оно шире работы Гейсса [1].

## 1.1. Опытные данные и их интерпретация

1.1.1. Величины  $R_f$  и  $k$ 

Величина  $R_f^*$  — это отношение расстояний, которые пройдены исследуемым веществом и подвижной фазой соответственно ( $Z_s$  и  $Z_m$ ):

$$\frac{Z_s}{Z_m} = R_f, \quad (1.1)$$

$R_f$  — основная качественная характеристика ТСХ. Если нельзя точно установить положение фронта растворителя  $Z_m$ , то на величину  $R_f$  будут влиять систематические

---

\*  $R_f$  — величина запаздывания;  $R_f$  также можно рассматривать как отношение скорости движения центра хроматографической зоны к скорости подвижной фазы. — Прим. ред.



ошибки. Потеря компонентов подвижной фазы, уже присутствующих в слое сорбента, или их накопление также влияют на величину  $R_f$ . В первом случае значения  $R_f$  систематически завышены, а во втором — систематически занижены, т. е. найденные значения нельзя использовать для расчета коэффициента емкости  $k$ .

Для того чтобы получить истинные значения  $R_f$ , необходимо выполнять следующие требования:

- 1) постоянство условий вдоль пути разделения;
- 2) исключение потерь подвижной фазы;
- 3) точное определение положения фронта растворителя путем измерения и расчета его действительного положения;
- 4) исключение случайных влияний в результате испарения при нанесении пробы.

Технические проблемы эксперимента в этой главе не обсуждаются.

Коэффициент емкости  $k$  определяется как отношение времени нахождения вещества в неподвижной фазе к времени его нахождения в подвижной фазе:

$$\frac{t_s}{t_m} = k. \quad (1.2)$$

Коэффициент емкости — одна из самых простых и важных характеристик, определяющих поведение (природу) вещества при хроматографическом процессе.

Полный цикл разделения в ТСХ занимает период времени  $t_m$ . В элюентной хроматографии измерения начинают лишь через период времени  $t_m$ . Если данное вещество характеризуется коэффициентом емкости  $k$ , то продолжительность элюирования составляет  $kt_m$ . Таким образом, можно найти основные соотношения между  $R_f$  и  $k$ .

Пусть для исследуемого вещества  $R_f = 0,1$ . Время, за которое это вещество приближается к фронту растворителя, составляет  $9t_m$ , т. е. это случай, когда выполняются условия непрерывной ТСХ, которые по существу сходны с условиями в колонке для элюентной хроматографии. Таким образом, можно записать:

$$R_f = \frac{1}{k+1}. \quad (1.3)$$

Поскольку  $k = \frac{t_s}{t_m}$ , приходим к заключению, что

$$\frac{t_m}{t_{ms}} = R_f = \frac{t_m}{t_m + t_s}, \quad \text{где } t_{ms} = (t_m + t_s) \text{ — общее время}$$

удерживания, т. е. время, в течение которого вещество находится в подвижной и неподвижной фазах. В элюентной хроматографии это соответствует времени от момента введения пробы до выхода этого вещества из колонки. Отношение абсолютных величин времени удобно вследствие его однозначности, поэтому коэффициент емкости  $k$  находит широкое применение.

Однако это обстоятельство не обеспечивает правильности найденных величин, так как  $t_m$  и  $t_s$  независимы друг от друга в любых хроматографических условиях. Так, в случае изменения температуры  $t_s$  (и, возможно,  $t_m$ ) будут изменяться, но эти изменения не будут совпадать по величине и направлению. В значительной степени  $k$  определяется химическими свойствами фаз. Результаты, полученные методами ВЭТСХ, можно распространять на системы в ВЭЖХ при условии, что в них используются такие же фазы.

Закрытые (адсорбционные) хроматографические колонки необходимо кондиционировать для стабилизации адсорбционной активности поверхности. Состояние равновесия требуется и для тонкослойной хроматографической системы. Когда течение подвижной жидкой фазы прекращается хотя бы на короткое время, возникает резкое изменение химического состояния слоя сорбента, находящегося в равновесии с окружающей газовой средой. Подвижная фаза состоит из растворителей различной летучести и полярности. Именно поэтому даже в момент нанесения пробы в ТСХ очень важно, чтобы объемная скорость потока элюента была постоянной. В ТСХ это условие необходимо выполнять более строго по сравнению с колоночной жидкостной хроматографией, где поток через кондиционированную колонку может быть приостановлен на несколько минут без существенного влияния на результаты разделения. Соответствующий экспериментальный подход описан ниже.

Экспериментальные данные получают следующим образом:

1) хроматограмму фотографируют; на снимке фиксируются зоны веществ через  $t_m$  секунд после начала хроматографического процесса;

2) поток подвижной фазы останавливают, рассчитывают положение экстраполированного фронта элюента, измеряют расстояния пятен окрашенных веществ до точки нанесения пробы и вычисляют величину  $R_f$ .

Непрерывную ТСХ можно проводить круговым методом, который легко контролировать с помощью функции потока. Соотношение, определяющее эту функцию, а также соотношения, связывающие  $R_f$ , полученные методом круговой и линейной ТСХ, будут описаны ниже в связи с переводом данных из одной системы в другую.

Если в ходе хроматографического разделения исследуемое вещество неподвижно, т. е. в подвижной фазе нельзя обнаружить даже следы этого вещества, то для его элюирования необходимо время  $\infty t_m$ , при этом  $R_f = 0$ . Для элюирования вещества, которое проходит половину пути разделения ( $R_f = 0,5$ ), требуется период времени, равный  $t_m + t_m$ . Время его удерживания подвижной фазой равно времени его удерживания неподвижной фазой и, следовательно,

$$k = t_s/t_m = 1.$$

Вещество, продвигающееся вместе с фронтом элюента, не удерживается неподвижной фазой ( $R_f = 1$ ), т. е.

$$k = t_s/t_m = 0/1 = 0.$$

Таким образом, можно составить таблицу значений  $R_f$  в зависимости от величины  $k$  (см. также приложения).

$k$	$\infty$	9	4	2	1	0,5	0
$R_f$	0	0,1	0,2	0,333	0,5	0,666	1,0

Расчет производится по уравнению

$$k = \frac{1 - R_f}{R_f} \quad (1.4)$$

при условии, что  $R_f$  — истинная величина.

### 1.1.2. Истинные значения $R_f$

Для получения истинных значений  $R_f$  необходимо, чтобы количество подвижной фазы не уменьшалось вследствие испарения и не увеличивалось вследствие конденсации из газовой фазы. Для этого в камере для ВЭТСХ объем газовой фазы сведен к минимуму, температура должна быть постоянной, слой сорбента совершенно симметричным и горизонтальным. Только таким путем можно исключить нарушение равновесия фаз. В отличие от других методов, в которых для регулирования и компенсации взаимного влияния параметров, определяющих величину  $R_f$ , используют сложное оборудование, в круговой ТСХ применяют простую по конструкции и в эксплуатации небольшую плоскую камеру симметричной формы. В эту камеру подают поток элюента с постоянной объемной скоростью. Постоянство объемной скорости потока подвижной фазы контролируют следующими способами:

- 1) перед подачей на слой сорбента поток направляют на аналитические весы;
- 2) поток элюента измеряют объемным методом;
- 3) поршень точного шприца перемещают с постоянной скоростью, для чего используют шаговый двигатель; частоту вращения двигателя изменяют ступенчато, а постоянство угловой скорости вращения регулируют электронным устройством.

Таким образом, истинное значение  $R_f$  определяют расчетным путем или путем калибровки. На это определение не влияет предварительное насыщение слоя. Слой сорбента должен быть однородным в трех взаимно перпендикулярных направлениях, т. е. сорбент должен быть высококачественным.

Перед тем как рассматривать методику расчета положения фронта элюента, необходимо подробнее остановиться на функции потока в круговой ТСХ. Общеизвестно, что скорость подвижной фазы в обычной линейной ТСХ зависит от многих факторов, в том числе от специфических свойств слоя сорбента, обуславливающих объемную скорость элюента, величины поверхностного натяжения, смачиваемости сорбента, вязкости подвижной фазы, температуры и т. д. При контролируемом пото-

ке подвижной фазы эти факторы не влияют на его скорость. В круговой ТСХ объемную скорость элюента определяет адсорбционная емкость слоя.

### 1.1.3. Роль потока подвижной фазы в ВЭТСХ

В линейной ТСХ стадия подвода элюента к слою сорбента является потенциальным источником ошибок. На эту стадию влияют многие факторы, которые с трудом поддаются контролю; их подробное обсуждение содержится в работе Гейсса [1].

Функцию потока можно выразить как

$$(Z_f)^2 = tK, \quad (1.5)$$

где  $K$  — константа скорости,  $\text{см}^2/\text{с}$ ;  $Z_f$  — расстояние, на которое переместится фронт растворителя за время  $t$ ,  $\text{см}$ ;  $t$  — время,  $\text{с}$ .

Параметры подвижной фазы не зависят от направления ее перемещения, и, следовательно, функцию потока можно применять и для линейной, и для круговой ТСХ:

$$(Z_f)^2 = tK.$$

Площадь круговой области, смоченной жидкой фазой, равна  $\pi (Z_f)^2$ . Следовательно, ее величина линейно зависит от  $tK$ , т. е. предполагается, что объемная скорость подачи элюента постоянна.

В линейной ТСХ вследствие неизбежного испарения подвижной фазы объемная скорость потока уменьшается как функция квадрата времени. Поскольку скорость испарения пропорциональна площади сорбента, смоченного элюентом, то уменьшение скорости распространения этой области происходит по квадратичному закону. В круговой ТСХ объемную скорость потока легко регулировать. Если не требуется высокая точность, то поток подвижной фазы направляется на пластинку под действием собственной силы тяжести через капиллярную трубку, соединенную с резервуаром. В линейной ТСХ объемную скорость потока регулируют только с помощью насосов, управляемых электрошным устройством, причем для создания градиента используют два насоса.

Химические и физические свойства элюента относительно мало влияют на объемную скорость потока подвижной фазы в круговой ТСХ. Почти для всех жидкостей, применяемых в качестве подвижных фаз, за исключением воды и жидкостей с вязкостью, близкой к вязкости бутанола, объемная скорость элюента изменяется в пределах от 0,4 до 2  $\text{мл}/\text{с}$ . На ВЭТСХ-пластинках для большинства подвижных фаз объемная скорость составляет 1  $\text{мл}/\text{с}$ . Это обусловлено следующими причинами.

Объемная скорость жидкости вдоль сопротивления потоку (тонкой цилиндрической трубки) описывается уравнением Пуазейля:

$$F = \frac{\pi d^4 \Delta p}{8 \eta L} b \text{ мл/мин}, \quad (1.6)$$

где  $d$  — эффективная ширина сопротивления потоку;  $L$  — длина сопротивления потоку;  $p$  — перепад давления, который в ТСХ равен капиллярной силе;  $\eta$  — вязкость подвижной фазы;  $b$  — коэффициент размерности.

При поступлении подвижной фазы на пластинку слой сорбента поглощает ее до тех пор, пока не возникнет сопротивление потоку. Чем больше площадь, через которую подвижная фаза поступает на пластинку, т. е. чем больше  $d$  в уравнении Пуазейля, тем выше объемная скорость на слое сорбента. Количество подвижной фазы, поглощаемое на миллиметр периметра зоны ввода за определенное время (при данной объемной скорости элюента), определяют с помощью функции потока. В связи с этим длина зоны ввода (т. е. диаметр капли) связана с положением точки ввода подвижной фазы.

Пластинку необходимо устанавливать в горизонтальном положении для исключения вибрации, перемещения газовой фазы над слоем сорбента и других возмущений. Для того чтобы привести величину потока в соответствие с оптимальной адсорбционной емкостью слоя, можно менять размер капли.

Для получения оптимальных условий перемещения подвижной фазы при условии постоянства ее химического состава и температуры для гомогенных слоев из одного и того же материала необходимо одинаковое количество подвижной фазы.

Точное положение фронта спустя  $t$  с после того, как израсходована последняя капля из насоса, определяют следующим образом:

1) На пластинке в слое сорбента вырезают круг. Для этого резец диаметром 1,5 мм помещают в отверстие шаблона для нанесения проб в 10 мм от центра пластинки.

2) Измеряют общий объем полученного диска:

$$V_t = D\pi r^2,$$

где  $r$ ,  $D$  — соответственно радиус и толщина диска; эти величины измеряют с помощью лупы и микрометра.

3) Подвижную фазу подают в центр пластинки с относительно небольшой скоростью, приблизительно равной 1 мкл/с. Когда поток достигает периферии диска, наступает так называемое «эффективное» насыщение; «полное» насыщение наступает при дальнейшей подаче элюента на слой до окончательного насыщения. Результаты наблюдений зависят в данном случае от того, испаряется ли подвижная фаза, и если испаряется, то с какой скоростью. Величину потока необходимо регулировать так, чтобы на пластинке всегда была небольшая избыточная капля элюента, которую можно наблюдать через стекло.

4) Величина  $R_f$  фронта растворителя связана со временем подачи и объемом подведенного элюента. При калибровке этой зависимости учитывают потери элюента при испарении.

5) Так как

$$V_t = D\pi r^2 = V_m + V_s,$$

зная  $V_m$ , можно найти объем подвижной фазы в диске после насыщения:

$$V_s = V_t - V_m, \quad (1.7)$$

где  $V_s$  — объем твердой или неподвижной фазы;  $V_m$  — объем подвижной фазы;  $V_t$  — общий объем слоя.

Фазовый коэффициент можно представить как

$$V_s/V_m = A_s/A_m.$$

В последующих вычислениях объем подвижной фазы, соответствующий «эффективному» насыщению  $V_{m(\text{эф})}$ ,

имеет большую величину, поэтому  $A_s/A_m$  в соотношении Мартина изменяется незначительно:

$$\lg \frac{1-R_f}{R_f} = \lg \frac{A_s}{A_m} + \frac{\Delta\mu^0}{RT}. \quad (1.8)$$

Это очень важное уравнение описывает взаимосвязь между структурой вещества и его хроматографическим поведением. Истинную величину  $R_f$  находят сравнением положения фронта, определяемого визуально и рассчитанного теоретически. В связи с этим необходимо учитывать уменьшение или увеличение количества подвижной фазы в зависимости от влажности в камере.

$$Z_{f(\text{ном})} = \sqrt{\frac{Ft(A_s/A_m + 1)}{D\pi}},$$

где  $Z_{f(\text{ном})}$  — номинальное расстояние, пройденное фронтом растворителя в круговой ТСХ спустя  $t$  с после того, как капля израсходована (длина пути разделения);  $F$  — величина потока ( $Ft$  — объем элюента, поданного на слой сорбента);  $A_s/A_m$  — фазовый коэффициент, измеренный при «эффективном» насыщении.

В качестве примера приведем результаты экспериментов, проводившихся на высокоэффективных силикагелевых пластинках (фирма «Merck»), выпущенных в декабре 1974 г. Условия экспериментов были следующие: подвижная фаза — смесь толуола и воды (в соотношении 98 : 2 в весовых процентах); температура 20° С и относительная влажность 40%.

Из результатов, полученных при измерении пластин (табл. 1.1), можно рассчитать толщину слоя сорбента  $D = 0,190 \pm 0,004$  мм. При повторных измерениях микрометром получают стандартное отклонение, равное  $\pm 4$  мкм. Точность микрометра  $\pm 2,5$  мкм. Основная ошибка при измерениях вызвана тем, что в процессе последовательных измерений трудно воспроизвести одно и то же давление на слой сорбента.

Окружность проводили с помощью шаблона для нанесения проб в U-камере (фирма «Camaq») на четырех пластинках размером 50 × 50 мм, закрепленных в держателе. Радиус окружности  $r$ , измеренный тремя различными методами, равен  $10,58 \pm 0,03$  мм. Зная величины  $D$  и  $r$ , можно

Таблица 1.1

Толщина слоя сорбента и стеклянной подложки отдельных ВЭТСХ-пластинок фирмы «Мегек»

Общая толщина пластинок (стекла и слоя сорбента), мм		Толщина стекла, мм
	1,435	1,242
	1,430	1,250
	1,435	1,240
	1,433	1,240
	1,432	1,240
	1,425	1,240
Среднее значение	1,432	1,242
Стандартное отклонение	$\pm 0,0038$	$\pm 0,004$

рассчитать общий объем диска:  $V_t = 0,190\pi (10,58)^2 = 66,75 \text{ мм}^3$ ; ошибка эксперимента составляла 2%. Толуол, бутанол, воду и метанол подавали на слой сорбента со скоростью 1 мкл/с до достижения «эффективного» насыщения. Работу насоса поддерживали до «полного» насыщения (табл. 1.2). При определении расхода подвижной фазы, соответствующего «эффективному» насыщению, подачу элюента с целью повышения точности определения продолжали еще некоторое время, однако полученные величины соответствовали значениям, промежуточным между «эффективным» и «полным» насыщениями. Для четырех различных подвижных фаз объем элюента  $V_m$ , соответствующий «эффективному» насыщению, равен 47,9 мм<sup>3</sup> с разбросом результатов измерений 1%. Разность между объемами элюента, соответствующими «полному» и «эффективному» насыщению слоя, составляла 8,4%. Эта величина не существенна, поскольку в ВЭТСХ эксперименты не проводят при «полном» насыщении.

Так как объем «эффективного» насыщения

$$V_{s(\text{эф})} = V_t - V_{m(\text{эф})} = 66,75 - 47,9 = 18,9 \text{ мм}^3,$$

Таблица 1.2

Определение среднего количества элюента, необходимого для «эффективного» и полного насыщения слоя сорбента

Растворитель	Количество элюента через 50 с после начала подачи, мм <sup>3</sup>			Скорость испарения, мм <sup>3</sup> /мин
	соответствующее «эффективному» насыщению	соответствующее «полному» насыщению, мм <sup>3</sup>		
Толуол	48 48 48	51 53 53	3	
Бутанол	48 48	50 51	1	
Вода	48	53	—	
Метанол	47	55	6	
Среднее значение	$47,9 \pm 0,4$	$52,3 \pm 1,7$		

соответствующее фазовое соотношение

$$A_s/A_m = 18,9/47,9 = 0,395.$$

По этим данным можно рассчитать

$$Z_f(\text{ном}) = \sqrt{\frac{47,9(0,335+1)}{3,142 \cdot 0,190}} = 10,6 \text{ мм}.$$

Разброс этой величины не превышает 2%. Основную ошибку допускают при измерении толщины слоя, которую считают неизменной вдоль всей пластины. Чтобы проверить правильность этого допущения экспериментально, измеряют скорость увеличения площади смоченной области как функцию времени. Линейность этого увеличения можно оценить при условии постоянства объемной скорости потока. При использовании кондиционированных пластинок, равновесных условий и соответствующей подвижной фазы путем фотографирования смоченной области через определенные промежутки времени можно определить  $Z_f$  как функцию времени с точностью до 0,02 мм.

В ходе экспериментов возникало осложнение, связанное с тем, что в течение короткого промежутка времени

в месте подвода элюента образовывалась капля, которая не всасывалась слоем сорбента. Линейное уменьшение объема этой капли соответствует увеличению объема элюента во влажном слое сорбента, который определяется специфическими свойствами подвижной и неподвижной фаз. Эти свойства хроматографической системы вместе с известной или определяемой проницаемостью слоя сорбента обуславливают сопротивление потоку.

На основании вышеизложенного можно показать, что зависимость между площадью смоченной области и временем линейна. Отклонения указывают на систематические ошибки в определении величин, зависящих, например, от времени. Одновременно с этим следует измерять величины, которые не зависят от длины пути элюента, в противном случае необходимо учитывать систематические ошибки. Результаты измерений и расчетов приведены в табл. 1.3.

Таблица 1.3

## Исследование функции потока

Время, с	Площадь смоченной области, мм <sup>2</sup>			Длина пути разделения $Z_f$ , мм	
	измеренная	вычисленная	разность $\Delta$	измеренная	вычисленная
8	69,4	77,2	-7,8	4,7	5,0
23	134,8	136,2	-1,4	6,6	6,6
39	188,7	199,1	-10,4	7,8	8,0
54	254,5	258,2	-3,7	9,0	9,1
68	314,2	313,3	+0,9	10,0	10,0
83	373,3	372,3	+1,0	10,9	10,9
113	490,9	490,3	+0,6	12,5	12,5
143	611,4	608,4	+3,0	14,0	13,9
173	735,4	726,4	+9,0	15,3	15,2
203	855	844,5	+10,5	16,5	16,4
233	962	963	-1,0	17,5	17,5
292	1200	1195	+5,0	19,5	19,5
353	1452	1435	+17,0	21,5	21,4
413	1669	1671	-2,0	23,0	23,1
473	1885	1907	-22,0	24,5	24,6

Изменение объема капли или задержка в распространении смоченной области обусловили то, что спустя 8 с площадь смоченной области оказалась на 7 мм<sup>2</sup> меньше соответствующей рассчитанной области. Коэффициент регрессии для всех величин  $r^2 = 0,9998$ , т. е. между временем и площадью смоченной области существует строго линейная зависимость. Соотношение измеренного расстояния, пройденного фронтом элюента, к вычисленному отличается только в пределах ошибки измерений (0,1 мм). На основании этого можно сделать вывод о строго линейной зависимости между площадью смоченной области и временем. Рассматриваемая область имеет форму круга с отклонениями радиуса в пределах  $\pm 0,5\%$ . Эта величина свидетельствует об однородности слоя сорбента. Следовательно, зная площадь смоченной области, можно с точностью до 0,1 мм вычислить путь фронта растворителя. Как будет показано позже, такая же точность получается при измерении этой величины. Увеличение и уменьшение количества подвижной фазы не имеет значения, что подтверждает идентичность вычисленных (как функция времени) и измеренных величин  $Z_f$ . Ошибки, возникающие в результате предварительного испарения, также незначительны. Условия эксперимента, проводившегося на высокоэффективной силикагелевой пластинке (фирма «Merck») в U-камере, были следующие: растворитель — толуол, температура 20° С, предварительное испарение отсутствовало.

Положение гипотетического вещества с  $R_f = 1,00$  можно измерить или вычислить с точностью до 1% при незначительном продвижении фронта, например на 10 мм. Если в пробе содержится вещество, которое растворяется в подвижной фазе, но не удерживается неподвижной фазой, то его  $R_f = 1,00$ , что является истинным значением.

Поскольку предельное значение  $Z_f$  можно получить точно, все величины  $R_f$  должны быть истинными значениями, что и требовалось доказать. Регулирование потока подвижной фазы на полностью однородном слое сорбента, смачиваемого совершенно симметрично, при практическом отсутствии газовой фазы над слоем, а также точное пространственное и количественное дозирование — все это позволяет улучшить результаты разделения ТСХ. Комплексное использование оптимизированного слоя сорбента

и предлагаемого специального метода позволяет получить надежные и допускающие перенесение данные.

Результаты ВЭТСХ не следует интерпретировать в терминах традиционной ТСХ. Чтобы избежать неправильного толкования, необходимо отметить, что приведенные результаты были получены в серии экспериментов, где в качестве подвижной фазы использовался не только толуол. Для пластинок применяли один сорт сорбента, так как до 1976 г. в продаже не было другого доступного материала.

Применение более летучей подвижной фазы требует изменения условий хроматографического разделения в У-камере; необходимы контроль температуры и определение скорости испарения. Такой метод описан ранее. Для достижения требуемой точности необходимо дальнейшее развитие работ в этом направлении.

#### 1.1.4. Величина $R_f$ как функция длины пути разделения в ВЭТСХ

Описываемые измерения и результаты следует проиллюстрировать практическими примерами. Для определения величины  $R_f$  хроматограмму фотографировали на разных стадиях процесса разделения. Результаты можно интерпретировать следующим образом:

1) для получения воспроизводимых величин  $R_f$  следует предъявлять повышенные требования к методу: необходимо исключить ошибки, связанные с нанесением пробы, выбором и приготовлением фаз, а также ошибки, обусловленные неровностью слоя сорбента;

2) факторы, влияющие на поток подвижной фазы и положение фронта с  $R_f = 1$ , нужно рассматривать с точки зрения их общего влияния на хроматографический процесс;

3) при наличии такого влияния необходимо проверить методами математической статистики, являются ли эти изменения существенными или их можно не учитывать.

Эксперименты проводили в круговой У-камере на тонком слое силикагеля для ВЭТСХ, выпущенного в декабре 1974 г., при следующих условиях: элюент — смесь бензола и воды (98,5 : 1,5 в весовых процентах), объемная скорость

при 20°C 1 мкл/с, относительная влажность при равновесных условиях 40%, величина пробы красного красителя  $10^{-7}$  г. Результаты испытаний приведены в табл. 1.4. Как

Таблица 1.4

Взаимосвязь между значениями  $R_f$ , полученными методами круговой и линейной ТСХ

Время, с	$R_{f\text{кр}}$	Значения $R_{f\text{лин}}$ , вычисленные из $(R_{f\text{кр}})^2$	$Z_f$ (больше 10,0 мм)
68	0,236	0,0557	
113	0,237	0,0562	12,5
173	0,234	0,0548	15,3
233	0,225	0,0506	17,5
292	0,227	0,0515	19,5
353	0,230	0,0529	21,5
413	0,230	0,0529	23,0
473	0,234	0,0548	24,5

видно из таблицы, для восьми различных хроматограмм среднее значение  $R_{f\text{кр}} = 0,232 \pm 0,004$ , а среднее значение  $R_{f\text{лин}} = 0,0537 \pm 0,002$ . Таким образом, изменений в протекании хроматографического процесса не обнаружено.

В данном случае важна не воспроизводимость величин  $R_f$ , определяемых путем измерения положения максимума кольца и линии фронта, а повторные измерения различных хроматограмм. Поэтому в последнем случае легко заметить любые искривления фронта, превышающие утроенное стандартное отклонение ( $\pm 0,015$ ). В этом случае можно было бы обнаружить определенную тенденцию. Однако в приведенных выше результатах никаких тенденций обнаружено не было. В круговой ВЭТСХ величины  $R_f$  в области 0,2 воспроизводимы с точностью  $\pm 2\%$ , при  $R_f = 0,5$  воспроизводимость равна  $\pm 1\%$ .

Следовательно, переход к величинам  $R_f$ , полученным в линейном варианте ТСХ, которые служат основой для определения  $k$  и других параметров, является правомерным.

### 1.1.5. Связь между величинами $R_f$ , полученными круговым методом, и истинными величинами $R_f$ , определенными линейным методом

В соответствии с данными Гейсса [1]

$$R_{f \text{ лин}} = (R_{f \text{ кр}})^2.$$

Некоторые исследователи сомневаются в правильности этого уравнения. Для его подтверждения пользуются ВЭТСХ, дающей исключительно точные результаты. Для проведения экспериментов необходима камера для линейного разделения, с помощью которой можно было бы получить результаты с точностью, аналогичной точности, получаемой в круговой камере. Однако такую L-камеру пока только разрабатывают в Институте хроматографии (Bad Dürkheim, BDR) (1976). После ее разработки можно будет получать воспроизводимые данные.

*Величины  $R_f$ , полученные при линейном разделении в микрокамере N-типа*

Микрокамера N-типа значительно дороже классической N-камеры, однако затраты вполне окупаются благодаря ускорению разделения и повышению точности результатов.

*Величины  $R_f$ , полученные круговым методом в U-камере*

Для сравнения обоих методов проводили разделение сложной смеси, состоящей из компонентов R, B, G, V. В качестве элюента использовали толуол, в качестве сорбента ВЭТСХ-слой, изготовленный в 1974 г. Результаты разделения приведены в табл. 1.5.

*Выводы*

При совпадении точки старта и центра круговой хроматограммы наблюдается строгое соответствие между величинами  $R_f$ , полученными линейным и круговым методами.

Таблица 1.5

### Результаты анализа смеси красителей

	Линейная ТСХ		Круговая ТСХ			
	нанесение на стартовую линию $R_f = 0$		$R_f = (R_{f \text{ кр}})^2$ нанесение пробы точно в место подвода элюента		эксцентрическое нанесение	
R	0,12	0,12	0,12	0,12	0,06	0,04
B	0,20	0,20	0,20	0,20	0,13	0,10
G1	0,36	0,35	0,36	0,35	0,26	0,22
G2	0,44	0,45	0,44	0,44	0,31	0,32
V1	0,53	0,52	0,53	0,53	0,40	0,39
V2	0,76	0,76	0,78	0,79	0,66	0,71

При нанесении пробы на некотором расстоянии от центра (эксцентрическом нанесении) можно проследить определенное сходство между хроматограммами, получаемыми круговым и линейным методами. Из экспериментальных данных следует также, что возможным источником ошибок при определении величин  $R_f$  линейной ТСХ является изменение положения фронта элюента. В связи с этим представляется не случайным несоответствие между значениями  $R_{f \text{ лин}} = 0,76$  и  $R_{f \text{ кр}} = 0,78$  для красителя V2. Вероятно, правильным следует считать значение 0,785. Однако эти замечания не носят принципиального характера, поскольку целью экспериментов было подтверждение методом круговой ВЭТСХ уравнения

$$R_{f \text{ лин}} = (R_{f \text{ кр}})^2. \quad (1.9)$$

Место нанесения пробы и место подвода элюента должны совпадать, что налагает некоторые ограничения на методику разделения. Хорошо известно, что вещество, находящееся в избыточном количестве элюента, не продвигается в направлении разделения по слою сорбента, а диффундирует во всех направлениях. ВЭТСХ-слой характеризуется относительно большим сопротивлением потоку. Это приводит к тому, что в месте подвода элюента возникает капля, и, как следствие, к образованию «слепых» зон. В связи с этим необходимо выполнять ряд условий:



1) При использовании кругового метода начало разделения методом ВЭТСХ следует проводить при минимальном потоке элюента.

2) Чтобы предотвратить образование «слепых» зон в капле, надо чередовать подачу и прекращение подвода элюента к слою сорбента. Эту операцию легко автоматизировать, что позволяет предотвратить возникновение ошибок в начале разделения.

Указанными приемами целесообразно пользоваться в следующих случаях:

а) когда истинные величины  $R_f$  нужны для других аналитических методов;

б) при получении информации о структуре вещества;

в) при совместном применении ТСХ и других аналитических методов;

г) в случае, когда значения  $R_f$  не превышают 0,1, т. е. когда круговая ТСХ имеет определенные преимущества по сравнению с линейной.

При проведении массовых анализов методом микрокруговой ТСХ можно пользоваться постоянными поправочными коэффициентами, зависящими от диаметра стартового круга для  $R_f = 1$ , которые можно рассчитать для каждого значения  $R_{fкр}$ . В этом случае пробу наносят строго по окружности с помощью шаблона U-камеры фирмы «Camag» или кругового аппликатора фирмы «Eva-chrom» (гл. 4). Образование капель в месте подвода элюента перестает оказывать влияние на процесс разделения, так как диаметр окружности больше диаметра капли.

Очевидно, высокая точность данных целесообразна только в том случае, если она сочетается с максимальной эффективностью разделения на слое сорбента и если пробы наносят в виде пятен или окружностей минимальных размеров.

Одним из практических аспектов качественного и количественного определения с помощью ТСХ является прямая связь между диаметром стартового пятна и эффективностью разделения, а также конечными результатами. Практический интерес представляет величина нижнего предела разности между двумя значениями  $R_f$  соседних веществ, при котором ошибки системы становятся ощутимыми. С точки зрения экономики важным фактором

анализа является длина пути разделения, связанная квадратичной зависимостью с временем разделения и линейной зависимостью с разделительной способностью.

Далее изложим в упрощенном и сжатом виде основы теории, которая поможет ответить на поставленные вопросы, используя минимум измерений и вычислений.

## 1. 2. Характеристики разделения ВЭТСХ

В других видах хроматографии число разделений является установившимся понятием. Этот простой параметр в известной степени не зависит от конкретной методики определения. Его можно измерить с достаточной точностью, легко регулировать, относить к другим условиям и оптимизировать.

### 1.2.1. Число разделений

**О п р е д е л е н и е.** Число разделений — это число веществ, которое можно полностью разделить между линией старта ( $R_f = 0$ ) и фронтом элюента ( $R_f = 1$ ), если хроматографические условия вдоль пути разделения постоянны. Для уточнения отметим, что в количественной хроматографии число разделений определяют как максимальное число полностью разделенных веществ, соответствующее интервалу значений коэффициента  $k$  от 0 до 10 или интервалу значений  $R_f$  от 1,00 до 0,091.

Два вещества считаются разделенными полностью, когда расстояние между вершинами двух соседних пиков равно сумме ширины этих пиков на половине их высоты. Для определения ширины пиков на половине высоты используют линию линейной регрессии.

### 1.2.2. Определение числа разделений

В первом приближении (использование более сложной формулы ведет к некоторому завышению результатов, см. гл. 4) число разделений равно

$$SN = \frac{z_f}{b_0 + b_1} - 1, \quad (1.10)$$

где  $Z_f$  — расстояние, пройденное фронтом элюента;  $b_0$  — полученная экстраполяцией ширина на половине высоты пика, соответствующего пятну на линии старта;  $b_1$  — экстраполированная ширина пятна при  $R_f = 1$  (экстраполяцию проводили так, как это показано на рис. 1.1).

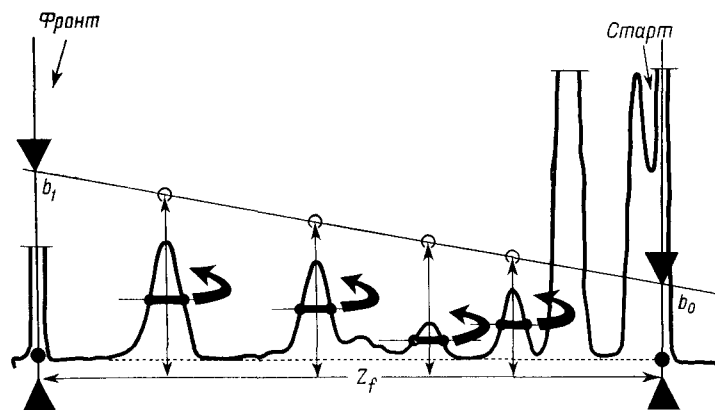


Рис. 1.1. Определение величин  $b_0$  и  $b_1$  экстраполяцией.

Над значениями  $Z$  откладывают ширину пиков  $b_{0,5}$ , измеренных на половине высоты, в увеличенном масштабе с последующим экстраполированием к  $b_1$  и  $b_0$ .

Число разделений можно достаточно легко определить даже в том случае, если в анализируемую смесь не входят вещества, необратимо сорбирующиеся на линии старта, или вещества, не сорбирующиеся вообще и продвигающиеся вместе с фронтом элюента. Линейную интерполяцию проводят графическим путем или рассчитывая соответствующие величины с помощью, например, карманного счетного устройства.

Результаты измерений и расчеты числа разделений, соответствующие как линейной, так и круговой ТСХ, представлены в табл. 1.6.

Линейная регрессия показывает, что величина  $b$  вещества 1 не коррелирует с другими величинами. Это связано с перегрузкой веществом 1 тонкого слоя сорбента, что подтверждает исследование хроматограммы. Следовательно, ширина пика на половине высоты определяется обменными процессами в ходе хроматографического разделения и не зависит от размеров стартового пятна или диффузии,

Таблица 1.6

Изменение ширины зоны разделяемых веществ в зависимости от длины пути разделения

Вещество	Ширина зоны на половине высоты пика $b$ , полученного при оптическом сканировании, мм	Длина пути разделения в том же масштабе, как и $b$ , мм
1	(4,8)	19
2	4,8	30,5
3	5,6	47,6
4	6,4	70,5
5	7,2	101
6	$b_1$	127

Примечание. В скобках даны величины, полученные расчетным путем

являющейся функцией времени. Необходимо учитывать не только возможность перегрузки тонкого слоя сорбента веществом, но и такие особенности, как нелинейность преобразования сигнала фотометра, определяющего поверхностную концентрацию ( $\text{г/мм}^2$ ), в сигнал регистратора или интегратора устройства для обработки данных. Для выявления источника ошибок следует провести серию экспериментов, не ограничиваясь одним определением. При построении линии линейной регрессии используют только правильно определенные величины. Графическое построение сразу же выявляет несоответствие какой-либо величины другим. В табл. 1.7 сопоставлены измеренные и рассчитанные значения ширины пиков на половине высоты.

В интервале значений  $SN$  от 20 до 40, получаемом с помощью ВЭТСХ, наблюдается неполное разделение. На одной пластинке можно удовлетворительно определить не более 18 веществ. Точность определения  $R_f$  зависит от числа разделений  $SN$ . Разность значений  $R_f$  для двух смежных последовательных и полностью разделенных веществ обычно обозначают как  $\Delta R_f$ :

$$\Delta R_f = \frac{1}{SN+1} \cdot \quad (1.14)$$

Таблица 1.7

Взаимосвязь между измеренными и рассчитанными величинами  $b$  разделяемых веществ

Вещество	Величина $b$	
	измеренная	рассчитанная; методом линейной регрессии
«0»	$(b_0)$	3,9
1	(4,8)	4,5
2	4,8	4,9
3	5,6	5,5 (коэффициент регрессии равен 0,98)
4	6,4	6,3
5	7,2	7,3
«1»	$b_1 = ?$	8,2

Примечание. Число разделений  $= \frac{127}{3,9+8,2} - 1 = 9,5$ .

Применительно к вышеуказанным данным

$$\Delta R_f = \frac{1}{10,5} = 0,10.$$

Минимальная разность величин  $R_f$  для двух последовательных и полностью разделенных зон равна 0,05.

Для правильного определения числа разделений  $SN$  необходимо отсутствие градиента условий во время ТСХ-разделения. Изменять поток элюента нужно постепенно.

### 1.2.3. Высота тарелки и число разделений в ТСХ

Существует мнение, что использование теории тарелок применительно к ТСХ является бессмысленным. По мнению авторов, применение понятия высоты тарелки имеет смысл и, полезно при сравнении хроматографических свойств покрытий и элюентов в ходе их оптимизирования.

В связи с тем, что математическое описание процесса не обязательно должно иметь практическую пользу, авторам хотелось бы предостеречь читателей от переоценки возможностей использования понятий высоты теоретической и эффективной тарелок. Высота тарелки или число

тарелок зависит от диффузионных процессов, которые приводят к размыванию зон образца. Это распространяется на любой хроматографический метод и проиллюстрировано рис. 1.2 для постоянных условий разделения.

Отношение  $t/b$  является основой для следующих выражений:

$$\begin{aligned} \text{число эффективных тарелок} & n = (t_s/b_{0,5})^2 \cdot 5,54, \\ \text{число теоретических тарелок} & N = (t_{ms}/b_{0,5})^2 \cdot 5,54, \\ \text{высота эффективной тарелки} & h = L/n, \\ \text{высота теоретической тарелки} & H = L/N, \end{aligned}$$

$L$  — длина пути разделения, мм;  $N$  — число теоретических тарелок, безразмерная величина;  $n$  — число эффективных тарелок, безразмерная величина;  $H$  — высота теоретической тарелки, мм;  $h$  — высота эффективной тарелки, мм;  $t_{ms}$  — общее время удерживания, мм;  $t_s$  — чистое время удерживания ( $t_s + t_m = t_{ms}$ ), отличающееся от общего времени удерживания на мертвое время  $t_m$ ; время ТСХ-разделения;  $b_{0,5}$  — ширина пика на половине высоты;  $b_{0,5}$  — величины пятен или колец, полученные после построения линии регрессии. Размерность (мм) берется в том же масштабе, как и для времени или соответствующих участков разделения.

Следует подчеркнуть, что временные величины регистрируют быстрым линейным сканированием ТС-хроматограмм вдоль направления перемещения зон анализируемых веществ.

Соотношение  $t/b$  зависит от величины  $t$ , как это следует из рис. 1.2. Поскольку исследователи-теоретики не имеют

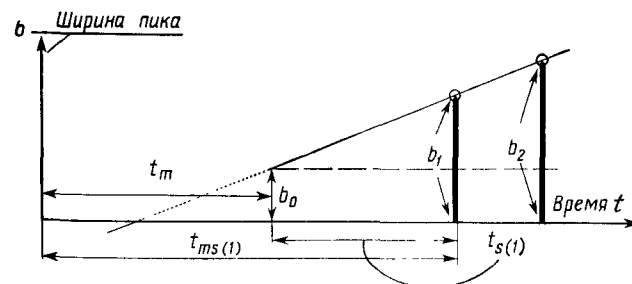


Рис. 1.2. Определение ВЭТТ в ТСХ при постоянных условиях разделения.

дела с практической стороны рассматриваемой проблемы, то они не учитывают, что каждый анализ требует расхода материалов и времени (см. рис. 1.3). Связь между величинами  $t$  и  $b$  следует представлять в виде

$$\frac{t_{s(a)}}{b_a - b_0} = \frac{t_{s(c)}}{b_c - b_0},$$

а не так, как это делают обычно:

$$t_a/b_a = t_c/b_c.$$

Приведенное выражение показывает, что нанесение пробы проводят на определенном участке сорбента и эта операция занимает некоторый промежуток времени. Кроме того, соотношение  $t/b$  является мерой разделительной мощности и разделительной способности данной хроматографической системы вне зависимости от действительного времени удерживания вещества.

В связи с этим отпадает необходимость в использовании понятий «теоретической» и «эффективной» тарелок. Вместо них целесообразно ввести понятие числа истинных тарелок:

$$N_{\text{ист}} = \left( \frac{t_s}{b - b_0} \right)^2 \cdot 5,54 \quad (1.12)$$

и высоты истинной тарелки, которая не зависит от природы конкретного вещества:

$$H_{\text{ист}} = L/N_{\text{ист}}.$$

Величины  $N_{\text{ист}}$  можно определить методом линейной регрессии или при помощи соответствующих коэффициентов регрессии. Для описания хроматографической системы не следует использовать некорректные величины и линейные приближения зависимостей, которые подчас не являются линейными. Разработанная автором новая концеп-

ция [2], предложенная им в 1959 г., была проверена в сопоставимых условиях различными хроматографическими методами (газовый, колоночный жидкостной и ТСХ варианты). Тем самым были разрешены теоретические «проблемы интерпретации».

Как было установлено ранее,

$$SN + 1 = \frac{Z_f}{b_0 + b_1},$$

$$N_{\text{ист}} = (Z_f/b_1 - b_0)^2 \cdot 5,54, \quad (1.13)$$

где  $N_{\text{ист}}$  — число истинных тарелок для вещества с  $R_f = 1,00$ . Из предыдущего уравнения можно получить

$$SN = \left( 0,425 \sqrt{N_{\text{ист}}} \cdot \frac{b_1 - b_0}{b_1 + b_0} \right) - 1. \quad (1.14)$$

Так как

$$H_{\text{ист}} = L/N_{\text{ист}}$$

и применительно к ТСХ  $H_{\text{ист}} = Z_f/N_{\text{ист}}$ , число разделений можно выразить так:

$$SN = \left( 0,425 \sqrt{\frac{Z_f}{H_{\text{ист}}}} \cdot \frac{b_1 - b_0}{b_1 + b_0} \right) - 1. \quad (1.15)$$

Анализируя эти выражения, можно сделать ряд выводов. Для веществ с  $R_f = 1,00$ , продвигающихся при разделении на максимальное расстояние, определение числа тарелок имеет важное значение. При этом, производя вычисления по соответствующему уравнению регрессии или путем графических построений, можно достаточно точно определить величины  $b$  ( $b_1 - b_0$ ).

#### 1.2.4. Разрешение, селективность, разделительная способность

Ширина двух соседних пиков определяет селективность системы, необходимой для полного разделения. Селективность системы можно определить как отношение величины  $R_f$ .

Величина селективности для двух веществ  $\beta$ ,  $\alpha =$

$$= \frac{R_{f\beta}}{R_{f\alpha}} > 1. \quad (1.16)$$

Ширина пика зависит от длины пути разделения:

$$b_\alpha = Z_\alpha \frac{b_1 - b_0}{Z_f} + b_0,$$

где  $Z_\alpha$  — расстояние, на которое переместилось вещество  $\alpha$ ;  $Z_f$  — расстояние, на которое переместился фронт элюента.

Расстояние между двумя веществами  $\alpha$  и  $\beta$  можно представить как

$$Z_\beta - Z_\alpha.$$

Это расстояние можно также рассматривать как кратное соответствующей ширине пика (рис. 1.4):

$$R \cdot (b_\alpha - b_0) = Z_\beta - Z_\alpha.$$

Высоту тарелки можно рассчитать при этих же условиях. Зная  $SN$ , рассчитывают минимальную длину пути разделения в соответствии с величинами  $R_f$  для разделения веществ. Число разделений зависит одновременно от свойств элюента и сорбента. Эта величина определяется

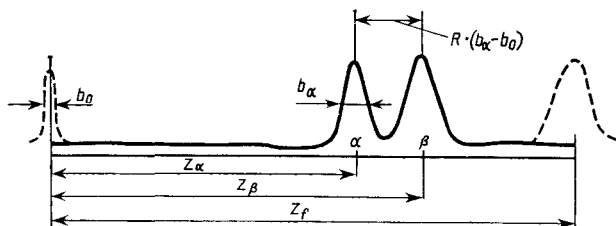


Рис. 1.4. К определению величины разрешения.

высотой тарелки, т. е. материалом покрытия, и шириной исходного пятна  $b_0$ , которая в свою очередь зависит от техники нанесения. Параметры эксперимента следует рассматривать в целом. Использование ВЭТСХ позволяет быстро проводить предварительные эксперименты. Соответствующие расчеты менее трудоемки, более изящны, более адекватны решаемой задаче и более эффективны, чем методики обработки результатов в обычной ТСХ.

Выражение  $(b_1 - b_0)/(b_1 + b_0)$  имеет практическую ценность. Его величина не зависит от природы конкретного

вещества, но определяется способом нанесения пробы и поэтому может служить важным критерием для оценки качества проведения этой операции. При проведении операции нанесения пробы необходимо, чтобы  $b_0$  и  $b_1$  имели минимальные значения.

Следующие выражения можно привести без дополнительных комментариев. Число истинных тарелок, соответствующее длине пути фронта элюента ( $R_f = 1,00$ ):

$$N_{\text{ист}} = \left( \frac{SN+1}{0,425} \cdot \frac{b_1+b_0}{b_1-b_0} \right)^2, \quad (1.17)$$

$$N_{\text{ист}} = \left( \frac{Z_f}{b_1-b_0} \right)^2 \cdot 5,54. \quad (1.18)$$

Для высоты истинной тарелки слоя запишем

$$H_{\text{ист}} = Z_f \left( \frac{0,425}{SN+1} \cdot \frac{b_1-b_0}{b_1+b_0} \right)^2. \quad (1.19)$$

Минимальный путь разделения  $Z_f$ , необходимый для достижения конечного числа разделений  $SN$  для данного слоя, характеризующегося высотой тарелки  $H_{\text{ист}}$ , связано с величинами  $SN$  и  $H_{\text{ист}}$  уравнением

$$Z_f = \sqrt{H_{\text{ист}}} \left( \frac{SN+1}{0,425} \cdot \frac{b_1-b_0}{b_1+b_0} \right)^2. \quad (1.20)$$

Проводя разделение при оптимальных условиях, целесообразно характеризовать процесс параметром селективности, с помощью которого можно наиболее эффективно управлять разделением.

При данном сорбирующем материале условия разделения можно оптимизировать соответствующим выбором элюента, а точнее, химического состава элюента, обеспечивающего удовлетворительное разделение за минимально короткое время.

Так как

$$R_{\beta, \alpha} = (Z_\beta - Z_\alpha) \cdot \frac{1}{b_\alpha - b_0}$$

и

$$N_\alpha = \left( \frac{Z_\alpha}{b_\alpha - b_0} \right)^2 \cdot 5,54,$$

то

$$\frac{1}{b_{\alpha} - b_0} = \frac{V\sqrt{N_{\alpha}}}{Z_{\alpha}} \cdot 0,425.$$

Число истинных тарелок не зависит от конкретных значений  $Z$ , следовательно,  $N_{\alpha} = N_{\text{ист}}$  и

$$N_{\alpha} = N_{\text{ист}} = \left( \frac{SN+1}{0,425} \cdot \frac{b_1+b_0}{b_1-b_0} \right)^2.$$

Исходя из этих выражений, запишем

$$R_{\beta, \alpha} = \left( \frac{Z_{\beta}}{Z_{\alpha}} - 1 \right) \frac{b_1+b_0}{b_1-b_0} (SN+1).$$

С помощью этого уравнения выведем основное уравнение для тонкослойной хроматографии:

$$R_{\beta, \alpha} = \left( \frac{R_{f\beta}}{R_{f\alpha}} - 1 \right) \frac{b_1+b_0}{b_1-b_0} (SN+1) \quad (1.21)$$

или

$$R_{\beta, \alpha} = \left( \frac{R_{f\beta}}{R_{f\alpha}} - 1 \right) \sqrt{\frac{Z_f}{H_{\text{ист}}}}. \quad (1.22)$$

Как видно из приведенных уравнений, для получения удовлетворительных результатов разделение следует проводить при минимальной длине пути элюата  $Z_f$ , т. е. за минимальное время, на высококачественном слое сорбента, характеризующегося низким значением  $H_{\text{ист}}$ . Наилучшие результаты получают на ТСХ-системах с высокой селективностью по отношению к разделяемым веществам  $\alpha$  и  $\beta$ . Другими словами, можно утверждать, что, сочетая достаточно высокое число разделений и оптимальный вариант методики дозирования с наиболее высокой селективностью, можно получить отличные результаты разделения.

Практический интерес представляет количественная характеристика качества нанесения:

$$Q_D = \frac{b_1 - b_0}{b_1 + b_0}.$$

Для иллюстрации этого соотношения допустим, что величина  $b_0$  составляет 1, 5, 10, ..., 40% величины  $b_1$  и ширина пятна на старте характеризуется такими же относительными размерами, как и зона вещества с  $R_f = 1,00$  в конце анализа, которые, естественно, определяют с помощью линий регрессии. Увеличение величины  $Q_D$  всегда ведет к ухудшению разделения. Соотношение между величиной  $b_0$  и качеством нанесения можно проследить на следующем примере:

$(b_0/b_1)$ 100 %	0,7	1,3	2,5	5	10	20	40
$Q_D$	0,99	0,97	0,95	0,91	0,82	0,67	0,43

### Выводы

Величина фактора  $Q_D$  существенно влияет на конечные результаты анализа, в связи с чем незначительное отклонение от методики нанесения значительно снижает эффективность разделения даже на высококачественном сорбенте. Зоны веществ с высокими значениями  $R_f$  менее подвержены размыванию, чем зоны веществ с низкими значениями  $R_f$ , что является хорошо известным фактом, в особенности применительно к круговой ТСХ. Следует подчеркнуть, что величина  $b_0$  даже при нанесении пробы обычным способом может достигать 80% величины  $b_1$ , или эффективного значения  $Q_D = 0,11$ .

В связи с тем, что в этой главе не обсуждалось влияние свойств различных элюентов на результаты анализа, читателю целесообразно обратиться к книге Гейсса [1], где разобраны основные концепции и важные параметры ТСХ.

Большинство результатов, представленных в настоящей главе, получены в ходе анализа красителей на тонких слоях силикагеля. При этом сделано допущение, что выявленные зависимости справедливы и для других классов соединений, анализ которых, по-видимому, скоро также будут проводить на ВЭТСХ-слоях окиси алюминия или на пластинках, предназначенных для стабильного разделения методом с обращенными фазами.

В ходе изложения были использованы величины, включающие в свой состав параметры времени и требую-

щие представления в линейном виде, например,  $k = t_s/t_m$ . Для лучшего понимания проблемы следует помнить, что эти величины являются производными по отношению к длине пути разделения. Функцию потока следует рассматривать с этих же позиций. Понятия, введенные в данной главе, в особенности концепцию, связанную со временем, можно использовать во всех остальных хроматографических методах. Многоплановость такого исследования представляется полезной.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geiss F., «Die Parameter der Dünnschicht Chromatographie, eine moderne Einführung in Grundlagen und Praxis», published by Friedr. Vieweg + Sohn Braunschweig, now Wiesbaden, BDR (1972).
2. Kaiser R. E., Gas-Chromatographie, Akademische Verlagsgesellschaft, Geest & Portig KG, Leipzig (1960) 23, Bibliographisches Institut AG, Mannheim (1960) 41.

## ЧИСЛО РАЗДЕЛЕНИЙ В ЛИНЕЙНОЙ И КРУГОВОЙ ТСХ

Ж. Блом

Blome J., Lerchenweg 7, D-7919 Au/Iller, BDR

### 2.1. Ширина стартового пика $b_0$

Настоящий раздел в основном посвящен математическому описанию фактора разделения в круговой ТСХ. Согласно Кайзеру (гл. 1), расширение зоны в ТСХ является в первом приближении функцией длины пути разделения (в противоположность колоночной жидкостной хроматографии, где длина пути разделения одинакова для всех веществ). В связи с тем, что в ТСХ время разделения всех веществ одинаково, влияние диффузии (член  $B$  в уравнении Ван Деемтера) одно и то же для всех веществ. В отличие от ТСХ в ЖКХ вещества характеризуются разными временами удерживания и пропорциональными «длительностями диффузии» или размывания пиков.

Таким образом, коэффициент диффузии и ширина стартового пика характеризуются постоянными численными значениями. Они обуславливают размывание зон, зависящее от расстояния, на которое эти зоны перемещаются. Разница в размерах пятен до и после разделения при  $R_f = 0$ , измеренная или вычисленная соответствующим экстраполированием, является мерой «диффузии покоя». В последующем изложении термин  $b_0$  — ширина зоны или пика, полученного при оптическом сканировании, — следует рассматривать «как сумму ширины стартового пятна и величины диффузии покоя». Для получения хорошего разделения важно, чтобы оба фактора оставались незначительными по величине. Величины этих двух факторов зависят от времени анализа (разделение ухудшается при возрастании длительности процесса) и от скорости диффу-

зии вещества по отношению к неподвижной фазе. Целесообразно ограничиться оценкой средних величин, так как незначительные различия нивелируются такими характеристиками отдельных веществ, как, например, концентрация и т. д.

Отрицательное влияние на ТСХ-разделение такого важного фактора, как температура, общеизвестно, и чтобы его предотвратить, обычно принимаются соответствующие меры. Температура отрицательно влияет на разделение во всех видах жидкостной хроматографии, за исключением ионообменной.

Ширина стартового пятна и зависящая от времени молекулярная диффузия являются дополняющими друг друга членами геометрической прогрессии, описывающей расстояние, необходимое для разделения веществ от линии старта до фронта элюента. Допустим, что разрешение для всех анализируемых веществ составляет 4,7  $\sigma$ , т. е. разность величин  $R_f$  всех следующих друг за другом веществ ( $R_{f(m+1)} - R_{f(m)}$ ) равна сумме ширины их пиков на половине высоты ( $R_{f(m+1)} - R_{f(m)} = b_{m+1} + b_m$ ). В этом случае число разделений можно определить как максимальное возможное число веществ, которые полностью разделяются на участке, заключенном между  $R_f = 0$  и  $R_f = 1$  в отсутствие градиента условий вдоль пути разделения, или, другими словами, как число членов геометрической прогрессии.

## 2.2. Расчет числа разделений в линейной ТСХ

После окончания процесса разделения в линейной ТСХ ширины пиков, смежных со стартовым пятном и фронтом элюата, экстраполируют к значениям  $R_f = 0$  и  $R_f = 1$ . Соответствующие ширины пиков на половине высоты,  $b_1$  и  $b_0$ , откладывают по оси ординат (рис. 2.1) над абсциссами величин  $R_{f0}$  и  $R_{f1}$ . Если продолжить прямую линию, проходящую через точки  $b_1$  и  $b_0$ , до пересечения с осью абсцисс, а расстояние между точками  $R_{f0}$  и  $R_{f1}$  принять равным единице, то для отрезка прямой от точки пересечения до точки  $R_{f1}$  можно записать

$$v = \frac{b_1}{b_1 - b_0}. \quad (2.1)$$

Членом  $v$  пользуются для подсчета ширины ( $2b_n$ ) зоны, примыкающей к фронту:

$$2b_n = \frac{2b_1 \cdot v}{b_1 + v}, \quad b_n = \frac{b_1}{1 + b_1 - b_0}. \quad (2.2)$$

Что касается методики измерения, то в качестве первого члена геометрической прогрессии целесообразнее использовать ширину последнего пика. Число членов соответствует числу разделений, а сумма членов — длине пути разделения (равной 1). Коэффициент прогрессии вычисляют по уравнению

$$q = \frac{v - 2b_n}{v}. \quad (2.3)$$

В уравнение подставляют члены  $b_0$  и  $b_1$  и логарифмируют все выражение. Затем уравнение подставляют в сумму прогрессии

$$S = a \frac{q^n - 1}{q - 1}$$

и получают число разделений в линейной ТСХ

$$SN = \frac{\lg \frac{3b_0 - 2b_1 - b_0^2 + b_1 b_0}{b_0(1 + b_1 - b_0)}}{\lg \frac{1 - b_1 + b_0}{1 + b_1 - b_0}}. \quad (2.4)$$

Результаты, полученные из выражения (2.4), отличаются от результатов, подсчитанных по уравнению  $1/(b_0 + b_1) -$

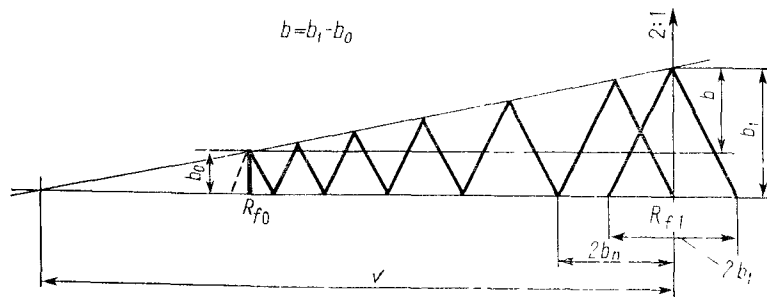


Рис. 2.1. К расчету числа разделений.

— 1, предложенному Кайзером. Расхождение между этими уравнениями возрастает с увеличением разности  $b_1 - b_0$ . В табл. 2.1 представлены числа разделений в зави-



симости от  $b_0$ , а также от  $b_1 - b_0$ . В скобках указаны значения, рассчитанные по уравнению Кайзера. В таблице представлены основные параметры, определяющие число разделений в линейной ТСХ: качество пластинки ( $b_1 - b_0$ ) выражается размытием зоны в зависимости от длины пути разделения и ширины стартового пика. Уменьшение  $b_0$  ведет к увеличению числа разделений. В редких случаях удается получить ширину стартового пятна (сумма ширины стартового пятна и приращения ширины за счет диффузии, зависящей от времени) менее 1—2% длины пути разделения. Значительно легче получить числа разделений, заключенные в рамку (табл. 2.1), особенно в тех случаях, когда не применялись специальные методики и материалы, такие, как, например, ТСХ-пластинки с тончайшим «пленочным» сорбирующим покрытием, разработанные Кремер.

### 2.3. Пространственно-диффузионная модель

Ранее проведенный расчет числа разделений [уравнение (2.4)] основывался на допущении пропорциональности размытия стартового пятна длине пути разделения. Большие преимущества, по-видимому, предоставляет использование трехмерной сферической модели диффузии, в которой распространение зоны в направлении, перпендикулярном поверхности, ограничено толщиной слоя сорбента. Представляется целесообразным использовать вместо сферической пространственной модели диффузии цилиндрическую модель равного объема; высота цилиндра определяется толщиной слоя сорбента  $D$ , а радиус — шириной пика, измеренной на половине высоты. Ширина стартового пика  $b_0$  соответствует радиусу  $d_0$  сферической модели диффузии, а ширина  $b_1$  конечного пика вблизи фронта — радиусу  $d_1$ . Допустив линейное возрастание ширины пиков от  $d_0$  до  $d_1$  по аналогии с возрастанием  $b_0$  и  $b_1$ , можно подсчитать соответствующие исправленные величины ширины пиков (величины  $b'$ ). Если на графике отложить значения  $b'$ , за исключением значений  $b'_0$  и  $b'_1$ , идентичных  $b_0$  и  $b_1$ , то через полученные точки можно провести дугу, расположенную ниже прямой линии (рис. 2.2). Рассчитаем величины  $d_0$  и  $d_1$ :

$$4/3 d_0^3 \pi = b_0^2 D \pi,$$

Таблица 2.1

		Зависимость числа разделений от $b_0$ и $b_1 - b_0$				
		0,02	0,03	0,05	0,07	0,1
$b_1 - b_0$	$b_0$					
0,01	0,01	27,5 (24,0)	23,1 (19,0)	17,9 (13,3)	14,8 (10,1)	11,9 (7,3)
0,02	0,02	17,3 (15,6)	13,3 (13,3)	12,5 (10,1)	10,7 (8,1)	8,9 (6,1)
0,03	0,03	12,8 (11,5)	11,6 (10,1)	9,8 (8,1)	8,6 (6,7)	7,3 (5,3)
0,05	0,05	8,4 (7,3)	7,8 (6,7)	6,9 (5,7)	6,2 (4,9)	5,5 (4,0)
0,08	0,08	5,6 (4,6)	5,3 (4,3)	4,9 (3,8)	4,5 (3,3)	4,0 (2,9)

Таблица 2.2

		Влияние ширины стартового пика, ширины пика у фронта элюента и толщины слоя сорбента на число разделений						
$b_0$	$b_1$	$D$	$d_0$	$d_1$	$b_{0,5}$	$SN$	$SN'$	
0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	
0,12	0,12	0,12	0,11	0,11	0,07	0,07	0,06	
0,025	0,001	0,005	0,025	0,025	0,005	0,025	0,005	
0,0196	0,0067	0,0072	0,0123	0,0123	0,0115	0,0196	0,0072	
0,0646	0,0224	0,0357	0,0610	0,0610	0,0264	0,0451	0,0238	
0,0631	0,0631	0,0515	0,0513	0,0513	0,0425	0,0425	0,0354	
8,93	8,93	11,94	11,94	12,52	12,52	17,9		
9,45	9,43	13,11	13,11	12,9	12,9	19,0		

следовательно

$$d_0 = (b_0^3 \cdot 3/4 D)^{1/3} \quad (2.5)$$

и

$$d_1 = (b_1^3 \cdot 3/4 D)^{1/3}. \quad (2.5a)$$

Уравнение дуги представим в следующем виде:

$$b' = \left[ \frac{4(d_0 + dR_f)^3}{3D} \right]^{1/2} \quad (2.6)$$

Расчет регрессии (расчет частичного расстояния продвижения от  $R_{f1}$  до  $R_{f0,5}$  и от  $R_{f0,5}$  до  $R_{f0}$  из  $b'$ ) при  $R_{f0,5}$  указывает на отклонение числа разделений  $SN'$  от величины, полученной из уравнения (2.4). Это отклонение зависит от ширины стартового пика и ширины пика  $y$  фронта

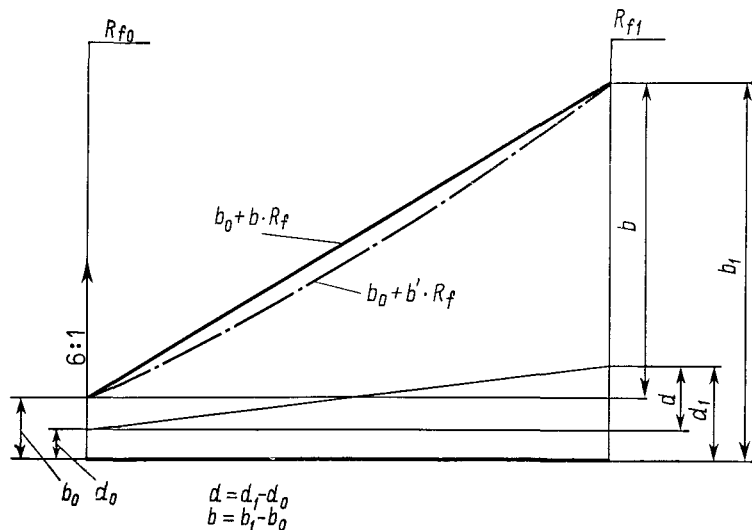


Рис. 2.2. К расчету исправленных величин ширины пиков.

элюента, но не зависит от толщины слоя сорбента, как это видно из табл. 2.2

Поскольку на графике дуга, соответствующая значениям  $b'$ , находится под прямой, соответствующей значениям

$b$ , величины  $SN'$  несколько завышены (приблизительно 1% соотношения  $b_1/b_0$ ). Эта поправка существенна только в том случае, если на слой сорбента с низкой эффективностью нанесли пятно малых размеров, что маловероятно.

Пространственная диффузионная модель основана на законах диффузии Вант-Гоффа, Фика и Нернста. Практика подтверждает важность ее использования для расчета коэффициента разделения. Упомянутые выше ученые интерпретировали диффузию как процесс распространения молекул вещества в пространстве произвольной формы. Преимущественное направление диффузии может определять конвективное движение среды.

#### 2.4. Определение числа разделений в круговой ТСХ

Число разделений в круговой ТСХ  $SN_{кр}$  можно рассчитать относительно простым способом. Основные величины  $b_0$  и  $b_1$  определяют так, как это описано выше. С их помощью оценивают качество операции нанесения пробы, молекулярную диффузию, пропорциональную времени, а также разрешение на данном слое сорбента ( $b_1 - b_0 = f(H)$ ) и т. д. Фактический расчет  $SN_{кр}$  проводят различными способами.

1) Допускают, что все последовательные пики характеризуются постоянным соотношением площадей.  $SN_{кр}$  рассчитывают по экспоненциальной зависимости [уравнение (2.4),] через уравнение суммы членов геометрической прогрессии.

2) Допускают двумерное размывание пиков от  $b_0^2$  до  $b_1^2$ , пропорциональное длине пути разделения, площади приравнивают соответствующим площадям кольцевых зон. Их радиусы соответствуют величинам  $R_{кр}$ , а ширина колец — площади.

3) Теоретически более правильным подходом является использование соответствующих радиусов диффузии, увеличивающихся пропорционально длине пути разделения. Расчет прямой, так же, как и в двух предыдущих случаях; результаты не зависят от толщины слоя.

4а) Для получения разделения  $4,7\sigma$  необходимо, чтобы расстояние между последовательными кольцевыми зонами

равнялось удвоенному значению  $b$  — ширине соответствующего пика на половине высоты ( $2b = B$ ). Радиусы кольцевых зон обозначают  $r_1$ ,  $r_2$  и  $r_3$ , считая от фронта  $R_{fкр1}$ . Соотношение двух внешних кольцевых зон после сокращения в числителе и знаменателе можно представить в виде:

$$R_q = \frac{r_2^2 - r_3^2}{r_1^2 - r_2^2}$$

где

$$r_1^2 = 1,$$

$$r_2^2 = 1 - B_1^2,$$

$$\begin{aligned} r_3^2 &= r_2^2 - \left[ B_0 + (B_1 - B_0) \frac{r_2}{r_1} \right]^2 = \\ &= 1 - B_1^2 - [B_0 + (B_1 - B_0) \cdot (1 - B_1^2)^{1/2}]^2 \end{aligned}$$

Из этих выражений получим

$$R_q = \left[ \frac{B_1}{B_0 + (B_1 - B_0) (1 - B_1^2)^{1/2}} \right]^2.$$

Этот коэффициент и первый член  $B_1^2$  подставим в уравнение суммы членов геометрической прогрессии, а сумму приравняем 1. После логарифмирования и подстановки величины  $b$  получим следующее выражение:

$$SN_{кр} = \frac{\lg \left[ \left( \frac{b_0 + |b_1 - b_0| [1 - 4b_1^2]^{1/2}}{2b_1^2} \right)^2 - \frac{1}{4b_1^2} + 1 \right]}{\lg \left( \frac{b_0 + |b_1 - b_0| [1 - 4b_1^2]^{1/2}}{b_1} \right)^2}. \quad (2.7)$$

4б) При расчете коэффициента разделения вторым способом важна начальная стадия кругового ТСХ-разделения. Разделение стартового пятна, нанесенного в центр пластинки, проводят до тех пор, пока радиус круговой зоны не станет равным  $4,7\sigma$ . К этому моменту величина  $b$  кольцевой зоны удваивается, а площадь учетверяется. Если в уравнении площади в качестве радиуса выбирают  $2b$ , ширину кольцевой зоны получают в виде величин  $2\beta$ :

$$[2b_0 + R_{fкр} \cdot 2 \cdot (b_1 - b_0)]^2 \pi = 2R_{fкр} \cdot 2 \cdot \beta \cdot \pi;$$

после сокращения на  $2\pi$  получим

$$\beta = \frac{[b_0 + R_{fкр} \cdot (b_1 - b_0)]^2}{R_{fкр}}. \quad (2.8)$$

На рис. 2.3 изображены кривые ширины пиков (ординаты) для некоторых моделей усредненных хроматографических условий. Соотношение масштабов по осям ординат и абсцисс (длина пути разделения) равно 20. Из кривых обна-

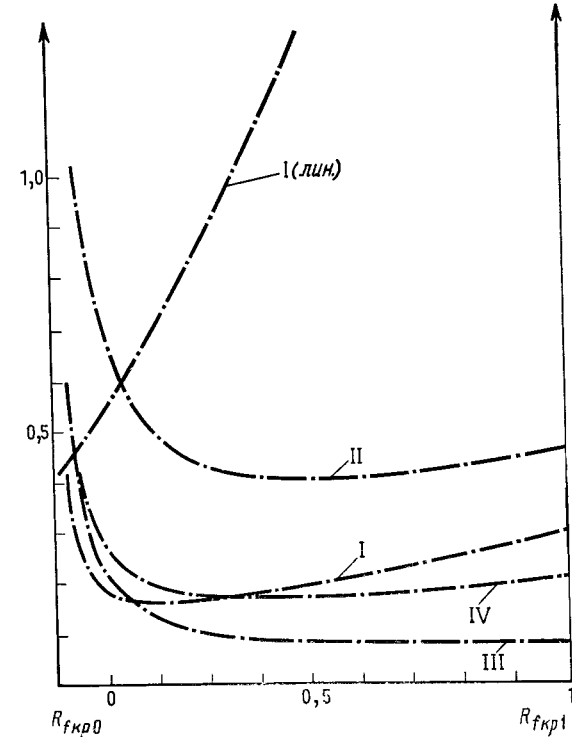


Рис. 2.3. Зависимость ширины пика от величины  $R_{fкр}$  для некоторых пространственных моделей при усредненных условиях хроматографического разделения.

руживается сильное уменьшение ширины пиков на старте. Вблизи  $R_{fкр} = 0,5$  величины  $\beta$  принимают наименьшие

значения, которые почти не увеличиваются до самого фронта. Это явление необычно и, по-видимому, противоречит теории хроматографического разделения. Однако практика подтверждает этот эффект. Возникновение эффекта можно объяснить, исходя из ранее упомянутой концепции (разд. 2.3) о том, что диффузия не ограничена пространством определенной формы и может быть подвержена влиянию конвективных потоков среды.

Из графика также следует, что фокусировка позволяет получить пик исключительно малой ширины даже при низком качестве сорбирующего покрытия и недостаточном тщательном дозировании. Ширина пиков, полученных методом линейной ТСХ, на графике представлены кривой I. Хроматографические условия те же, что и для кривой III, но при этом между соответствующими величинами наблюдается существенная разница. Далее из рисунка видно, что допущение постоянства соотношения величин  $\beta$  для двух последовательных пиков, являющееся необходимым условием выполнения уравнения (2.7), ведет только к грубому приближению.

В простейшем расчете  $SN_{кр}$  пользуются суммой величин  $\beta$  между, например,  $R_{f_{кр1}}$  и  $R_{f_{кр0,2}}$ . Число и необходимые значения этих величин, измеренных через интервалы, равные  $0,1 R_{f_{кр}}$ , пересчитывают в конкретных условиях применительно к 80% длины пути разделения и добавляют к возможному числу пиков в интервале между  $R_{f_{кр0,2}}$  и  $R_{f_{кр0}}$ . С помощью этого метода удается получить достаточно точные результаты. Кривые на рис. 2.3 построены по данным, приведенным в табл. 2.3. Стартовое пятно локализуется не точно в  $R_{f_{кр0}}$ , а продвинуто несколько вперед на величину  $b_0$ .

В табл. 2.3 наряду с величинами  $R_{f_{кр}}$  приведены значения  $2\beta$ , которые вычислены по уравнениям (2.8) и (2.9а). Затем следуют коэффициенты разделения, полученные круговым методом и рассчитанные по уравнениям (2.8) и (2.9а). После этих величин приведены значения  $SN_{кр}$ , определенные из уравнения (2.7), и  $SN_{лин}$ , полученные из уравнения (2.4). Линейное разделение проводили при тех же условиях, что и круговое. Как и ожидалось, в особенности на основании изложенного ранее, между числами разделений, рассчитанными по уравнениям (2.8) и (2.9а),

Таблица 2.3  
Зависимость хроматографических параметров разделения от типа пространственной диффузионной модели

Кривая	I		II		III		IV	
	(2.8)	(2.9а)	(2.8)	(2.9а)	(2.8)	(2.9а)	(2.8)	(2.9а)
$b_0$	0,02		0,05		0,03		0,03	
$b_1$	0,12		0,15		0,06		0,10	
$R_{f_{кр}}$	значения $2\beta \cdot 10^3$ , рассчитанные из уравнений							
1,0	28,8	28,8	45,0	43,0	7,2	7,2	20,0	20,0
0,9	26,8	25,8	43,6	42,6	7,2	7,1	19,2	18,7
0,8	25,0	22,9	42,2	40,3	7,3	7,1	18,4	17,6
0,7	23,2	20,3	41,2	38,7	7,4	7,2	17,8	16,6
0,6	21,4	18,0	40,4	37,3	7,7	7,4	17,2	15,8
0,5	19,6	13,9	40,0	36,3	8,1	7,8	17,0	15,2
0,4	18,0	14,2	40,3	36,7	8,8	8,3	16,8	15,0
0,3	16,6	12,9	42,6	38,7	10,1	9,8	17,4	15,4
0,2	16,0	12,5	49,0	45,0	12,9	12,6	19,4	17,4
0,1	18,0	14,9	72,0	68,0	21,8	21,4	27,4	25,5
$b_0$	40,0	40,0	100,0	100,0	60,0	60,0	60,0	60,0
$d'_0 = b_0^{2/3}$		0,0737		0,4337		0,0966		0,0966
$d'_1 = b_1^{2/3}$		0,2433		0,2823		0,4533		0,2154
$SN_{кр}$	43,7	45,9	24,1	22,3	98,6	101,2	48,2	52,1
$SN_{кр}$ (2.7)	36,6		17,9		96,0		42,5	
$SN_{лин}$ (2.4)	8,9		5,5		11,5		8,6	

имеется небольшая разница. Учитывая приведенное выше объяснение, результаты, полученные из уравнения (2.7), также не вызывают удивления.

Сравнение чисел разделений показывает, что для усредненных условий разделения  $SN_{кр}$  в 4—5 раз больше, чем  $SN_{лип.}$

4в) Ранее упомянутый третий путь расчета числа разделений, основанный на трехмерной диффузионной модели, представляется наиболее приемлемым. Радиус  $d_0$  или  $d_1$  сферы диффузии получают из значений  $b_0$  и  $b_1$  по уравнению (2.5). Равная по объему кольцевой пространственной зоне сфера диффузии расширяется пропорционально кубу расстояния от  $d_0$  до  $d_1$ . Зависящую от  $R_{fкр}$  ширину пика определяют так же, как и в предыдущем случае:

$$\beta = \frac{d_0 + R_{fкр} (d_1 - d_0)^3}{R_{fкр}} \cdot \frac{4}{3D}. \quad (2.9)$$

Толщину слоя  $D$  измерять не обязательно, так как она не влияет на величину  $\beta$ . Следовательно, расчет можно упростить, если  $d$  в уравнении (2.5) выразить через  $D$ :

$$d' = d \left( \frac{4}{3D} \right)^{1/3} = b^{2/3}.$$

Используя уравнение (2.9), получим

$$\beta = \frac{d'_0 + R_{fкр} (d'_1 - b_0^3)^3}{R_{fкр}},$$

или

$$\beta = \frac{b_0^{2/3} + R_{fкр} (b_1^{2/3} - b_0^{2/3})^3}{R_{fкр}}. \quad (2.9a)$$

Используя ширину пика, число разделений можно определить ранее упомянутым путем (см. выше пункт 4б)

## 2.5. Замечания

В данной главе предпринята попытка описать экспериментальные данные с помощью математических уравнений. При расчетах опирались на свойства диффузии — явления, связанного с параметрами пространства, кото-

рые изменяются под действием потоков среды, что вызывает изменения в протекании диффузии. Следовательно, ширина пиков уменьшается подобно тому, как это происходит при фокусировке. Макропространство, в котором происходит движение потока, неизмеримо больше по сравнению с траекториями диффузионного движения молекул в потоке, и, следовательно, диффузия за его пределы маловероятна. Этот подход можно использовать в качестве критерия классификации трех видов жидкостной хроматографии.

Все три способа разделения, колоночная, линейная ТСХ и круговая ТСХ, характеризуются продольной диффузией, не мешающей разделению, однако колоночная хроматография характеризуется еще диффузией в двух поперечных направлениях, которая мешает разделению. В линейной ТСХ диффузия протекает в двух взаимно перпендикулярных направлениях (условное допущение), причем поперечная диффузия не мешает разделению. В круговой ТСХ продольная диффузия ухудшает разделение, тогда как поперечная диффузия его улучшает в связи с тем, что радиусы сфер диффузии, в которых происходит движение молекул, суммируются в поперечном направлении. Исследования, посвященные установлению подлинности чисел разделений, не превышающих 100, нашли положительное подтверждение (см. табл. 2.3). Здесь следует рассмотреть тот факт, что число разделений (модель III) получено при ширине пика  $b_0 = 0,03$  и  $b_1 = 0,06$ . Величина  $b_1 - b_0 = 0,03$  соответствует числу тарелок  $N_{эфф} = 1500$  для данной конкретной системы. Необходимо также выполнение ряда других условий: ширина стартового пятна (например, после фокусировки, как это описано в гл. 3 и 5) и величина молекулярной диффузии вместе не должны превышать 3% длины пути разделения, температура и длительность разделения должны быть достаточно низкими. Величину  $b_0 = 0,03$  трудно получить.

Какова практическая ценность таких больших чисел разделений? Обычно считают, что высокая эффективность разделения в жидкостной хроматографии определяется в основном высокой селективностью, а не большими числами разделений. Однако, по мнению Рохспайдера (Инсбрук, май 1975 г.), это утверждение несправедливо. Поня-

тие селективности характеризует разделение двух веществ и оптимизацию условий разделения проводят по отношению к этим двум веществам. Однако в данном случае оптимизация означает подбор элюента, что является трудоемким процессом. Кроме того, на практике любые анализируемые пробы состоят более чем из двух компонентов, что приводит подчас к противоречию между элюентом, оптимизированным по отношению к двум компонентам, и другими компонентами анализируемой смеси. Большое число разделений является лучшей гарантией хорошей селективности.

## ПРЕИМУЩЕСТВА, ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И НЕДОСТАТКИ КРУГОВОГО МЕТОДА РАЗДЕЛЕНИЯ

*Ж. Блом*

*Blome J., Lerchenweg 7, D-7919 Au/IIIer, BDR*

### *3.1. Краткий исторический обзор*

Обзор многочисленных экспериментальных работ по разделению без потерь компонентов жидких смесей благодаря их различным физическим свойствам представляется интересным не только с исторической точки зрения. В настоящее время не известно, по каким направлениям развивались эти всегда самостоятельные исследования в течение более полутора столетий, какие идеи определяли эти направления, какие проблемы возникали и как при этом совершенствовалась техника эксперимента. Судьба хроматографии как науки сложилась своеобразно: первые работы и достижения в этой области были забыты, и только после их повторного открытия хроматография получила широкое признание. Между первыми работами Цвета и повторным открытием колоночной хроматографии Кохом и Ледерером прошло двадцать лет, а затем потребовался вдвое больший промежуток времени, чтобы получила распространение современная жидкостная хроматография высокого давления. Примерно такой же отрезок времени отделяет первые успешные опыты Измайлова и Шрайбер в области тонкослойной хроматографии в 1938 г. от исследований Шталя, положивших начало широкому внедрению этого метода в лабораторную практику. Еще больший период времени потребовался для признания хроматографии на бумаге. Этот метод возник задолго до работ Гопельшродера, Шонбейна и даже Рунге, в чьих трактатах «Образец совершенства для друзей прекрасного» (Paragons

for Friends of the Beautiful) и «Произрастающий независимо» (Independently Grown) с энтузиазмом продемонстрирована «созидательная сила веществ». Автор этих книг успешно соединил метод капиллярной диффузии с проведением химических реакций и тем самым положил начало методу реакции в пятне. Новый метод в течение долгого времени был связан с капиллярным анализом (Рунге, диссертация, 1822), хотя еще с незапамятных времен сходный способ применялся красильщиками. В пятидесятых годах Гопельшродер детально разработал исчерпывающий и универсальный метод капиллярного анализа, который занял прочное положение в фитохимии и был внесен в официальную фармакопею. Гопельшродер первым попытался отделить капиллярный анализ от хроматографии на бумаге, разделяя вещества, нанесенные на бумагу, с помощью чистых растворителей. Прошли десятилетия, прежде чем хроматография на бумаге была признана самостоятельным методом. Это произошло благодаря разработанному Консденом, Гордоном, Мартином и Сиджем в 1944 г. методу анализа аминокислот. Интересно отметить, что на первом этапе развития как хроматографии на бумаге, так и ТСХ использовали метод кругового разделения. В связи с этим закономерен вопрос о том, случайно ли возрождение метода кругового разделения, или это было неизбежным процессом.

### 3.2. Условия проведения разделения круговым методом

Прежде чем сравнивать преимущества и недостатки методов ТСХ, необходимо ввести критерии оценки результатов, полученных этими методами, и предложить рабочую методику проведения кругового (КТСХ) или, как его еще называют, циркулярного разделения, чтобы получить сходное разрешение. В настоящее время для проведения подобной методики благодаря ее тщательной отработке и наличию доступной U-камеры достаточно минимума условий. При изменении методики эти условия необходимо пересматривать. Они сводятся к следующему.

1. Первостепенной по важности задачей описываемой ниже рабочей методики является поддержание, насколько

это возможно, радиальной симметрии. Для этого необходимо выполнение следующих условий.

2. Следует использовать высококачественный чистый сорбент. Свойства слоя должны быть однородными, чтобы на поверхности не возникало трещин.

3. Чтобы не происходило несимметричного воздействия силы тяжести, пластинка должна иметь строго горизонтальное положение.

4. Следует стремиться к равномерному протеканию элюента через центр пластинки (последний не должен смещаться, например, при нанесении пробы), что обеспечивает симметричное в радиальном направлении и однородное распространение элюента по слою.

5. Для получения постоянной по своим параметрам и воспроизводимой газовой атмосферы вокруг сорбирующего слоя камеру для разделения следует все время держать плотно закрытой. Теплообмен путем контакта или излучения приводит к изменениям параметров газовой атмосферы. В связи с этим рекомендуется принимать необходимые меры для предотвращения теплопередачи.

6. В процессе нанесения пробы, разделения во время нанесения пробы, предварительного разделения и высушивания в теплом воздухе может возникнуть неоднородность заполнения слоя водой или другим растворителем. Чтобы этого не происходило, рекомендуется перед разделением снова привести слой сорбента в равновесие с газовой фазой.

### 3.3. Рабочая методика в круговой хроматографии

Возможны два варианта проведения этой методики.

*Вариант 1.* Пластинку устанавливают сорбирующим слоем вниз и элюент подают снизу.

*Вариант 2.* ТСХ-пластинку устанавливают сорбирующим слоем вверх и элюент подают сверху.

На практике следует отдать предпочтение первому методу как более простому и надежному и в силу этого, как показывает последующее описание, пригодному для проведения массовых анализов. Второй метод предпочтителен при проведении разделения с градиентом состава

элюента, в случае использования ТСХ-пластинок с алюминиевой фольгой в качестве подложки и при проведении анализа без насыщения камеры.

### 3.3.1. Подвод элюента снизу

В первом методе пластинку помещают на чашку Петри с элюентом. Это позволяет насытить атмосферу парами элюента, а следовательно, и стабилизировать хроматографическое разделение. Для проведения разделения на широко используемых пластинках размером  $10 \times 10$  см подходит обычная чашка диаметром 9 см. Торцевая поверхность стенок должна плотно прилегать к пластинке. Для устранения неровностей ее шлифуют на плите корундовой суспензией в течение 10—15 мин или, если позволяет время, с помощью стеклодувного аппарата. Расстояние между поверхностью слоя и элюентом достаточно мало, его можно еще уменьшить путем прибавления элюента, объем которого в среднем составляет 5—10 мл. Если пластинка расположена горизонтально (см. разд. 3.2, пункт 3), это расстояние вдоль пластинки остается постоянным. В отличие от анализов, проводимых в обычных ТСХ-камерах, при использовании описываемого метода можно получить однородное насыщение газовой атмосферы. Это преимущество, очевидное только химик-практику, позволяет получить воспроизводимые величины  $R_f$ .

Элюент поступает в слой сорбента под действием капиллярных сил. Таким образом, слой сорбента сам стабилизирует и регулирует поток элюента, поскольку с верхнего конца фитиля на пластинку поступает только такое количество жидкой фазы, которое может поглотить покрытие пластинки. В связи с этим уменьшается вероятность образования капли в точке подвода элюента. Образование капли особенно вредно в случае нанесения пробы в центр круговой хроматограммы, поскольку перенос вещества в этой области нарушается.

В качестве фитиля рекомендуется использовать тефлоновую трубку, заполненную хлопчатобумажным материалом. Фитиль на несколько миллиметров короче, чем расстояние от дна чашки Петри до поверхности сорбента

(рис. 3.1). Чтобы фитиль имел устойчивое положение в чашке, трубку обматывают тонкой проволокой из нержавеющей стали (диаметр 0,3—0,5 мм). Свободный конец проволоки сгибают в трех местах, отстоящих на 2, 5, 8 см от ее конца, так, чтобы получилось треугольное основание с равными сторонами по 3 см. В середине этого треугольника должна находиться тефлоновая трубка, удерживаемая проволокой в вертикальном положении. Конец тефлоновой трубки должен помещаться на высоте стенок

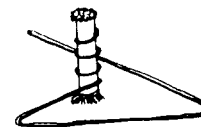


Рис. 3.1. Внешний вид фитиля из хлопкового волокна с проволочным держателем.

чашки так, чтобы фитиль выступал над ней приблизительно на 1 мм. Контакт между элюентом и пластинкой достигается за счет упругости проволоки. В случае применения агрессивных элюентов, содержащих реакционно-способные галогениды, органические оксикислоты, комплексные соединения и т. д., стальную проволоку можно заменить на платиновую (длина 12 см и диаметр 0,5 мм, что соответствует 0,5 г Pt) или платино-иридиевую.

Скорость протекания потока элюента регулируют путем подбора внутреннего диаметра трубки. Максимальная скорость определяется дисперсностью частиц, распределением частиц в слое по размеру и вязкостью элюента. Определенное уменьшение скорости вызывает уменьшение внутреннего диаметра тефлоновой трубки от обычно применяемых размеров, равных 1—1,6 мм, до 0,7—0,8 мм. В некоторых случаях уменьшение скорости приводит к улучшению разделения, в особенности на слоях сорбента с крупными частицами (соотношение  $H/u!$ ). В этом случае очень важно, чтобы камера была плотно закрыта. При работе со слоями сорбента, содержащего окись индия, максимальный диаметр тефлоновой трубки составляет 0,7 мм, а оптимальная величина диаметра в соответствии с нашим пока еще ограниченным опытом — 0,5 мм. ТСХ-пластинки на основе



окси индия лучше всего применять для разделения с автоматически контролируемой переменной скоростью элюента, ставшее впервые возможным после создания U-камеры. После долгого периода ожидания в настоящее время стали доступными выпускаемые промышленностью ТСХ-пластинки, покрытые высокоэффективным слоем силикагеля с устойчивым и узким распределением частиц по размерам. Первые эксперименты с образцами таких пла-

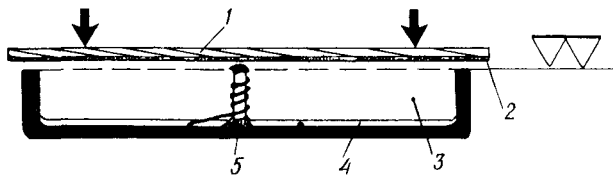


Рис. 3.2. Разрез камеры для круговой ТСХ.

1 — подложка; 2 — слой сорбента; 3 — чашка Петри; 4 — элюент; 5 — фитиль.

стинок показали улучшение разделения без удлинения времени разделения при использовании обычно применяемой тефлоновой трубки с внутренним диаметром 1,6 мм.

### 3.3.2. Нанесение пробы

Следует различать методы нанесения отдельного вещества (например, при подборе оптимальной системы растворителей) и способы нанесения большего количества растворенных проб, компоненты которых нужно оценивать как по отдельности, так и по отношению друг к другу. В простейшем случае при нанесении одного вещества, когда составы системы растворителей, пробы и элюента совпадают, а объем пробы мал по сравнению с объемом фитиля, пробу можно наносить непосредственно на сухой фитиль. Фитиль после этого помещают в чашку Петри с элюентом, а затем на чашку помещают ТСХ-пластинки. В этом случае точное центрирование фитиля не обязательно. Его легко высушить с помощью фильтровальной бумаги.

Многокомпонентные элюенты, в особенности полярные растворители или сильно разбавленные пробы, необходимо подводить точно в центр пластинки. Центр пластинки можно определить с помощью пластинки аппликатора

(рис. 3.3) или провести диагонали карандашом. В последнем случае пластинку рассматривают в проходящем свете и отмечают ее центр фламастером на обратной стороне. При нанесении нескольких проб (обычно 4 или 8) их располагают под углом  $90^\circ$  или  $45^\circ$  по отношению друг к другу. Углы откладывают с помощью пластинки аппликатора или отмечают карандашом. Пробы объемом 4—10 мкл наносят на равных расстояниях от центра, подбираемых таким образом, чтобы не происходило перекрытия проб. В случае анализа сильно сорбирующихся

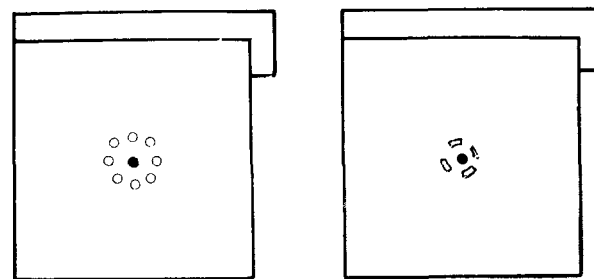


Рис. 3.3. Пластины аппликаторов для точного нанесения проб в центр ТСХ-пластинки.

веществ незначительное перекрытие пятен растворителей при нанесении пробы не ведет к искажению результатов разделения. В значительной степени это зависит от полярности растворителя пробы.

Из имеющихся устройств для нанесения пробы лучше всего пользоваться простыми капиллярами или пипетками Барольера. С их помощью можно достичь высокой воспроизводимости нанесения, исключить сколько-нибудь значительные повреждения слоя сорбента, предотвратить контакт анализируемых веществ с металлическими деталями, избежать утечек, значительно спизить эффект памяти и легко проводить очистку. С помощью этих устройств нельзя регулировать объем пробы, однако это не является их недостатком, поскольку величину пробы лучше менять при одном и том же объеме путем изменения концентрации растворов, которые можно приготовить

с высокой степенью точности. Это особенно справедливо для случаев, когда объем пробы важен для формирования площади наносимого пятна.

### 3.3.3. Предварительное разделение

Для существенного улучшения эффективности разделения и параметров количественной оценки используют предварительное разделение. Полученную промежуточную кольцевую зону сравнительно малого диаметра затем разделяют основным элюентом. На обычных пластинках со слоем силикагеля эту операцию проводят с элюентами, достаточно полярными для разделения всех присутствующих компонентов, или в случае использования системы с обращенными фазами применяют достаточно неполярные элюенты. Растворитель для предварительного разделения наносят приблизительно 10-микролитровыми порциями. Его вводят в центр пластинки на слой сорбента, расположенного сверху подложки, пипетками Барольера или капиллярами. При этом фронт элюента продвигается через нанесенные пятна проб на расстояние 1—2 мм. В случае когда не все компоненты анализируемой смеси продвигаются вместе с фронтом растворителя — а так чаще всего и бывает на практике — предварительное разделение проводят несколько раз, следя за тем, чтобы длина пути разделения была постоянной. На рис. 3.4 представлено схе-



Рис. 3.4. Схематическое изображение последовательных стадий предварительного разделения проб, нанесенных вокруг центра пластинки (эксцентрически).

матическое изображение последовательных стадий предварительного разделения нескольких проб, нанесенных на пластинку. Затем растворитель для предварительного разделения по возможности тщательно и полно удаляют высушиванием, чтобы при разделении не происходило

смещения остатков полярного растворителя с элюентом. Перед проведением разделения положение кольцевых зон, полученных в результате предварительного разделения, отмечают карандашом, чтобы облегчить последующий расчет величин  $R_{fкр}$ .

Метод предварительного разделения можно рекомендовать для линейной ТСХ вместо нанесения проб в виде полос. Нанесение проб в виде пятна позволяет улучшить воспроизводимость нанесения пробы и длины полосы. При сравнительно больших объемах пробы и относительно высокой полярности растворителя пробы следует наносить в виде полос большей длины. Если почему-либо такой способ нанесения не пригоден, то, объединяя методы нанесения в виде отдельных пятен на определенных интервалах друг от друга и предварительное разделение, можно также получить полосы проб.

### 3.3.4. Разделение кольцевых зон

Перед применением нового фитиля или при изменении состава элюента фитиль необходимо очистить. Эту операцию проводят следующим образом: нижний конец фитиля помещают на фильтровальную бумагу, растворитель впитывается бумагой, затем фитиль помещают в чашку Петри с элюентом, а на его верхний конец кладут фильтровальную бумагу, чтобы растворитель, проходя по фитилю, промывал его. Вначале при проведении экспериментов может показаться трудным точное совмещение центра пластинки с фитилем, установленным в чашке Петри. Поэтому центр отмечают фламастером на обратной стороне пластинки (см. разд. 3.3.2). Прежде чем опустить пластинку на чашку Петри, запоминают положение фитиля. Затем пластинку в горизонтальном положении перемещают над фитилем до тех пор, пока ее центр не совместится с фитилем. После совмещения наблюдают за движением растворителя по слою сорбента, и в случае необходимости пластинку поднимают и перемещают, исправляя неточность совмещения центра пластинки и фитиля. Даже если пластинку приходится перемещать несколько раз, это мало сказывается на результатах разделения, поскольку благодаря предварительному разделению в области контакта фитиля

с поверхностью сорбента чаще всего не остается анализируемых веществ.

После коррекции точности совмещения центра пластинки и фитиля пластинку в случае необходимости перемещают (не приподнимая) относительно чашки Петри, чтобы добиться максимального контакта по всей окружности стенок. При этом фитиль с проволочным держателем перемещается вместе с пластинкой и их взаимное положение не меняется.

После небольшой тренировки можно добиться точности наложения в пределах 1—2 мм, и часто дополнительной коррекции вообще не требуется.

### 3.3.5. Подвод элюента сверху

В простом устройстве, изображенном на рис. 3.5, на ТСХ-пластинку со слоем сорбента, обращенным вверх, элюент подводится по длинному тefлоновому капилляру с внутренним диаметром 0,5—0,7 мм. Тefлоновый капилляр пропущен через отверстие в стеклянной пластинке

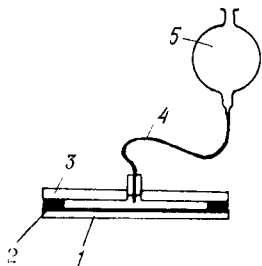


Рис. 3.5. Устройство для подвода элюента в камеру для кругового разделения на пластинку со слоем сорбента, обращенным вверх.

1 — ТСХ-пластинка; 2 — резиновая прокладка; 3 — покровная пластинка со штуцером в центре; 4 — тefлоновый капилляр; 5 — сосуд для элюента.

и таким образом фиксируется в этом положении. Между ТСХ-пластинкой и покровным стеклом прокладывают кольцо из силиконовой резины толщиной 2—3 мм и диаметром 90 мм, что позволяет герметизировать внутреннее пространство камеры. Другой конец тefлоновой трубки подсоединяют к резервуару с элюентом или погружают в резервуар. Уровень элюента при его свободном истечении необходимо регулировать в зависимости от длины и внутреннего диаметра тefлонового капилляра, вязкости растворителей и требуемой скорости потока. В капил-

ляре не должно быть воздуха. Пузырьки воздуха повышают сопротивление потоку в капилляре, что может вызвать его остановку. Непрерывный подвод элюента с постоянной скоростью при помощи насоса позволяет исключить такого рода трудности.

На рис. 3.6 представлено другое устройство. Если на слой сорбента поместить перевернутую коническую воронку для фильтрования, то получится камера. В узкую часть воронки с помощью куска трубки из силиконовой резины вставляют стеклянную трубку с шарообразным

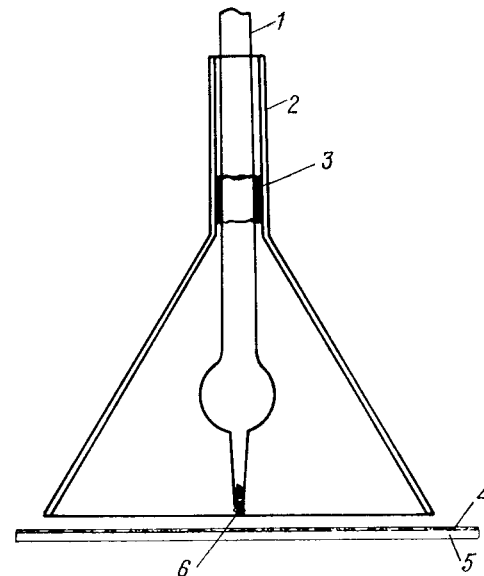


Рис. 3.6. Устройство для подвода элюента сверху на пластинку. 1 — стеклянная трубка с шарообразным расширением; 2 — коническая воронка; 3 — кусок трубки из силиконовой резины; 4 — слой сорбента; 5 — подложка; 6 — фитиль.

расширением. В кончик трубки набивают хлопчатобумажную ткань так, чтобы получить необходимую скорость потока (0,03 до 0,1 мл/мин). Чтобы не повредить поверхность сорбента и предотвратить образование капли элюента, кончик трубки с расширением должен отстоять от поверхности пластинки приблизительно на 0,3 мм.

Преимущества метода подвода элюента сверху наглядно проявляются при применении ТСХ-пластинок с подложками из алюминиевой фольги или других непрозрачных материалов и при проведении разделения элюентом с градиентом состава (разд. 3.3.6). Однако в отличие от предыдущего способа с помощью этого метода над поверхностью сорбента нельзя получить насыщенной парами растворителя газовой атмосферы. Фронт растворителя распространяется от центра, в который подают элюент, к периферии. Чтобы добиться симметричности разделения в радиальном направлении, систему тщательно герметизируют, располагают ее строго горизонтально, исключают влияние теплопередачи и после предварительного разделения повторно приводят систему в состояние равновесия. Состав элюента подчас изменяется в процессе разделения. Это объясняется тем, что элюент обычно состоит из различных компонентов с различными давлениями насыщенных паров, причем для достижения величины парциального давления каждому из компонентов требуется определенное время. Изменение состава элюента не оказывает отрицательного влияния на результаты разделения, проводимого с учетом этой особенности (разд. 3.3.6).

### 3.3.6. Градиентное элюирование

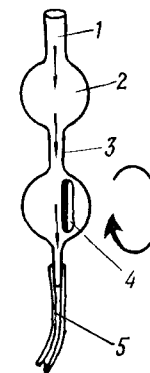
Перспективным представляется сочетание кругового метода ТСХ-анализа с простым и воспроизводимым методом разделения элюентом переменного состава (см. разд. 3.4.6).

На рис. 3.7 изображено простое устройство, состоящее из трубки с двумя шарообразными расширениями, соединенными между собой коротким капилляром. Объем каждого из расширений равен приблизительно 3 мл. В нижнее расширение помещают брусок, вращаемый в вертикальной плоскости магнитной мешалкой, установленной на этом же уровне. Нижнее расширение соединяют с отводной трубкой, которая переходит в тефлоновую трубку, оканчивающуюся в центре ТСХ-пластинки, как это показано на рис. 3.5. Для удаления остатков растворителей от предыдущего опыта перед градиентным элюированием через тефлоновую трубку, нижнее расширение

и верхнее расширение пропускают систему растворителей I, которую в случае использования силикагеля выбирают сравнительно неполярной. Затем после отсоединения всасывающей трубки растворителю дают стечь из тефлоновой трубки до капилляра между расширениями, поднимая конец тефлоновой трубки до уровня капилляра. Затем в верхнее расширение заливают систему растворителей II, включают мешалку и вставляют тефлоновую трубку в отверстие ТСХ-пластинки. Преимуществом опи-

Рис. 3.7. Устройство для регулирования состава элюента.

1 — стеклянная трубка; 2 — шарообразное расширение; 3 — соединительный капилляр; 4 — брусок магнитной мешалки; 5 — тефлоновый капилляр; вертикальными стрелками показано направление движения элюента.



ваемого метода является облегчение визуального наблюдения за системой благодаря тому, что сорбент расположен сверху. Это позволяет, например, исключить образование капли в точке нанесения элюента, изменяя его гидростатическое давление. Наиболее надежным решением в данном случае является принудительная подача элюента насосом, когда систему растворителей II, минуя верхнее расширение, подают непосредственно в расположенный ниже капилляр с системой растворителей I. Этот вариант прекрасно реализуется в сочетании с U-камерой.

Изменение состава элюента не является линейным, оно описывается экспоненциальной функцией  $[II] = 1 - 1/e^n$ , где  $[II]$  — концентрация системы растворителей II,  $n$  — соотношение введенного объема растворителей к объему расширения (равному объему сферического расширения смесителя). Чем меньше объем камеры смешения, тем больше градиент. Эту величину следует указывать при публикации описания результатов экспериментов. На рис. 3.8

представлен график зависимости концентрации от  $n$ . В расширительном объеме 3 мл помещен брусок магнитной мешалки объемом около 1 мл. Приблизительно 2 мл элюента, заполняющего оставшийся объем шарового расширения, с 2–3-кратным избытком хватает для проведения разделения на пластинке размерами  $10 \times 10$  см. Это соответствует круговой области диаметром 90–95 мм. Практически достаточно трети или половины данного объема. Таким образом, на конечных стадиях разделения концентрация системы растворителей II в элюенте достигает примерно 40–50%. Разделение проводят в области концентраций, соответствующих приблизительно линейному участку кривой на графике. Полярность элюента в конце разделения определяется полярностью обоих выбранных систем растворителей. Следует отметить, что

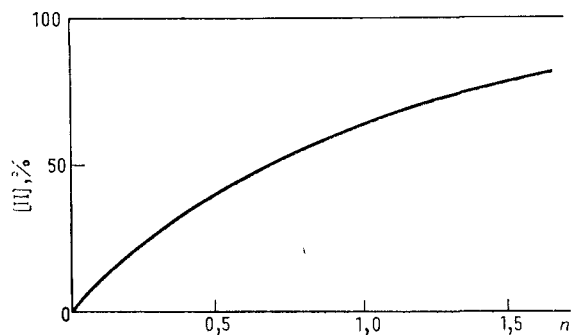


Рис. 3.8. График зависимости концентрации системы растворителей II от  $n$ .

приведенная формула и соответствующий график (рис. 3.8), выражающий зависимость процентной концентрации системы растворителей II от  $n$ , не идентичны возрастанию полярности элюента. В связи с этим отпадает вопрос, следует ли стремиться к линейному изменению градиента концентрации, которое не приводит к линейному изменению полярности элюента. Кроме того, достижение линейного градиента концентрации обходится очень дорого. Данный способ получения градиента был пред-

ложен в Институте хроматографии. Он был испытан на примере жидкостной колоночной хроматографии в 1974 г. и отличался простотой и хорошей воспроизводимостью.

### 3.4. Сравнение линейного и кругового методов ТСХ

Вопрос о критериях, с помощью которых можно было бы сравнивать эффективность разделения линейной ТСХ и круговой ТСХ (КТСХ), обсуждался уже ранее (разд. 3.2). Возникает следующий вопрос, является ли КТСХ высокоэффективной ТСХ, и если да, то почему? Для ответа на этот вопрос были рассмотрены следующие положения:

- 1) число тарелок, число разделений, число разделений/время = производительность разделения;
- 2) разрешение, селективность, использование области разделения;
- 3) емкость разделения, динамическая область, анализ следов;
- 4) воспроизводимость величин  $R_f$  и  $R_{f_{кр}}$ ;
- 5) детектирование, количественная оценка;
- 6) изменение состава элюента;
- 7) требования к длительности разделения, размерам и расположению ТСХ-систем, методика проведения эксперимента, разное.

#### 3.4.1. Число тарелок, число разделений, число разделений/время = производительность разделения

Преимущества круговой ТСХ по сравнению с обычной линейной ТСХ хорошо известны, и их легко продемонстрировать. Используя последние достижения в круговом методе, например U-камеры (см. гл. 4), значения обсуждаемых здесь параметров можно повысить на несколько порядков величины по сравнению с линейным методом. Производительность разделения круговым методом сравнима с производительностью разделения на капиллярных колонках в газовой хроматографии.

Во избежание безосновательных предположений необходимо тщательно обсудить используемую номенклатуру и уяснить вопрос, какой из этих трех близких терминов следует применять для практической оценки результатов разделения. Можно ли использовать в круговой ТСХ термин «число тарелок» и как объяснить в этой связи поразительную производительность круговой ТСХ, получаемую авторами в течение многих лет?

В случае разделения с помощью относительно вязких систем растворителей требуемую селективность можно достичь только при низкой эффективности разделения. Для таких специальных случаев экономисты предложили термин «производительность разделения» = число разделений/время. Эта достаточно парадоксальная формулировка показывает, почему необходимо рассмотреть предложенную номенклатуру.

Термин «число разделений», определяемый как максимально возможное число веществ, полностью отделенных друг от друга в области разделения от места нанесения пробы до фронта элюента при данных условиях эксперимента, имеет то преимущество, что основывается на практическом опыте. Здесь важным фактором является то, что число разделений можно не связывать с понятием числа тарелок, которое, как это будет показано далее, неприменимо в КТСХ. Поскольку рассматриваемая проблема относится к теории хроматографии, то представляется целесообразным поставить вопрос о правдоподобном объяснении взаимосвязи КТСХ со следующими терминами.

### 3.4.2. Разрешение, селективность, использование области разделения

Разрешение двух соседних веществ, т. е. отношение расстояния между пиками к средней ширине пика  $R = \Delta R_f / (w_m + w_n)$ , пропорционально величине селективности  $S = k_n/k_m - 1$ , зависящей в основном от природы элюента. Это согласуется с данными Снайдера (1968 г.). Однако разрешение является также функцией числа разделений или корня квадратного из числа тарелок. Эта группа терминов, следовательно, связана с предыдущей.

### 3.4.3. Соотношение между $R_f$ и $R_{f,кр}$

#### Использование области разделения

В линейной ТСХ оптимальная область разделения соответствует интервалу значений  $R_f$  от 0,3 до 0,6 или от 0,2 до 0,7, что составляет соответственно 30% или самое большее 50% длины пути разделения. Причина этого очевидна: при значениях  $R_f$ , меньших 0,3 или 0,2, не удастся получить удовлетворительного разделения, а при значениях  $R_f$ , больших 0,6 и 0,7, затруднено детектирование, поскольку с увеличением  $R_f$  возрастает площадь зоны и уменьшается поверхностная концентрация вещества. Величины  $R_{f,кр}$  в круговой ТСХ, так же как и в линейной ТСХ, обозначают соотношение расстояния, пройденного веществом, к расстоянию от места нанесения пробы до линии фронта элюента. Поскольку основанием для обеих систем исчислений является площадь сорбента, смоченная определенным количеством элюента, то, согласно Гейссу,

$$(R_{f,кр})^2 = R_f.$$

Это выражение позволяет сделать вывод о том, что вследствие указанной квадратичной зависимости при переходе от линейной к круговой хроматограмме при больших значениях  $R_f$  расстояние между зонами имеет тенденцию к уменьшению, в то время как при малых значениях  $R_f$  это расстояние имеет тенденцию к увеличению. Это позволяет не только ограничиваться выбором оптимальных условий в области разделения, но и подбирать лучшее распределение локализации зон. Размывание зон и понижение концентрации вещества в линейной ТСХ пропорциональны длине пути разделения, что подтверждается теоретически и практически, однако в случае круговой ТСХ эта зависимость не приложима. Более того, как показано в гл. 2, размывание зон в линейной ТСХ значительно больше, чем в круговой, что ведет к увеличению числа разделений в последнем методе. Применительно к круговой ТСХ нельзя использовать термины «число тарелок» и «высота тарелки», и расчет числа тарелок через ширину пика при высоких значениях  $R_{f,кр}$ , в результате которого получают астрономические величины, является поэтому неприемлемым.

На рис. 3.9 представлена диаграмма изменения соотношений положений зон в линейной и круговой ТСХ. При переходе от величин  $R_f$  к величинам  $R_{fкр}$  область значений  $R_f$  от 0,0 до 0,1 в линейной ТСХ соответствует втрое большей области в круговой ТСХ, в то время как область больших значений  $R_{fкр} > 0,5$  в круговой ТСХ соответствует 30% аналогичного интервала в линейной ТСХ. Приведенные зависимости соответствуют ширине стартового пика на половине высоты, равной 2% длины пути разделения, и размыванию пика, равному приблизительно 7% длины пути разделения.

При использовании предварительного разделения (как это было рекомендовано выше, разд. 3.3.3) значение  $R_{fкр}$  сдвигается на определенную величину, не зависящую

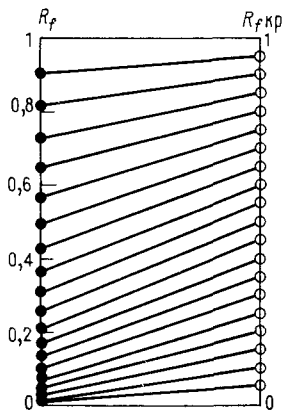


Рис. 3.9. Диаграмма соотношений величин  $R_f$  в линейной и круговой ТСХ.

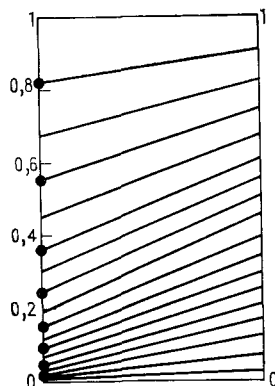


Рис. 3.10. Диаграмма соотношения величин  $R_f$  в круговой ТСХ с предварительным разделением.

от радиуса стартовой кольцевой зоны  $v$ , полученной в результате предварительного разделения. При расчете соответствующих значений  $R_{fкр}$  необходимо выбрать, производить ли измерения от центра или от стартовой круговой зоны, что представляется более чувствительным методом. В последнем случае площадь круга, определяемую

кольцевой зоной вещества, радиуса  $(S + v)$  и площадь круга радиуса  $(1 + v)$ , соответствующую элюенту, необходимо уменьшить на величину площадь круга предварительного разделения:

$$\frac{(S + v)^2 \pi - v^2 \pi}{(1 + v)^2 \pi - v^2 \pi} = R_f$$

или

$$R_{fкр} = [R_f (1 + 2v) + v^2]^{1/2} - v.$$

На рис. 3.10 представлена диаграмма, аналогичная предыдущей, с той лишь разницей, что предварительное разделение проводили на участках, соответствующих 20% и 10% длины пути разделения.

#### 3.4.4. Влияние градиента

При сравнении колоночной жидкостной хроматографии с ТСХ, а такое сравнение необходимо, можно увидеть, что в КЖХ в отличие от ТСХ и КТСХ время удерживания анализируемых веществ превышает время удерживания элюента  $t_m$ . Принимая это во внимание, можно констатировать, что эффективность КЖХ, измеренная по отношению к числу разделений, существенно ниже не только по сравнению с КТСХ, но даже с ТСХ. В связи с этим можно прийти к выводу, что основным условием эффективности разделения ВЭЖХ является использование колонок с плотной упаковкой сферических частиц сорбента (мелкодисперсного с незначительными отклонениями размеров от средней величины).

Чтобы пояснить сказанное выше, воспользуемся предположением, высказанным в Институте хроматографии в сентябре 1974 г., о том, что практически любая ТСХ-система является градиентной с точки зрения чисто адсорбционной хроматографии, когда используют только твердый адсорбент, сорбирующий молекулы вещества и «чистого» растворителя.

Чисто адсорбционная хроматография является предельным теоретическим случаем. В сорбенте имеются следы воды или небольшие количества другого полярного соединения, с самого начала дезактивирующие пластинку

и приводящие к возникновению градиента. Кроме того, до помещения пластинки в камеру для разделения слой сорбента поглощает из атмосферы некоторое количество воды. При разделении концентрация более полярного компонента уменьшается в направлении фронта, создавая градиент состава элюента в ходе анализа. Эти явления распространяются на все используемые сухие пластинки. С появлением U-камеры была разработана методика нанесения пробы на смоченный слой и приведения пластинки в равновесие в ходе разделения путем регулирования влажности в системе, что позволило выяснить вопрос о влиянии градиента состава элюента на производительность разделения ТСХ и КЖХ. При этом аналогично колоночной жидкостной хроматографии можно исключить градиент и в случае необходимости исследовать влияние градиента на качество разделения.

#### 3.4.5. Уменьшение давления паров

Для выяснения разницы в рабочих характеристиках ТСХ, КТСХ и КЖХ следует рассмотреть еще одну гипотезу. Речь идет о наблюдениях, сделанных ранее нашим бывшим сотрудником Жорданом и долгое время не находивших объяснения. Мы предприняли попытку разделить на бумаге и количественно оценить результаты разделения группы веществ, сходных по строению. При этом пробу наносили в виде полосы. Определенное известное количество веществ наносили в виде полосы на расстоянии 1—2 см от первой и проводили разделение восходящим способом. Несмотря на различные условия эксперимента, были получены качественно одни и те же результаты. В ходе опытов использовали различные типы бумаги с разными или одинаковыми направлениями волокон по отношению к направлению разделения (параллельно или перпендикулярно). Анализ проводили в цилиндрическом сосуде так, чтобы обе полосы продвигались в пространственно симметричных условиях. В ряде экспериментов использовали специальную оболочку для регулирования процесса. Даже когда оба фронта продвигались удовлетворительно в горизонтальном направлении, происходило выступание каждой из полос вещества во взаимно противо-

положном направлении. Если полоса фронта выгибалась вверх и налево и вниз и направо, тогда нижняя полоса изгибалась вниз и налево и вверх и направо. Однако перемещение полос в системе не поддавалось контролю. Полосы достаточно точно пересекались в середине, т. е. их среднее значение  $R_f$  совпадало.

Этот эффект легко возникает, когда две ТСХ-пластинки совмещают слоями сорбента, однако его легко избежать, если пространство между хроматограммами разделить на две части стеклянной пластинкой. Очевидно, что влияние разделяемых веществ на элюент недооценивалось. Даже при нанесении только  $10^{-9}$  г определяемого вещества количество растворителя, в котором растворяют компонент, очень мало. Если в зоне площадью 25 мм<sup>2</sup> присутствует  $50 \cdot 10^{-6}$  г исследуемого вещества, а зону можно было бы заполнить 2,5 мкл элюента, то в этом случае образуется 2%-ный раствор. Для распределительной системы, насыщенной, например, патридж-смесью, это означает расхождение на более простые системы растворителей и понижение давления паров элюента по сравнению с чистым растворителем. Эффект конкуренции, возникающий благодаря близости второй полосы с теми же самыми веществами на той же самой высоте, определяют по понижению давления паров элюента над обеими зонами. Это нарушает состояние равновесия, что приводит к отклонению зон от горизонтальной ориентации.

В КЖХ подобное состояние равновесия не возникает. Приняв упрощенное объяснение, можно предположить следующее. В ТСХ, которую можно рассматривать как жидкостную хроматографию в присутствии газовой фазы, находящейся в равновесии с элюентом, продольная диффузия — «размывание зон» — затруднена, поскольку перед отдельными веществами перемещается фронт пониженного давления паров элюента, по отношению к которому поддерживается равновесие путем взаимного фазового обмена. Это равновесие преимущественно устанавливается с тем компонентом системы растворителей, в котором растворяется соответствующее вещество.

Очевидно, что барьер области пониженного давления паров оказывает более эффективное воздействие при нанесении проб в виде полос по сравнению с методом нанесения



проб в виде отдельных зон. Эксперименты, проведенные авторами, подтвердили это и продемонстрировали лучшую эффективность разделения при нанесении проб в виде полос. Как и следовало ожидать, круговой барьер, возникающий в КТСХ, более эффективен из-за отсутствия краевых эффектов. В связи с этим сразу становится понятен эффект сдвига (Кайзер, май 1975 г.)

#### 3.4.6. Эффект движения элюента вокруг зоны

Образовавшиеся зоны часто принимают самые разнообразные формы, например форму полумесяца или гриба, или имеют «хвосты» спереди или сзади. Хроматографы обычно игнорируют этот факт. Большинство деформаций, за исключением образования хвоста позади места нанесения в результате необратимой адсорбции, обусловлено изменением потока или эффектами течения. Взаимодействие вещества и элюента (см. разд. 3.4.2) является причиной того, что растворитель обтекает зону вещества, а не десорбирует его и отделяет от сорбента. Оба эти процесса эндотермические и требуют определенного времени, поэтому нанесение пробы в виде полосы предпочтительнее. Однако в круговом методе обтекание отсутствует вообще.

### 3.5. Емкость разделения, динамическая область, анализ следов

Благодаря использованию описанных приемов на ВЭТСХ-слое можно разделить значительно большее количество веществ, чем в обычной ТСХ. При прочих равных условиях в КТСХ-систему можно нанести в 10 раз больше вещества, чем в линейную ТСХ-систему. В этой связи становится понятным, почему в тот период, когда препаративное разделение проводили на бумаге, так ценились круговые бумажные хроматограммы. Кольцо после разделения вырезали и после элюирования извлекали исследуемое вещество.

#### 3.5.1. Динамическая область

Практически всегда можно создать такие условия, чтобы компонент, находящийся в относительно малом количестве в смеси, удерживать в области старта. В адсорб-

ционном варианте на старте легче удерживаются более полярные компоненты, в варианте с обращенными фазами — менее полярные. В определенных условиях круговой ТСХ динамическая область значительно увеличивается вследствие расширения площади периферической области пропорционально величине  $R_{fкр}$  и расширению пика. Последнее, однако, значительно меньше, чем в линейной ТСХ, где увеличение площади зоны несколько превышает удвоенную площадь стартового пятна.

В случае когда компонент, пребывающий в меньшем количестве, нельзя удержать у старта, а компонент, присутствующий в большем количестве, продвинуть в область высоких значений  $R_f$ , то для разделения следует выбрать колоночную жидкостную хроматографию, имеющую несравненные преимущества, поскольку:

$$k = \frac{1 - R_f}{R_f} = \frac{1 - (R_{fкр})^2}{(R_{fкр})^2}.$$

Другими словами, вещества с высокими значениями  $R_f$ , продвигающиеся вместе с фронтом, регистрируются первыми и поэтому с большей чувствительностью, как это следует из вида пиков.

#### 3.5.2. Анализ следов

При анализе следов приходится иметь дело или с малыми количествами веществ, или с очень низкими концентрациями определяемых растворов. В первом случае, если возможности классических методов исчерпаны, следует использовать линейную ТСХ с большей динамической областью.

Растворы низких концентраций лучше анализировать методом КТСХ, поскольку, как это показано выше, количество определяемого вещества можно увеличить примерно в десять раз (можно нанести десятикратное по сравнению с линейной ТСХ количество пробы), что облегчает его идентификацию.

Упомянутая выше техника предварительного разделения применима и в линейной ТСХ, когда соотношение компонентов в смеси достигает больших значений. Растворитель, подбираемый для предварительного разде-

ления, переносит из области нанесения сначала главный компонент (компоненты) пробы, а затем следы вещества хроматографически отделяют от веществ, остающихся сзади его. Вследствие летучести этой системы растворителей можно фокусировать стартовое пятно, что является преимуществом ТСХ по сравнению с колоночной жидкостной хроматографией.

### 3.6. Воспроизводимость величин $R_f$ и $R_{fкр}$ , влияние качества пластинки

На воспроизводимость величин  $R_f$  и  $R_{fкр}$  влияют два основных фактора, и лишь один из них поддается контролю со стороны оператора, и то в ограниченной степени. Здесь имеется в виду изменение качества пластинок одного и того же производства как в разных партиях, так и в пределах одной партии. Это вызвано главным образом неоднородностью размеров частиц сорбента и их распределения, а также присутствием загрязнений в сорбенте. Сюда относятся также различие в значениях рН, средних размерах пор, активности, площади внутренней поверхности пор, неточности при проведении нанесения и высушивания, наличие прожилок, полос и неоднородностей в слое сорбента. Пластины может приготовить сам оператор. Однако для этого необходимы экспериментальный опыт и определенный уровень специальных знаний. Следует учитывать и экономическую сторону этого способа (количество сырья, израсходованного на приготовление пластинок за определенное время). Иногда полезно очищать пластинку соответствующим растворителем, опуская их в жидкость. Перед употреблением пластинки сорбент можно предварительно промыть сильно полярной смесью, например метанол — дихлорметан (1 : 1), с добавлением 3% водного 25%-ного раствора аммиака или уксусной кислоты в зависимости от предполагаемого элюента и анализируемых веществ. Следует избегать повторного загрязнения сорбента при высушивании на воздухе. Высушивание лучше всего проводить в вакуумном эксикаторе.

Чтобы улучшить воспроизводимость значений  $R_f$  и  $R_{fкр}$ , при каждодневном использовании готовых пластинок

надо добиваться исключительно однородного заполнения слоя сорбента элюатом после полного удаления всех растворителей, использовавшихся для нанесения пробы и предварительного разделения. В случае необходимости (при условии, что анализируемые вещества останутся неизменными) перед тем как охлажденные «сухие» пластинки помещать в «сухую» камеру для разделения их следует активировать (см. также разд. 3.3.3).

### 3.7. Влияние паров растворителей

Вторым фактором, влияющим на воспроизводимость величин  $R_f$  и  $R_{fкр}$ , является степень насыщения парами элюента газовой атмосферы в камере для разделения. В обычной лотковой камере для ТСХ трудно добиться воспроизводимости величины  $R_f$  вследствие искривления фронта растворителя и «поперечной» взаимосвязи величин  $R_{fкр}$  веществ, наносимых вдоль прямой линии. Обычно насыщения атмосферы пытаются достичь с помощью смоченной элюентом фильтровальной бумаги или установившая пластинку тем или иным способом. Важным отрицательным фактором является возникновение краевого эффекта.

При использовании вышеупомянутого метода (разд. 3.3.4) газовую атмосферу в КТСХ можно стабилизировать относительно легко. Для того чтобы оценить степень стабилизации, измеряют отклонение радиуса зоны (которое обычно не превышает 2%) от среднего значения. Так можно проиллюстрировать преимущества радиальной симметрии.

#### 3.7.1. Детектирование, количественная оценка

Детектирование путем выдерживания в парах проявляющего реагента предпочтительнее по сравнению с опрыскиванием, поскольку реакция протекает без образования капель, т. е. мелкодисперсно и однородно, что важно при детектировании непосредственно на пластинке. Одна-

ко этот способ имеет и ряд недостатков. Широко известный метод выдерживания хроматограмм в парах иода приводит к получению неустойчивого окрашивания, поскольку адсорбированный иод находится в равновесии со своими парами. Пятна бледнеют по направлению к краям пластинки, что делает недостоверной количественную оценку. В радиально симметричной круговой ТСХ краевые эффекты отсутствуют.

Высокое качество разделения в КТСХ можно также объяснить большим градиентом концентрации вдоль пути разделения, т. е. наличием диффузии в направлении разделения. Это означает, что при хорошем качестве разделения локальная концентрация нанесенного вещества не должна уменьшаться (см. разд. 3.4.2). В связи с этим облегчается количественная оценка, поскольку возрастает соотношение сигнал/шум, что подтверждается экспериментально. Для сканирования дуги зоны вещества в круговой ТС-хроматограмме был изготовлен диск, вращающийся со скоростью 2 или 6 об/мин с помощью синхронного двигателя со встроенным редуктором. Сканирование проводили на спектрофотометре фирмы «Opton». Если узкий луч, сфокусированный входной апертурой, навести на область, отстоящую на определенное радиальное расстояние от центра пластинки, то за один оборот диска можно подсчитать все вещества с этим значением  $R_f$  при нанесении нескольких веществ одновременно т. е. фотометрически определить их количество, произвести соответствующим образом необходимые операции суммирования и сравнения.

Здесь мы пользуемся возможностью выразить благодарность сотруднику фирмы «Opton» (Мюнхен) за создание пилотной установки.

Точность количественного определения данным методом ограничена, поскольку при нестабильных условиях разделения форма зон искажается. В связи с этим необходимо тщательно выполнять условия, изложенные в разд. 3.4 (пункты 1—7).

Способ измерения от центра пластинки к периферии малоинформативен, и техника его проведения некорректна. К тому же для его осуществления необходимы соответствующие приспособления, которых нет в продаже.

### 3.7.2. Применение градиента состава элюента

Оценивая ТСХ-пластинку, обычно не придают большого значения «значительному количеству примеси», остающемуся на старте, так как диаметр стартового пятна достаточно мал. Однако здесь необходимо проявить особое внимание. Пятно не расширяется из-за недостаточной полярности растворителя (при нанесении пробы оно распределяется по большей площади) и остается на старте. «Маленькое стартовое пятно» следует рассматривать как «вершину айсберга», об истинных размерах которого можно судить, используя значительно более полярный растворитель. Такой прием часто приводит к разделению пятна на несколько компонентов. В этом случае для определения всех присутствующих веществ рекомендуется использовать градиент растворителя.

Метод круговой ТСХ предназначен для проведения градиентного разделения, поскольку его рабочая методика (разд. 3.3.6) проста, результаты воспроизводимы, а занимающее много времени предварительное приведение системы в равновесие проводить не обязательно (в противоположность ЖХ). Это в известной степени компенсирует большой недостаток КТСХ по сравнению с линейной — невозможность проведения двумерного разделения, о котором, однако, не следует забывать.

### 3.7.3. Длительность разделения

Короткое расстояние, которое проходит пятно в ВЭТСХ, обуславливает небольшое время разделения, особенно при движении элюента по горизонтальной пластинке, а не против силы тяжести. Для пластинки размером  $10 \times 10$  см при длине вертикального пути разделения 4,5 см время разделения уменьшается в 3—4 раза. Это очень ценно при массовых анализах и особенно в исследовательских разработках, когда приходится ожидать результатов подбора оптимальной системы растворителей, перед тем как приступать к дальнейшему планированию экспериментов.

В описываемой системе можно быстро и без затруднений сменить элюент. Оporожнение, очистка и высушива-

ние чашки с одновременной очисткой фитиля проводят за 1—2 мин. Еще минута требуется для пропускания нового элюента через фитиль.

#### 3.7.4. Требования к материалам

Обычные пластинки размером  $20 \times 20$  см нужно использовать только в особых случаях, например в количественном анализе при экстремальных динамических условиях, поскольку пока еще недоступны соответствующие камеры. Для нанесения четырех или восьми проб размер пластинки не должен превышать  $10 \times 10$  см. В камеру диаметром 9 см обычно наливают 10 мл элюента. Если длина пути разделения увеличивается (что увеличивает время разделения), количество элюента можно удвоить или утроить. При уменьшении длины пути разделения количество элюента можно уменьшить.

В градиентном разделении и в методе нисходящего разделения требуется меньшее количество элюента (разд. 3.3.5, 3.3.6), поскольку, не считая расхода растворителя на очистку фитиля, расход элюента определяется площадью разделения, т. е. составляет максимум 5 мл.

#### 3.7.5. Площадь, необходимая для проведения анализа, возможности ручных операций, разное

Поскольку установка и пластинки имеют небольшие размеры, для проведения экспериментов необходима небольшая площадь. Поверхность, на которой располагают прибор, должна быть строго горизонтальной (разд. 3.3.3). Метод манипулирования вручную очень прост, его легко освоить (см., например, описание рабочей методики), и это подтверждено практикой.

Однако исключительно оптимистичная перспектива рентабельности описываемого метода не должна заслонять те трудности и ограничения, которые неизбежны при появлении любого нового метода. Разрешение их требует времени... много времени: на ознакомление с сутью проблемы (например, на прочтение этой книги), на обсуждение (стоит ли всем этим заниматься?), на принятие оконча-

тельного решения (кто может сделать это?). А время на эксперименты? Идущие впереди ошибаются чаще других. И если все же кто-то отваживается на эксперимент, возникают дискуссии о корректности результатов, наличии в них новизны. Возникает вопрос, не устарели ли они. Не проще ли и безопаснее работать старыми методами, до тех пор... пока новый метод не будет подтвержден другими? И что делать со старыми дешевыми камерами для ТСХ, которые так удобны для отмывки пластинок?... Все это является оборотной стороной «подсчета рентабельности».

## Глава 4

### U-КАМЕРА

*Р. Е. Кайзер*

*Kaizer R. E., Institute of Chromatography,  
Bad Dürkheim, BDR*

ВЭТСХ-слой по своей разделяющей способности и мощности превосходит КЖХ-колонки. Эти качества проявляются полностью на коротких участках пути разделения. Данное утверждение относится только к тем случаям, когда анализы нельзя проводить при оптимальных значениях высоты тарелки, определяемых обычным способом. Разделяющая мощность есть результат разделения, зависящий от времени. Методы нанесения пробы и обработки, занимающие несколько часов, нельзя считать приемлемыми, поскольку при проведении анализа важным фактором является его длительность. Если разделение занимает 2 мин, его легко повторить. Конечно, в этом случае возникает проблема выбора «правильной» величины пробы, но это вопрос математической статистики, который не будет здесь рассмотрен. Для получения правильных результатов приходится проводить многократные измерения и калибровки, и поэтому важно, чтобы анализ можно было закончить за секунды, а не за минуты. Необходимо учитывать каждый миллиметр длины участка сорбента, который не участвует в разделении. Приемлемое разделение предпочтительнее получать на наименьшем пути.

Практическим аспектом решения аналитических проблем является разработка соответствующих методик эксперимента. Существует мнение, что линейная ТСХ по сравнению с круговой — более экспрессный метод, но это справедливо только для случая, когда две системы сравниваются с точки зрения длины пути разделения.

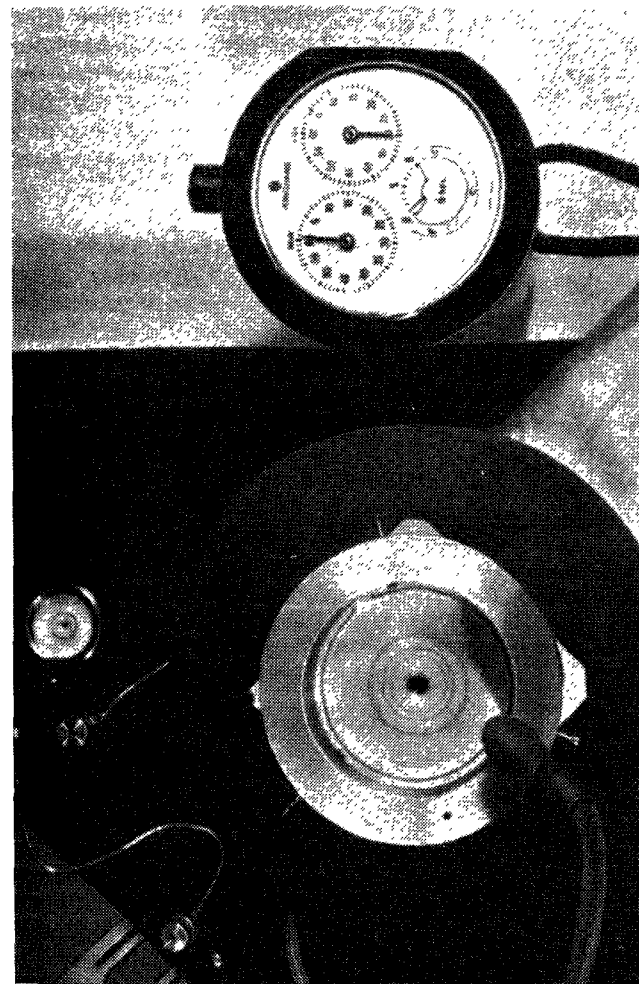


Рис. 4.1. Общий вид *U*-камеры для непрерывного ВЭТСХ-разделения, насос типа «Orlita» АЕ-10 и нагревательное металлическое кольцо (см. также рис. 4.6).

Однако удлинение пути разделения в круговой ВЭТСХ на несколько миллиметров компенсируется улучшением четкости разделения и, следовательно, более высокой разделительной мощностью этого метода в сочетании с большей точностью количественных и качественных его результатов. Целесообразно сравнить те величины, которые

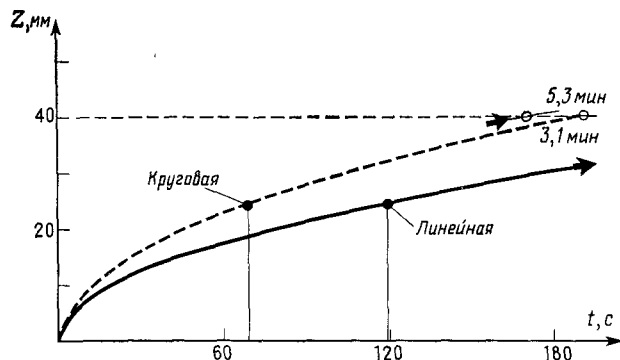


Рис. 4.2. Сравнение скорости продвижения в линейной и круговой ТСХ.

Условия эксперимента: элюент — толуол; температура 20° С; относительная влажность 40%; ВЭТСХ-пластинки с закрепленным слоем силикагеля. В случае линейной ТСХ использовали функцию потока

$$(Z)^2 = 0,201 \cdot t,$$

где Z выражена в миллиметрах; t — в секундах; применительно к круговой ТСХ использовали функцию потока при скорости 1 мкл/с:

$$(Z)^2 = 0,195 \cdot t,$$

Z — в миллиметрах; t — в секундах.

можно измерить непосредственно: путь разделения в линейной и диаметр кольца в круговой ВЭТСХ. В последнем методе за 188 с диаметр кольца достигает 40 мм, в линейной ВЭТСХ элюент проходит то же расстояние за 320 с. Длина пути, равная 40 мм, — это максимальная длина пути разделения (предел оптимальной длины пути разделения), технически осуществимая в обычных U-камерах фирмы «Самар», поэтому она выбрана для сравнения. К тому же при определении оптимальной высоты тарелки в линейной ВЭТСХ длину пути разделения обычно выби-

рают равной 40 мм. В настоящее время для специальных анализов и для одновременного разделения с несколькими элюентами фирма «Самар» разрабатывает конструкцию макро-U-камеры.

#### 4.1. Преимущества использования U-камер в ТСХ

1. Подвижная фаза изолирована от окружающей атмосферы. С помощью хроматографически чистых растворителей можно получить истинные величины  $R_f$ . В любых камерах-лотках и даже в сэндвич-камерах первоначально чистая подвижная фаза в течение нескольких секунд или минут загрязняется. Присутствие полярных загрязнений даже в очень малых количествах совершенно недопустимо в адсорбционной ТСХ.

2. Объемную скорость подвижной фазы контролируют с помощью электронных устройств, что позволяет достичь оптимального соотношения  $H/u$ , причем условия эксперимента легко унифицировать. Имеется возможность сравнивать получаемые результаты, поскольку параметры, связанные с контролем объемной скорости потока элюента, легко воспроизвести. Объемную скорость потока измеряют с помощью аналитических весов.

3. Можно использовать методики с градиентом условий разделения.

4. Движение газовой фазы можно контролировать с помощью электронного устройства, направляя навстречу или параллельно подвижной фазе. Это позволяет исключить влияние газовой фазы, являющееся одним из главных препятствий для получения воспроизводимых результатов в линейной ТСХ, и таким образом стабилизировать  $R_f$ . Отпадает необходимость в стандартном образце, который все еще необходим при проведении анализа линейной ВЭТСХ. При использовании стандарта время разделения увеличивается на 50%, а количество проб, разделяемых на одной пластинке, уменьшается вдвое.

5. Поскольку камера полностью симметрична по конструкции, при разделении пластинку можно установить горизонтально. Появилась возможность исключить внешние влияния при изменении температуры и возникновении

микроклимата в проточной камере для разделения, которая по конструкции напоминает сэндвич-камеру.

6. Место нанесения пробы и точку подвода подвижной фазы определяют в U-камере с точностью до 0,1 мм без какой-либо корректировки. Это позволяет устранить связанные с указанными операциями систематические ошибки.

7. При дозировании через центр ТСХ-системы разделение начинается сразу же. В линейной ТСХ операция нанесения пробы связана с некоторой задержкой во времени и уменьшением пути разделения. Последнее можно свести к минимуму, если эксперименты проводить в тщательно установленной миниатюрной проточной камере при воспроизводимом введении пробы.

8. Чтобы облегчить автоматическую обработку результатов, пластинки в держателе помечают. Пробы (6—12 проб), нанесенные вокруг центра системы, кодируют и считывают механическими, оптическими или электромагнитными методами. Эту процедуру оптимизируют по отношению, например, к длине волны излучения при оптическом сканировании. После разделения пластинку высушивают и помещают в сканирующее устройство, используемое для детектирования полученной хроматограммы.

9. Расход материалов на изготовление пластинок для круговой ВЭТСХ в шестнадцать раз ниже, чем в обычной ТСХ, и в четыре раза ниже, чем в линейной ВЭТСХ. Потребляемое количество подвижной фазы также очень мало: для проведения одного анализа необходимо всего 0,15 мл элюента. Подсчитано, что благодаря низкому расходу растворителя система годна к употреблению в течение 14 дней.

10. На 1—12 разделений затрачивают максимум 180 с.

11. U-камеру можно использовать в сочетании с ВЭЖХ и ГХ, включая капиллярную ГХ. При помощи лабораторного подъемного устройства пластинки с точностью до 0,1 мм устанавливают под подводящими капиллярами или опрыскивающим устройством. Длительность нанесения элюата из колонки контролируют, изменяя скорость вращения пластинки.

12. Для того чтобы улучшить результаты нанесения одной или нескольких проб, которые размещают вокруг

центра ТСХ-системы, используют фокусировку химическими методами. Это позволяет достичь ширины исходного пятна, равной 0,1 мм.

13. Устранены технические трудности с осуществлением непрерывной ВЭТСХ (рис. 4.1).

14. Система компактна.

15. Для проведения анализов требуются операторы средней квалификации.

#### 4.2. Недостатки обычной U-камеры в ТСХ

В U-камере можно анализировать не более 12 проб, причем длина пути разделения, измеряемая от центральной точки, не должна превышать 20 мм. В U-камере нельзя использовать обычные ТСХ пластинки. Эти ограничения препятствуют ее использованию при решении ряда прикладных задач. Однако описываемая камера пригодна для проведения большинства количественных и качественных разделений, в которых важна скорость анализа. В макро-U-камере можно анализировать 60 проб при длине пути разделения 40 мм, но это занимает значительно больше времени по сравнению с анализом в обычной камере: 10—16 мин на однократное разделение 60 образцов.

Камера имеет круглую форму. В плоских камерах, таких, как F-камеры (прототип IfC-камеры), предусмотрена возможность контроля объемной скорости подвижной фазы, хотя это и приводит к усложнению электронного оборудования для программирования во времени, при использовании нескольких насосов и обводного трубопровода. Но при разделении в таких камерах реализуются преимущества линейной ТСХ, такие, как двумерное и многомерное разделение, а также анализ значительно большего числа образцов. Величины  $R_f$  получают лучшими, чем в проточных камерах и сэндвич-камерах. Детальное описание U- и F-камер можно найти в инструкциях, прилагаемых к этим камерам. Содержание этого раздела целесообразно ограничить описанием методических принципов работы на U-камере и некоторыми основными практическими примерами.

## 4.3. Заключение

Хроматографические параметры можно измерить за 3 мин после начала процесса в U-камере, а в линейной ТСХ — через 5 мин. При работе следует учитывать различия между двумя методиками, упоминавшиеся ранее.

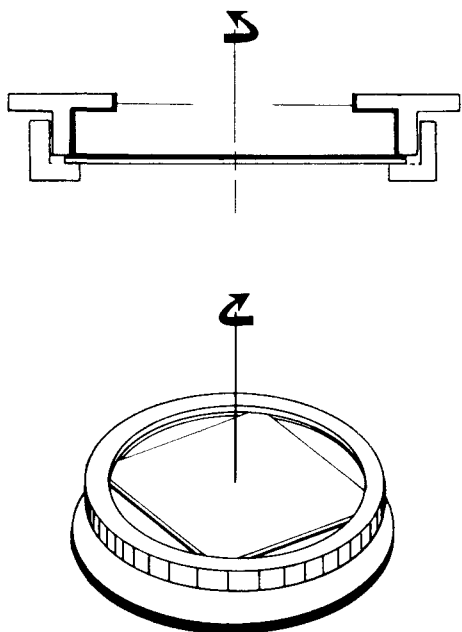


Рис. 4.3. Держатель для ВЭТСХ-пластинок размером  $5 \times 5$  см. Загруженный держатель в строго горизонтальном положении помещают в U-камеру на вращающуюся подставку, столик сканирования или устройство для соединения с ГХ- или КЖХ-системой. Пластинку закрепляют в держателе с помощью штыкового затвора. Эта операция занимает 5 с. Если пластинка обрезана неаккуратно, это можно исправить, отрезав ее края.

В своей будущей работе в области инструментальной микро-ТСХ автор намерен ввести в линейную ТСХ метод нанесения пробы на смоченный растворителем сорбент (гл. 7), который до сих пор использовали только в круговой ТСХ. Для непосредственного оптического детектирования пластины необходимо разработать новую методику.

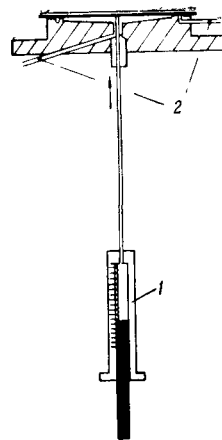


Рис. 4.4. Поперечное сечение U-камеры фирмы «Camag».

1 — шприц для дозирования потока подвижной фазы, управляемый шаговым электродвигателем (например, шприц из стекла и тефлона), емкостью 250 мкл или 1 мкл; 2 — ввод и вывод газовой фазы, направление движения которой может совпадать или быть противоположным направлению движения элюента; с помощью газовой фазы удаляют пары элюента, высушивают или смачивают пластинку.

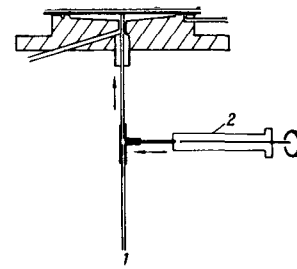
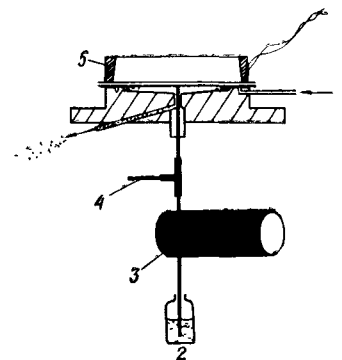


Рис. 4.5. Схема нанесения пробы на смоченный слой ВЭТСХ-пластинки размером  $5 \times 5$  см.

Разделение проводят с помощью шприца ячейки для дозирования фирмы «Camag» или с помощью насоса типа «Orlita» АЕ-10 (см. рис. 4.6). После того как слой смочен элюентом, в поток подвижной фазы (объемная скорость  $0,4$  мкл/с) вводят пробу и затем доводят скорость элюента до оптимального значения  
1 — ввод элюента шприцем (приводит насос) со скоростью  $1$  мкл/с; 2 — дозирующее устройство для смачивания объемом  $10-1000$  нл.

Рис. 4.6. Схема проведения непрерывного ВЭТСХ-разделения, являющегося вспомогательным методом для непрерывной ВЭКЖХ и других непрерывных методов разделения.

1 — ввод сухого азота или азота, барботированного через сосуд с растворителем и насыщенного парами этого растворителя; 2 — элюент (соответствующая смесь растворителей); 3 — насос типа «Orlita» АЕ-10, характеризующийся прекрасным функционированием в течение длительного времени разделения, который обеспечивает объемную скорость потока в пределах  $1$  мкл/с —  $10$  мл/мин как для ВЭТСХ, так и для ВЭКЖХ; 4 — дозирующее устройство для введения нанолитровых объемов (см. гл. 5); 5 — нагревательное металлическое кольцо из алюминия наружного диаметра  $47$  мм и внутреннего диаметра  $37$  мм.





Для проведения сложных качественных разделений круговым методом можно приспособить F-камеру размером  $100 \times 100$  мм. Большой точности можно добиться с помо-

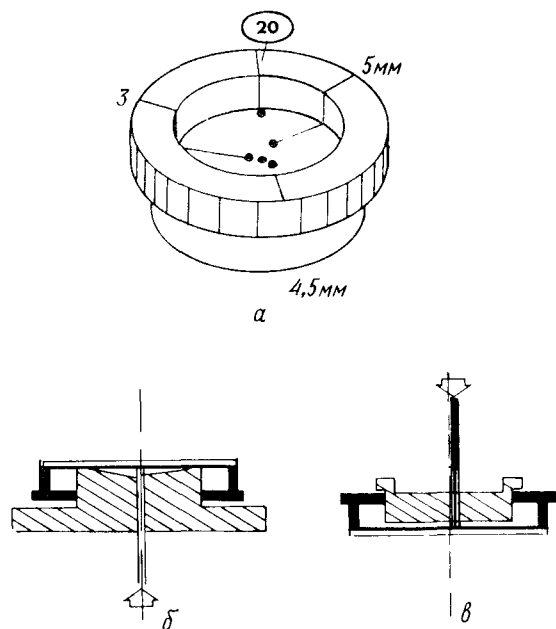


Рис. 4.7. Схема держателя пластинок фирмы «Самар», с помощью которого можно точно устанавливать систему дозирования и пластинку.

*a* — общий вид камеры; *б* — схема закрепления пластинки на камере; *в* — эксцентрическое нанесение пробы с помощью специального шаблона.

щью макро-U-камеры, но это сопряжено с увеличением времени эксперимента.

Элюент подводят через платино-иридиевый капилляр. Капилляр необходим при нанесении пробы (в том числе и с аппликатором) на смоченный слой сорбента в центр ТСХ-пластинки. Обычные капилляры обладают эффектом памяти и значительным мертвым объемом. Плоский нижний конец капилляра можно перемещать относительно поверхности с точностью 0,01 мм. При использовании капилляра со скошенным торцом в потоке элюента возни-

кают возмущения, что приводит к искажению величин  $R_f$ , увеличению времени разделения и засорению капилляра. В качестве иллюстрации эксперимента приведем

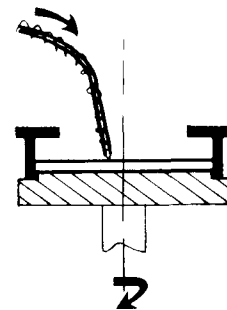


Рис. 4.8. Схема соединения ТСХ-пластинки, закрепленной в держателе U-камеры, с выводом другой системы разделения, например GX или ВЭКЖХ.

следующий конкретный пример. Если диаметр круга равен 36 мм, поток толуола с объемной скоростью 0,9 мг/с (измеренный на аналитических весах) можно полностью испарить, используя нагревательное кольцо (15—20 Вт, температура 75° С, измерения проводили терморарой). При

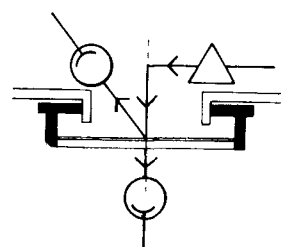


Рис. 4.9. Схема автоматической установки для оптического сканирования *in situ*.

Пластинка закреплена в центрированном держателе, который установлен на вертикальном металлическом блоке. Этот блок вращается с помощью шагового двигателя со скоростью 360° за 5, 15 или 60 мин. Металлическая конструкция блока облегчает регулирование температуры. С помощью простого механического устройства положение пластинки можно регулировать с точностью 0,1 мм (лабораторным подъемным приспособлением).

указанной выше объемной скорости  $t_m$  приблизительно равно 280 с, что позволяет экстраполировать все величины, зависящие от  $k$ , до  $10 \times t_m$ , а также измерять время в методике с постоянными условиями разделения при диаметре нагревательного кольца 37 мм. При уменьшении диаметра кольца  $t_m$  уменьшается. Закрепленные в держателе ВЭТСХ-микропластинки помещают в оптическое сканирующее устройство, причем положение пластинки фиксируют с точностью  $\pm 0,1$  мм. Таким образом, положение оптического центра круговой ТСХ-системы регулируется автоматически. В обычном варианте ТСХ эта операция

занимает обычно много времени. Когда быстродействующие интеграторы будут доступнее, вращательное сканирование, в котором результаты представлены относительно угла поворота, может при известных условиях стать экспрессным методом.

Точность установки пластинки составляет  $\pm 0,2$  мм, поскольку все элементы системы симметричны относительно оси. Для облегчения эксцентрического дозирования вокруг центра пластинки высверлены отверстия.

Существуют, конечно, и другие доступные методы нанесения пробы при фиксированном положении дозирующего устройства. В одном из этих методов используют вращающуюся конструкцию, закрепляя пластинку в держателе. Аппликатор используют в сочетании с устройством IfC для нанолитрового дозирования проб в ВЭТСХ (см. гл. 8).

## МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ПРОБЫ В ВЭТСХ-СИСТЕМУ

*P. E. Kайзер*

*Kaizer R. E., Institute of Chromatography,  
Bad Dürkheim, BDR*

Влияние размера стартового пятна на результаты анализа было рассмотрено в разделе книги, посвященном теории. Широкие пятна снижают мощность разделения ВЭТСХ. На хроматографическое разделение влияет качество нанесения пробы  $Q_D$ . Для оценки этой характеристики можно воспользоваться выражением

$$Q_D = \frac{b_1 - b_0}{b_1 + b_0}.$$

В процессе разделения практически нельзя предотвратить расширение пика  $B = b_1 - b_0$ . Но если  $b_0$  уменьшить, насколько это возможно,  $Q_D$  приближается к 1, что означает сохранение мощности разделения системы. ВЭТСХ-разделение можно проводить на первоначально сухом или смоченном слое. После нанесения пробы растворитель удаляют из сорбента, и пластинку используют для дальнейшего разделения с помощью другого элюента. Это ограничивает отрицательное влияние на результаты анализа широких стартовых пятен пробы, характеризующих общую ошибку операции нанесения (см. гл. 3, описывающую преимущества, область применения и недостатки кругового метода разделения). Однако ошибки дозирования исправить нельзя при нанесении пробы или образца на смоченный слой. Отсюда очень важно, чтобы  $b_0$  оставалось малым.\* Для этого производят фокусировку, предотвращая нежелательное расширение стартового пятна.

### 5.1. Предварительная оптимизация нанесения пробы

Для того чтобы в какой-то степени предотвратить ошибки, возникающие при нанесении пробы, используют специальные приемы и тщательно подобранные подвижные фазы. Помимо прочих недостатков, описанные приемы связаны с большими затратами времени, поэтому возрастает роль предварительной оптимизации дозирования. Целью оптимизации является нанесение проб в виде пятен, диаметр которых  $b_0$  не превышает 0,1 мм. Это достигают использованием минимального объема пробы с максимальной высокой концентрацией раствора, применением наиболее подходящего растворителя и эффективного оборудования.

### 5.2. Объем дозирования

Предположим, что образец растворим в соответствующем растворителе, применение которого обеспечивает минимальные величины  $R_f$  для большинства компонентов образца на слое сорбента. Однако выбор растворителя часто затруднен, потому что на практике обычно имеют дело со сложными по составу смесями, а не с модельными композициями. Для упрощения дальнейшего изложения допустим, что слой сорбента оказывает потоку элюента равномерное сопротивление вдоль всего слоя. Тогда раствор пробы распространяется по слою симметрично и, по-видимому, в соответствии с функцией потока в ТСХ имеет форму полусферы. Предварительные расчеты показывают, однако, что полусферу получить нельзя, потому что невозможно нанести пробу такого малого объема. Проба объемом более 2 нл доходит до стеклянной подложки. Таким образом, пространство, заполненное растворителем, в котором растворен образец, имеет форму цилиндра толщиной  $D$ . В разбираемом примере толщина ВЭТСХ-слоя 0,19 мм. Далее объем дозируемого раствора возрастает по уравнению (гл. 2)

$$V_{\text{дозы}} = V_{\text{раств}} (1 + A_s/A_m) = 1,395 V_{\text{раств}}$$

Это позволяет последовательно определить объемы дозирования, диаметр пятна и  $b_0$  (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Взаимосвязь между объемом наносимой пробы и диаметром стартового пятна

Объем пробы $V$ , нл <sup>а</sup>	$d_{\text{пятна}}$ , мм		$b_0$ , мм
	вычисленный <sup>б</sup>	измеренный <sup>в</sup>	
1000	3,06	3,1	1,8
500	2,16	2,2	1,3
200	1,37	—	0,8
100	0,97	1,1	0,6
50	0,68	—	0,4
20	0,43	0,6	0,3
10	0,31	—	0,2
5	0,22	—	0,1
2	0,14	—	0,1

<sup>а</sup> 1 нл = 0,001 мкл.

<sup>б</sup> Вычислено при  $R_f = 1$  для образца и растворителя.

<sup>в</sup> Значения получены для красного красителя на силикагеле.

### Заключение

Для ВЭТСХ объемы проб должны составлять менее 10 нл или (0,01 мкл). Их отмеривают шприцем марки «Hamilton» 7101. Если можно выбрать растворитель, при использовании которого величины  $R_f$  даже для наименее полярных компонентов образца не превышают 0,1, то объем пробы можно увеличить до 100 нл. При этом получают  $b_0$ , приблизительно равное 0,1 мм. Если последовательно нанести 10 объемов по 0,1 мкл (100 нл), то в ВЭТСХ-систему можно ввести большее количество анализируемого вещества или сконцентрировать на пластинке «следы» каких-либо соединений в пробе. Однако даже и в этом

случае при использовании растворителя, обеспечивающего  $R_f = 0,1$ , нельзя избежать ошибок.

При расчете объема дозирования, равного 2 нл, и  $b_0 = 0,1$  мм, не принимали во внимание дозирующую систему. Диаметр иглы шприца «Hamilton» 7101 равен 0,45 мм. Если металл смачивается раствором, диаметр пятна будет увеличиваться до 0,5 мм. Таким образом,  $b_0$  становится в 5 раз больше, чем это необходимо для оптимального нанесения пробы. Диаметр пятна, например равный 0,6 мм (см. табл. 5.1), по отношению к диаметру пятна 0,43 мм является уже критическим. Стартовое пятно диаметром менее 0,3 мм при объеме дозирования 10 нл удастся получить только при очень искусном нанесении, одновременно используя растворитель, обеспечивающий  $R_f = 0,1$ , и испаряя его в течение миллисекунд. Поверхность силикагеля ВЭТСХ-пластинок фирмы «Merck» механически твердая. Если с дозирующим устройством, находящимся в контакте с поверхностью пластинки, обращаться очень аккуратно, то поверхность нарушается очень незначительно. При работе дозирующего устройства механические повреждения слоя неизбежны, и это всегда вызывает понижение мощности разделения.

Ниже излагаются рекомендации по предварительной оптимизации нанесения пробы, основанные на обсуждавшихся приемах. После их проведения дополнительные операции по коррекции результатов нанесения не нужны.

1) Необходимо выбирать по возможности наибольшую концентрацию раствора пробы.

2) Следует выбирать элюент с такими свойствами, при которых все компоненты пробы характеризовались бы  $R_f < 0,1$ .

3) Площадь поперечного сечения иглы дозирующего устройства должна быть менее 0,5 мм в диаметре. В некоторых существующих устройствах для нанесения пробы капилляры имеют диаметр, равный 0,3 мм.

4) Давление иглы на слой не должно превышать 100 г/мм<sup>2</sup>. Это соответствует «давлению» в 5 г при внешнем диаметре иглы 0,3 мм и внутреннем 0,15 мм. Прежде чем приступить к проведению дозирования порциями по 0,1 мкл, не повреждая поверхностный слой, следует тщательно подготовиться к этой операции.

### 5.3. Дозирование нанолитровых объемов

Дозирование нанолитровых объемов с помощью шприца типа «Hamilton» и микрометра описано в гл. 8. Использование специального держателя позволяет получить высокую точность дозирования, оптимальное давление при контакте с пластинкой, которое можно регулировать аналогично давлению звукоснимателя на пластинку, упрощает ручные операции.

Для того чтобы достичь хорошего опорожнения капилляра, давление его на слой должно быть минимальным (достаточно легкой деформации верхней части слоя, например  $\sim 0,0001$  мм). Использование платино-иридиевых капилляров вместо стеклянных значительно улучшает точность дозирования нанолитровых проб. Эти капилляры химически инертны, и их внутренняя поверхность имеет исключительно высокую чистоту, поэтому они практически не обладают эффектами памяти. Такие капилляры можно прокалывать; они обладают механической прочностью, что делает их идеальным материалом для контакта с твердыми ВЭТСХ-слоями.

К преимуществам использования платино-иридиевых капилляров (рис. 5.1) можно отнести то, что объемы растворов проб различных образцов воспроизводимы в пределах 3—5% отобранного объема. При отборе одной и той же пробы воспроизводимость составляет  $\pm 0,7\%$  ее объема (имеется в виду стандартное отклонение 10 отдельных измерений). Большое расхождение в воспроизводимости для одинаковых и разных проб вызвано тем, что в капилляре удерживается разное количество раствора в зависимости от его полярности, вязкости раствора пробы, а также смачиваемости поверхности капилляра этим раствором. Максимальный объем дозирования составляет 22 нл на 1 мм капилляра. Капилляр можно прокалывать в пламени. К недостаткам этого устройства для отбора проб следует отнести то, что оно выполнено неразборным.

В ВЭТСХ используют также стекляннo-металлические капилляры с окошком (рис. 5.2), через которое можно наблюдать за процессом их наполнения. Это устройство в сочетании с аппликатором фирмы «Merck» (номер по

каталогу 10226) очень удобно для проведения обычного варианта ТСХ. В аппликаторе используются капилляры, имеющие относительно большой объем, равный 750 нл, т. е. их объем намного выше, чем это нужно для ВЭТСХ. Преимуществом стеклянно-металлических капилляров является то, что их стоимость ниже стоимости платино-иридиевого капилляра (рис. 5.1) при приблизительно

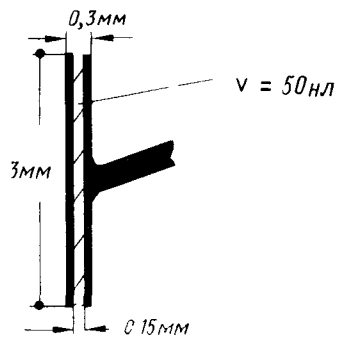


Рис. 5.1. Самозаполняющийся платино-иридиевый капилляр для дозирования.

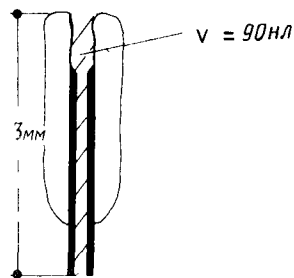


Рис. 5.2. Стеклянно-металлический капилляр с окошком для наблюдения за процессом наполнения (удобен в сочетании с аппликатором фирмы «Merck» № 10226 для использования в линейной ТСХ).

равной воспроизводимости. Стеклянно-металлические капилляры позволяют дозировать 50 и 100 нл раствора; чтобы исключить «эффекты памяти», их трижды промывают новым раствором. К недостаткам стеклянно-металлических капилляров относится то, что они имеют очень малый объем, их нельзя прокалывать. Кроме того, для замены капилляра требуются специальные инструменты.

В ряде случаев для нанесения макроколичеств анализируемого вещества целесообразно совместное применение платино-иридиевой иглы и измерительного капилляра (рис. 5.3). Это устройство можно использовать в дозирующей системе, описанной в гл. 4, или с упомянутым выше аппликатором. Капилляр заполняют избыточным количеством раствора, затем сливают часть раствора до

желаемого объема. Дозирование проводят с помощью механического держателя или вручную. При дозировании необходимо приложить давление контакта, приблизительно равное 5 г. Это можно сделать сравнительно простым спо-

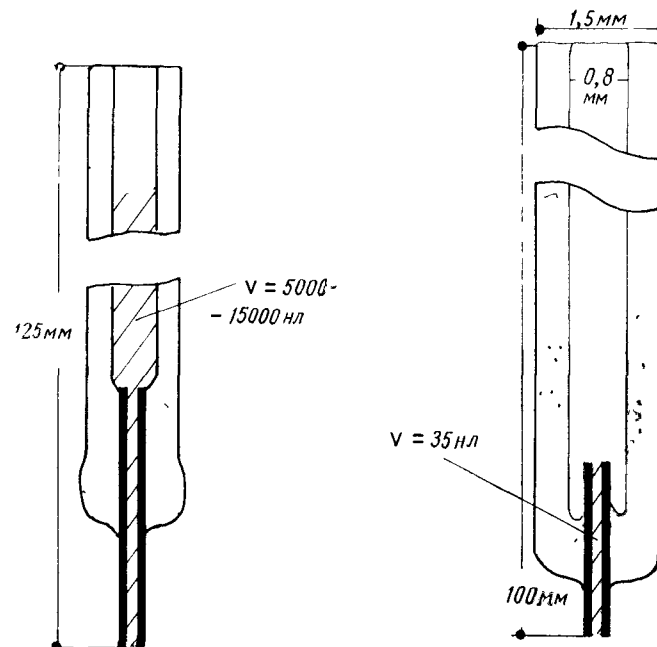


Рис. 5.3. Дозирующее устройство, состоящее из платино-иридиевой иглы и измерительного капилляра, для нанесения макропроб (можно использовать для нанесения проб способом, описанным в гл. 4, и в сочетании с аппликатором).

Рис. 5.4. Легко очищаемый капилляр для дозирования макропроб постоянного объема.

способом: пластинку размером 5 × 5 см помещают на весы и уравнивают, затем прилагают давление, вызывающее отклонение весов, соответствующее 5 г. Это устройство находит широкое применение, его можно использовать также для качественного ТСХ-анализа (микроразде-

лений) и нанесения пробы на пластинку в виде линии. Недостатком такого устройства является то, что в некоторых случаях погрешность дозирования достигает  $\pm 100$  нл.

Хорошие результаты при массовых анализах проб в настоящее время получают с помощью 100- или 200-нанолиитрового дозирующего платино-иридиевого капилляра (рис. 5.4). Это устройство используют в дозирующей системе (гл. 8). Магнитный держатель позволяет осуществлять быстрое самонастраивание. Положение пятен можно воспроизвести с точностью, превышающей  $\pm 0,1$  мм. Это справедливо и для случая, когда приходится наносить повторные пробы в одно и то же место для того, чтобы избежать потери вещества при промывании капилляра растворителем. Устройство, показанное на рис. 5.4, легко очистить.

#### 5.4. Нанесение пробы на смоченный слой

Этот способ нанесения достаточно прост. На линии, соединяющей слой сорбента и сосуд с элюентом, устанавливают тройник. После соответствующей подготовки слоя (удаление следов кислорода и воды или приведение сорбента в равновесие с газовой фазой посредством различных полярных растворителей) в данную систему вводят пробу объемом 20—1000 нл. При этом следует выполнять следующие условия: мертвый объем дозирующего устройства не должен превышать нескольких нанолитров, «эффект памяти» должен отсутствовать.

В связи с этим было бы желательно разработать дозирующее устройство для точного и воспроизводимого нанесения пробы объемом 20—1000 нл. В таком устройстве должны отсутствовать эффект памяти, потери и размывание пробы, неизбежные в других дозирующих устройствах. Операция нанесения пробы не должна смещать подвижного равновесия фаз, что способствует расширению области применения непрерывной ТСХ.

Ширина стартового пятна  $b_0$  зависит от конструкции дозирующего устройства. Она обычно увеличивается, когда пробу наносят на смоченный слой. Увеличение  $b_0$  вызывает уменьшение мощности разделения. Однако этот

эффект значительно меньше, чем в случае дозирования пробы объемом 200 нл.

Требования, предъявляемые к операции дозирования на смоченный слой, можно свести к следующему. Объем дозирования должен быть не менее 10 нл. Относительное стандартное отклонение при повторном дозировании должно составлять  $\pm 0,6\%$ , а абсолютное стандартное отклонение 1—2% даже при абсолютной величине объема 20 нл (что обеспечивается применением соответствующего дозирующего устройства, например шаблонов, устройств для многократного нанесения или электронного дозирующего устройства фирмы «Самэг»). При дозировании необходимо избегать потерь элюата (за счет испарения) или обогащения (за счет конденсации из газовой фазы). Эта операция должна занимать мало времени и быть дешевой.

Дозирующее устройство для нанесения наногаммовых проб на слой включает шприц типа «Hamilton» 7101 объемом 1 мкл. Игла шприца вставлена в 0,5-миллиметровую платино-иридиевую трубку. Это соединение не имеет мертвого объема, оно закрыто 0,5-миллиметровым коническим тефлоновым уплотнением, действующим подобно кассете разделительных уплотнений, разработанных в Институте хроматографии. Диаметр платино-иридиевой трубки постепенно уменьшается от 0,5 до 0,2 мм. Часть трубки с меньшим диаметром помещают на слой сорбента ВЭТСХ-пластинки. Устройство приспособлено для использования вместе с U-камерой фирмы «Самэг». На рис. 5.5 представлен внешний вид дозирующих приспособлений (за исключением устройства, изображенного на рис. 5.2).

Применение описанных дозирующих устройств исключительно малых размеров позволяет получить  $b_0$ , равное приблизительно 0,4 мм, при объеме дозирования 50 нл и объемной скорости подвижной фазы 0,4 мкл/с. В ходе экспериментов использовали ВЭТСХ-пластинку с силикагелем, а в качестве подвижной фазы — толуол. При нанесении проб больших объемов с помощью фокусировки можно получить величину  $b_0$ , равную 0,3 мм. Этого в принципе достигают двумя способами.

1. Первым способом является тепловая фокусировка в круговой ВЭТСХ. Подвижную фазу подводят непре-

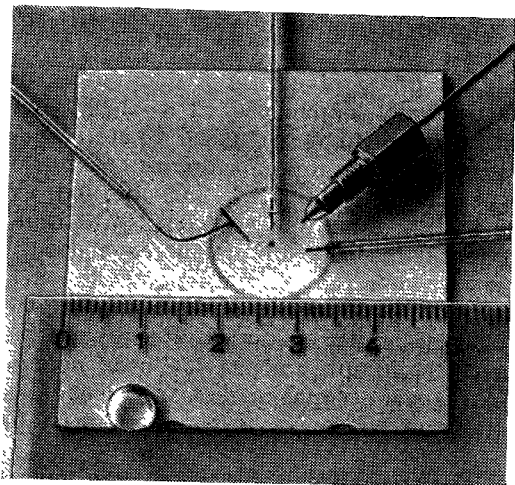


Рис. 5.5. Внешний вид нескольких устройств для неавтоматизированного дозирования.

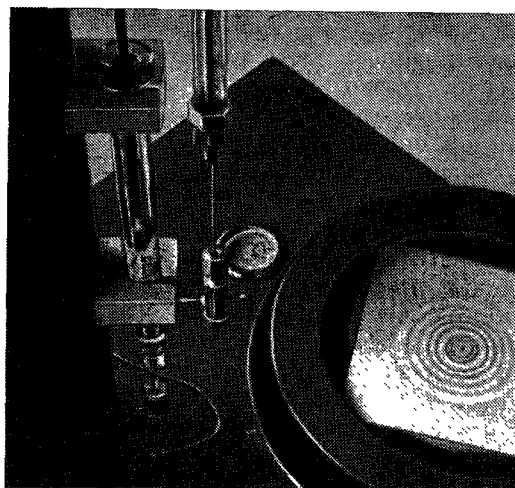


Рис. 5.6. Ячейка для дозирования на смоченный слой проб объемом 10—250,000 нл в  $U$ -камере фирмы «Сатаг».

рывно с объемной скоростью 0,4 мкл/с. Пробу наносят на смоченный слой. Газ подают в камеру через центральное дозирующее кольцевое отверстие. Тепло для полного испарения подвижной фазы подводят к стеклянной пластинке через металлическое кольцо в соответствии

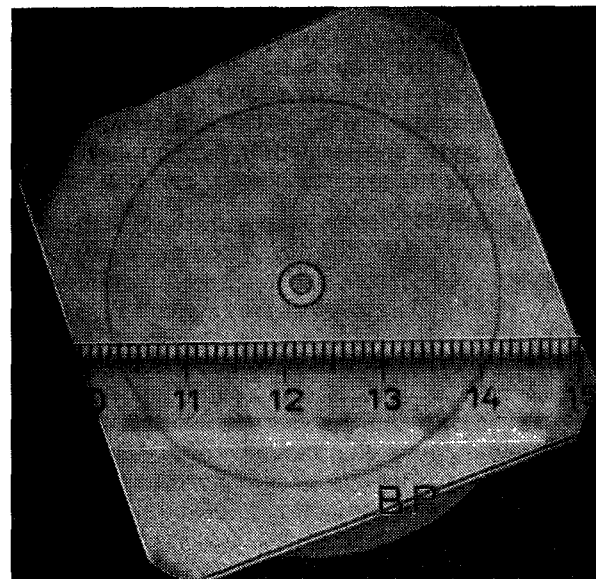


Рис. 5.7. Внешний вид кольцевой зоны, полученной при нанесении пробы на смоченный слой с последующей фокусировкой (объем ячейки для дозирования 500 нл).

с методом Уэйсса. При этом можно получить величину  $b_0$  порядка 0,1 мм и менее.

2. Второй способ заключается в проведении приема, предложенного Бломом и получившего условное название «химическая фокусировка».

Метод нанесения образцов на смоченный слой открывает новые перспективы для круговой ТСХ. Вещества, которые ранее не удавалось проанализировать с помощью ТСХ, можно в настоящее время разделить хроматографи-

чески. Свет, кислород и водяной пар подчас мешают процессу разделения или могут вызвать химические превращения проб, нанесенных на сухой слой. Круговая ТСХ с непрерывным подводом подвижной фазы и нанесением пробы на смоченный слой является наиболее близким приближением к КЖХ.

На рис. 5.6 показана четкость дозирования на смоченный слой, которую можно получить, если использовать описанный метод фокусировки. Объем пробы (10 крапителей в толуоле) составляет 500 нл. Ее наносят на смоченный слой силикагеля ВЭТСХ-пластинки. Максимальная длина пути перемещения подвижной фазы соответствует внешним кольцевым зонам, где подвижная фаза полностью испаряется.

## ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

*Х. Халпаар, Ж. Рипфан*

*Halpaar H., Ripphahn J., E. Merck, Darmstadt, BDR*

### 6.1. Введение

Основные параметры, характеризующие закрепленный на ТСХ-пластинках слой, описаны в работах [1,2]. Адсорбция и десорбция, как было показано, происходят в порах и на наружных поверхностях гранул сорбента. Специфические хроматографические свойства сорбента определяются средним размером пор, их распределением по размерам, а также типом группировок атомов на поверхности сорбента. Так же как и в жидкостной хроматографии высокого давления, высота тарелки в тонкослойной хроматографии в значительной степени зависит от средних размеров частиц сорбента, распределения частиц по размерам и качества слоя. Однако в ТСХ значительно труднее провести разделение при оптимальных условиях, поскольку длительность этого процесса нельзя регулировать путем изменения давления в системе. Длительность разделения зависит только от величины капиллярных сил в слое, т. е. от вторичных свойств сорбента.

Высококачественные сорбенты для тонкослойной хроматографии изготавливают в промышленных условиях на заводах и установках в соответствии с последними достижениями технологии, под непрерывным всесторонним технологическим контролем. Чтобы гарантировать получение воспроизводимых результатов как в количественном, так и в качественном анализе, следует придерживаться тщательно разработанного и стандартизованного метода изготовления ТСХ-пластинок с определенными свойствами закрепленного слоя.



В заключение подчеркнем, что активность слоя силикагеля зависит от размера его пор, строения поверхности и текстуры основного вещества. Стандартные марки силикагелей имеют поры различных диаметров с различным распределением этих диаметров по величине, но определенного объема. Они характеризуются разными поверхностными свойствами и специфическими изотермами адсорбции воды. Эти параметры определяют хроматографические свойства сорбентов. Помимо первичных свойств, связанных с размерами пор и активностью поверхности, важными характеристиками сорбента являются размеры частиц и их распределение, которые определяют скорость потока растворителя в пространстве между отдельными частицами, а также внутри пор. Длительность разделения, величины  $R_f$  и высота тарелок в значительной степени зависят от вторичных параметров. Таким образом, стандартизация нескольких видов силикагелей с узким распределением пор и частиц по размерам является необходимым условием получения воспроизводимых результатов хроматографического разделения.

## 6.2. Методы получения ВЭТСХ-пластинок с закрепленным слоем

В последнее время исследовали соотношения между первичными и вторичными характеристиками слоев сорбента и их хроматографическими свойствами. Результаты этих исследований обсуждались на семинаре, проводившемся в Институте хроматографии в Бад Дюкгейме в июне 1975 г. Приводимые здесь результаты публикуются впервые.

Материалы, представленные на рис. П.11 (см. цветные вклейки в конце книги), можно рассматривать как предварительный результат проведенных авторами исследований. На этом рисунке изображена круговая хроматограмма с эксцентрическим нанесением 50 проб по 20 мкл каждая. Разделение длится в течение 10 мин, включая операцию точного дозирования и собственно хроматографический процесс. Высокая точность анализа обусловлена хорошим качеством слоя, что подтверждают исследования, выполненные с помощью электронного микроскопа. Полу-

ченные фотографии свидетельствуют об исключительно плотной упаковке частиц сорбента практически равного размера, образующих ровную гомогенную поверхность. На рис. 6.1 представлены фотографии поверхностей обычных ТСХ-пластинок с закрепленным слоем силикагеля и высокоэффективных ТСХ-пластинок. Изображения поверхностей были получены фотографированием слоев, наклоненных под углом  $10^\circ$  к плоскости фотоаппарата, совмещенного с микроскопом.

Проведены широкие исследования силикагелевых покрытий для высокоэффективных тонкослойных пластинок, отличающихся друг от друга размером частиц и толщиной сорбирующего слоя, причем тип силикагеля, связующего, добавки индикаторов, а также способ суспензирования сорбента и нанесения его на подложку во всех экспериментах были одинаковы. Разделение проводили в одних и тех же камерах при постоянных предварительном насыщении слоя и температуре. В ходе экспериментов изменяли также длину пути разделения и объем пробы, вводимой в хроматографическую систему, проводя по 10 параллельных определений. В целом было проведено 3 240 отдельных опытов. Интенсивность отраженного света измеряли на спектрофотометре РМQ II фирмы «Opton», аналоговый вывод которого был связан с управляющей ЭВМ IBM 1800.

В ходе экспериментов определяли следующие параметры:

- $t_f$ , с — время перемещения растворителя от стартовой линии до конечного положения фронта;
- $t_{f0}$ , с — время перемещения растворителя от уровня погружения до стартовой линии;
- $t$ , с — время, необходимое для получения хроматограммы;
- $Z_f$ , мм — расстояние, пройденное элюентом от стартовой линии до фронта;
- $Z_{f0}$ , мм — расстояние, пройденное элюентом от уровня погружения до стартовой линии;
- $Z_x$ , мм — расстояние, пройденное веществом;
- $K$ , мм<sup>2</sup>/с — коэффициент скорости;
- $hR_f$  — процентное содержание вещества в подвижной фазе;

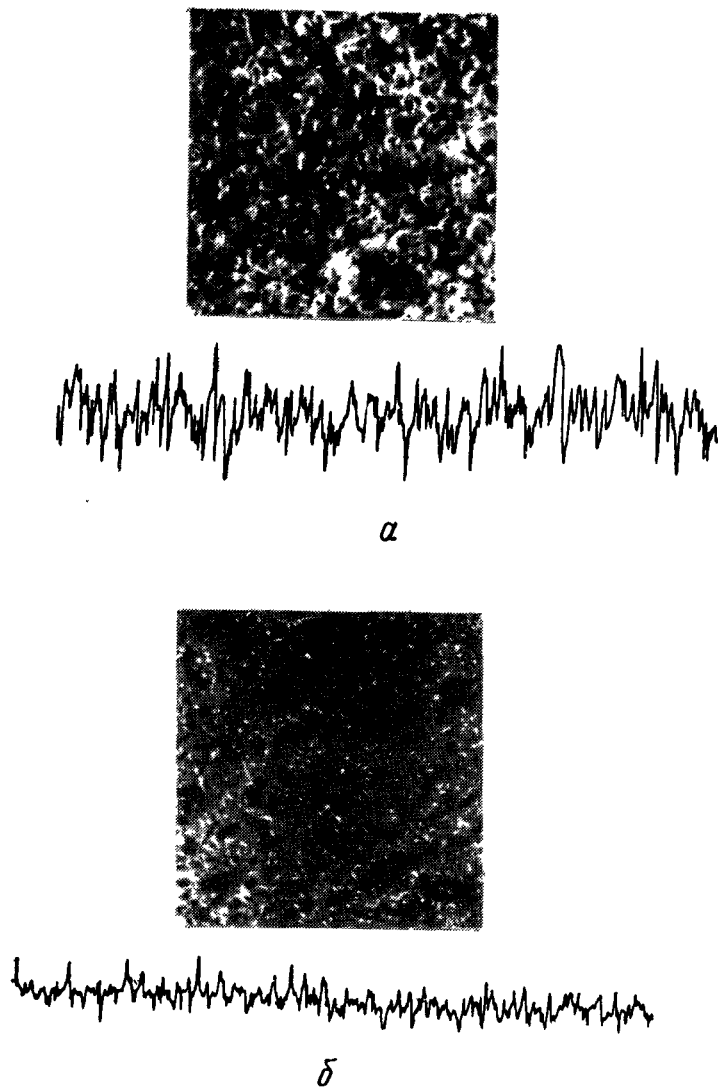


Рис. 6.1. Диаграммы фотометрических исследований поверхности и микрофотографии поверхностей ТСХ-пластинок.

*a* — поверхность ТСХ-пластинки со слоем силикагеля 60F-254, *б* — поверхность слоя силикагеля 60F-254 ВЭТСХ-пластинки для напы-ТСХ. Сканирование проводили с апертурой  $2,5 \times 1,5$  мм; в первом случае увеличение 1 : 24, угол падения  $10^\circ$ , во втором — слой сорбента был обработан красителем пересом фиолетовым, увеличение 1 : 200.

$w_x$ , мм — ширина пика вещества у основания;  
 $H$ , мкм — высота тарелки;  
 $R_s$  — разрешение.

Параметры, определяемые в случае необходимости:  
 $k$  — коэффициент распределения;  
 $\alpha$  — относительное удерживание, селективность;  
 $N'$  — число эффективных тарелок;  
 $N'/c$  — число эффективных тарелок в секунду.

На рис. 6.2 и 6.3 представлена графическая зависимость между высотой тарелки и длиной пути разделения от линии старта до фронта. Длину пути разделения  $Z_f$  (мм) откладывают по оси абсцисс, высоту тарелок (мкм) — по оси ординат. Это позволяет связать высоту, эквивалентную теоретической тарелке, с процентным содержанием вещества в фазе, например, 50%. Аналогично определяют все зоны с содержанием вещества от 20 до 80%. На рис. 6.2 четыре горизонтальных ряда графиков расположены в зависимости от размера частиц силикагеля. Кривые, соответствующие более крупным размерам частиц, расположены сверху, кривые для мелкодисперсных фракций — снизу. В трех вертикальных рядах толщина слоя сорбента изменяется приблизительно от 300 до 100 мкм (графики, относящиеся к более толстым слоям, расположены слева, а для более тонких слоев — справа). В каждом из опытов использовали тщательно отобранные и фракционированные силикагели. Три кривые на отдельной диаграмме соответствуют (сверху вниз) трем различным объемам проб, наносимым на слой сорбента, а именно 2, 0,75 и 0,1 мкл, содержащим 2000, 750 и 100 нг индивидуального вещества. Изменение размеров частиц вызывает уменьшение высоты тарелки от ряда 4 к ряду 3 и от ряда 3 к ряду 2, тогда как при переходе от ряда 2 к ряду 1 высота тарелки значительно увеличивается. В вертикальных столбцах, соответствующих различной толщине слоя, в столбце I (минимальная толщина слоя) высота тарелки выше, чем в столбцах II и III, между которыми существует незначительная разница. Оптимальную высоту тарелки можно подсчитать по отдельным кривым приведенных графиков.

Ход кривой зависит от пределов изменения размеров частиц силикагеля. В верхнем горизонтальном ряду на пути разделения 100 мм высота тарелки еще не достигла

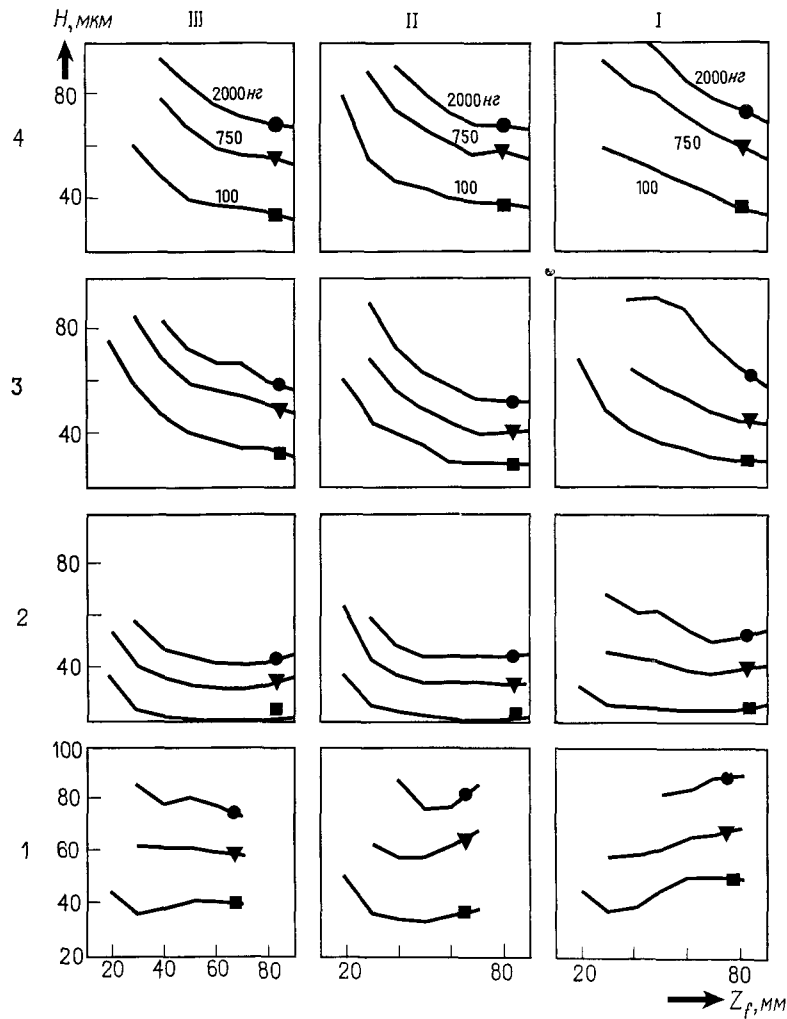


Рис. 6.2. Графики зависимостей  $H$  и  $Z_f$  для пластинок с закрепленным слоем, приготовленных в лаборатории (графики получены в результате расширенного экспериментального исследования). В горизонтальных рядах 4--1 графики соответствуют изменению размеров частиц от более крупных к более мелким, в вертикальных столбцах III--I наблюдаемые зависимости соответствуют уменьшению толщины слоя. В экспериментах использованы следующие количества проб липофильных красителей: 2 мкл = 2000 нг; 0,75 мкл = 750 нг; 0,1 мкл = 100 нг.

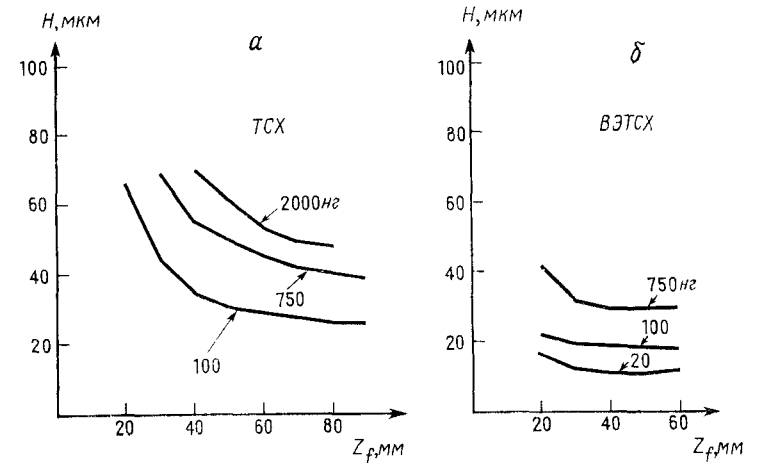


Рис. 6.3. Графики зависимости величины  $H$  и  $Z_f$  для промышленно выпускаемых пластинок.

$a$  — пластинки с закрепленным слоем силикагеля 60F-254;  $б$  — ВЭТСХ-пластинки с силикагелем 60F-254 для нано-ТСХ. Пробы липофильных красителей наносили в количестве  $a$ —2,0 мкл = 2000 нг; 0,75 мкл = 750 нг; 0,1 мкл = 100 нг;  $б$  — 0,75 мкл = 750 нг; 0,1 мкл = 100 нг; 0,02 мкл = 20 нг.

оптимальной величины. В ряду 3 оптимальная высота тарелки примерно соответствует длине пути разделения 100 мм, тогда как в ряду 2 путь разделения значительно меньше и равен приблизительно 50 мм. Следует отметить, что подъем кривых происходит постепенно с ростом длины пути разделения. В ряду 4 (тонкодисперсный силикагель) оптимальная высота тарелки соответствует еще меньшей длине пути разделения. В последнем случае при определенных условиях высота тарелки резко возрастает с увеличением длины пути разделения. Таким образом, можно прийти к заключению, что каждой фракции частиц сорбента соответствуют оптимальная длина пути разделения и, следовательно, оптимальная высота тарелки. Графики 3/II и 2/II построены для сорбентов с размером частиц, используемым для обычных и ВЭТСХ-пластинок с закрепленным слоем.

Полученные выводы основываются на многочисленных экспериментах, проведенных на ВЭТСХ-системах, изго-

Таблица 6.1

Распределение в пространстве растворов различных объемов по отношению к толщине и поверхности слоя

Объем пробы	Размеры соответствующего кубического объема		
1,0 л	100 мм	100 мм	100 мм
1 мл	10 мм	10 мм	10 мм
1 мкл	1 мм	1 мм	1 мм
1 нл	100 мкм	100 мкм	100 мкм
5 нл	171 мкм	171 мкм	171 мкм
10 нл	215 мкм	215 мкм	215 мкм
20 нл	271 мкм	271 мкм	271 мкм
50 нл	368 мкм	368 мкм	368 мкм
100 нл	464 мкм	464 мкм	464 мкм

Толщина слоя, мкм	Площадь поверхности слоя (мкм <sup>2</sup> ), занимаемая при перемещении		
	5 нл раствора	10 нл раствора	20 нл раствора
250	141 × 141	200 × 200	283 × 283
200	158 × 158	224 × 224	316 × 316
150	183 × 183	258 × 258	365 × 365
100	224 × 224	316 × 316	447 × 447
50	316 × 316	447 × 447	632 × 632
25	447 × 447	632 × 632	894 × 894
10	707 × 707	1000 × 1000	1414 × 1414

товленных в лаборатории. Результаты, представленные на рис. 6.3, были получены на ТСХ-пластинках, выпускаемых промышленностью. Последние несомненно лучше, чем результаты, полученные на пластинках, изготовленных в лабораторных условиях. Это можно объяснить преимуществами промышленного метода покрытия, обеспечивающего большую плотность слоя сорбента. На ТСХ-пластинках с закрепленным слоем (а) оптимальная высота тарелки равна приблизительно 30 мкм. В случае применения

ВЭТСХ-пластинок (б) высота тарелки составляет приблизительно 12 мкм при меньших объемах вводимых проб. Для нанесения точно отмеренных проб объемом до 5 нл удобен шприц емкостью 1 мкл фирмы «Hamilton» с микрометром. Этим шприцем можно за 1 мин с высокой точностью нанести приблизительно 10 пятен.

В табл. 6.1 сравниваются различные объемы растворов проб, наносимых на пластинку, и площади образующихся при этом зон в зависимости от толщины слоя. Для упрощения при расчете не учитывались сферическое расширение пятна и дополнительные адсорбционные эффекты. В то время как в классической тонкослойной хроматографии объем наносимой пробы обычно составляет несколько микролитров, в высокоэффективной тонкослойной хроматографии он должен быть значительно ниже и измеряться в нанолитрах. Объем 100 нл соответствует кубу с длиной ребра 464 мкм, таким образом, объемы 20, 10 и 5 нл соответствуют кубу с длиной ребра 271, 215 и 171 мкм. Из таблицы следует, что площадь пятна расширяется с уменьшением толщины слоя. При толщине слоя 10 мкм проба объемом 10 нл должна занять площадь 1 мм<sup>2</sup>, что означает крайне нежелательное размывание стартовой точки. В соответствии с таблицей до сих пор используемую в ТСХ толщину слоя, равную приблизительно 200 мкм, можно считать оптимальной и для ВЭТСХ.

### 6.3. Характеристики ВЭТСХ-пластинок

В табл. 6.2 представлено число действительных ступеней разделения, соответствующее разной длине пути разделения  $Z_f$  как функции высоты тарелки  $H$ . При расчетах исходят из максимальной величины  $hR_f$ , равной 80, которая чаще всего встречается при хроматографическом разделении в нормальных камерах (N-камера). В ВЭТСХ можно получить высоту тарелки в пределах 10—15 мкм, что обеспечивает несколько тысяч ступеней разделения в зависимости от длины пути разделения.

В табл. 6.3 представлено число полных разделений пар соседних зон анализируемых веществ. При расчете снова исходили из максимальной величины  $hR_f$ , равной 80, применительно к различным  $Z_f$  и  $H$ . В качестве основы

Таблица 6.2

Число эффективных ступеней разделения  $N'$  в зависимости от высоты тарелки и длины пути разделения

Максимальное значение  $hR_f=80$

Высота тарелки $H$ ( $hR_f=50$ ), мм	Длина пути разделения ( $hR_f=80$ ) $Z_f$ , мм			
	25 при $Z_x=20$ мм	50 при $Z_x=40$ мм	75 при $Z_x=60$ мм	100 при $Z_x=80$ мм
50	400	800	1 200	1 600
40	500	1 000	1 500	2 000
30	667	1 333	2 000	2 667
25	800	1 600	2 400	3 200
20	1 000	2 000	3 000	4 000
15	1 333	2 667	4 000	5 333
10	2 000	4 000	6 000	8 000
5	4 000	8 000	12 000	16 000

Примечание.  $Z_x$ —длина пути перемещения вещества.

Таблица 6.3

Число полных разделений веществ (4  $\sigma$ -разделения в соответствии с  $R_s=1$ ) в зависимости от высоты тарелки и длины пути разделения

Максимальное значение  $hR_f=80$

Высота тарелки $H$ ( $hR_f=50$ ), мм	Длина пути разделения $Z_f$ ( $hR_f=80$ ), мм			
	25 при $Z_x=20$ мм	50 при $Z_x=40$ мм	75 при $Z_x=60$ мм	100 при $Z_x=80$ мм
50	6,3	8,9	10,8	12,6
40	7,1	10,0	12,2	14,1
30	8,2	11,5	14,1	16,3
25	8,9	12,6	15,5	17,9
20	10,0	14,1	17,3	20,0
15	11,5	16,3	20,0	23,1
10	14,1	20,0	24,5	28,3
5	20,0	28,3	34,6	40,0

взято также 4 $\sigma$ -разделение, соответствующее разрешению  $R_s=1$ . Важным достижением ВЭТСХ является большое число полных разделений, получаемых при малых  $Z_f$  и высоте тарелки 10—15 мкм, т. е. в наиболее интересном интервале. Поскольку разрешение  $R_s$  обратно пропорционально величине  $2VN$ , уменьшение высоты тарелки от ~30 мкм (для традиционных ТСХ-пластинок с закрепленным слоем) до ~12 мкм (для ВЭТСХ-пластинок) соответствует улучшению разрешения приблизительно на 60%, т. е. значительному выигрышу в эффективности. Взаимосвязь между высотой тарелки и разрешением представлена в табл. 6.4.

Таблица 6.4

Соотношения между высотой тарелки и разрешением

Высота тарелки $H$ , мкм	Разрешение									
	100	141	173	200	224	245	265	283	300	316
5	100	141	173	200	224	245	265	283	300	316
10	71	100	123	141	158	173	187	200	212	224
11						165				
12						158				
13						152				
14						146				
15	58	82	100	116]	129	141	153	163	173	183
20	50	71	87	100	112	123	132	141	150	158
25	45	63	78	89	100	110	118	126	134	141
30	41	58	71	82	91	100	108	115	123	129
35	38	53	66	76	85	93	100	107	113	120
40	35	50	61	71	79	87	94	100	106	112
45	33	47	58	67	75	82	88	94	100	105
50	32	45	55	63	71	77	84	89	95	100

На рис. 6.4 показана зависимость  $hR_f$ , высоты тарелки  $H$  и коэффициента скорости  $K$  от  $Z_f$  при разделении линейным методом в  $N$ -камере с насыщенной атмосферой. При увеличении длины пути разделения вследствие испарения растворителя величины  $hR_f$ , красителей, фиолетового ( $\Phi$ ),

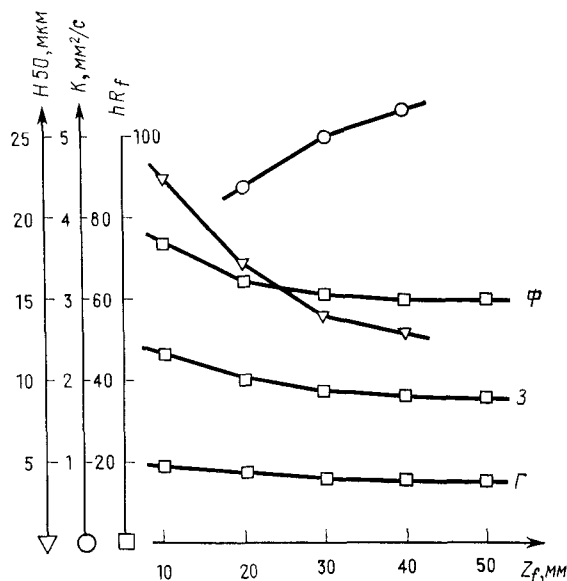


Рис. 6.4. Влияние длины пути разделения на хроматографические параметры (величины  $hR_f$ ,  $H$ ,  $K$ ).

Условия эксперимента:  $N$ -камера с насыщенной атмосферой, элюент — бензол, объем пробы 20 нл = 20 нг; проводили 8 параллельных измерений.

зеленого (З) и голубого (Г) уменьшаются. По этой же причине коэффициент скорости  $K$  возрастает с увеличением длины пути разделения  $Z_f$  и длительности разделения, поскольку в этом случае для наполнения капилляров требуется меньшее количество элюента. Как уже было показано на рис. 6.2 и 6.3, с удлинением пути разделения  $Z_f$  с 10 до 50 мм высота тарелки  $H$  уменьшается.

В табл. 6.9 представлены элюотропные ряды обычно используемых растворителей и их важнейшие хроматографические и физические характеристики, определенные при

среднем распределении размеров пор силикагеля в адсорбционной хроматографии и при использовании гидрофильных неподвижных фаз в распределительной хроматографии. Для определения коэффициента скорости  $K$  при различных  $Z_f$  (а в нескольких случаях и при различных температурах) применяли ТСХ-пластинки с силикагелем 60 фирмы «Merck». Соответствующие результаты для высокоэффективных тонкослойных пластинок с силикагелем 60 фирмы «Merck» несколько ниже. По мере возрастания  $K$  время разделения уменьшается.

В начале элюотропных рядов помещены липофильные растворители, а в конце — гидрофильные. Применение более липофильных растворителей, как правило, приводит к уменьшению величины  $R_f$ , в то время как более гидрофильные растворители приводят к ее увеличению.

В ТСХ элюент удаляют перед детектированием, и поэтому разделение можно проводить растворителями с различными функциональными группами, поскольку в отличие от колоночной хроматографии здесь не надо учитывать такие факторы, как, например, пропускание УФ-излучения и коэффициент преломления подвижной фазы. Кроме того, возможности селективного разделения в ТСХ значительно шире, чем в колоночной жидкостной хроматографии. При выборе растворителей для массовых анализов следует отдавать предпочтение элюентам с большим  $K$ , обеспечивающим более быстрое разделение. В специальных случаях можно использовать бутиловый и пропиловый спирты, несмотря на то что они имеют очень низкие величины  $K$ .

В табл. 6.5 представлена зависимость времени  $t$  для линейного разделения восходящим методом от значений  $K$  и  $Z_f$ . При проведении экспериментов расстояние между уровнем растворителя, в который опускали пластинку, и линией нанесения проб равнялось 5 мм. Поскольку в уравнение объемной скорости в ТСХ входит величина  $Z_f^2$ , с увеличением длины пути разделения длительность разделения значительно возрастает, в особенности при использовании растворителей с низкими значениями  $K$ . Таким образом, эффективность разделения, выраженная через число эффективных ступеней разделения  $N'/с$ , для малых значений  $Z_f$  и для слоев сорбента с малыми значе-

Таблица 6.5

Соотношения между временем разделения  $t$  (мин) и коэффициентом скорости и длиной пути разделения

$$t = \frac{(Z_f + 5)^2}{60K}$$

Коэффициент скорости $K$ , мм <sup>2</sup> /с	Длина пути разделения $Z_f$ , мм			
	25	50	75	100
2	7,5	25,2	53,3	91,9
5	3,0	10,1	21,3	36,8
10	1,5	5,1	10,7	18,4
15	1,0	3,4	7,1	12,3
20	0,8	2,5	5,3	9,2
25	0,6	2,0	4,3	7,4
30	0,5	1,7	3,6	6,1

Таблица 6.6

Зависимость эффективности разделения (согласно хроматограмме) выраженная как число эффективных ступеней разделения  $N'/c$ , от высоты тарелки и длины пути разделения

Максимальная величина  $hR_f = 80$

Высота тарелки $H$ ( $hR_f = 80$ ), мм	Длина пути разделения $Z_f$ , мм			
	25 при $Z_x = 20$ мм	50 при $Z_x = 40$ мм	75 при $Z_x = 60$ мм	100 при $Z_x = 80$ мм
50	44	26	19	15
40	56	33	23	18
30	74	44	31	24
25	89	53	38	29
20	111	66	47	36
15	148	88	63	48
10	222	132	94	73
5	444	264	188	145

Таблица 6.7

Взаимосвязь между величиной сопротивления потоку и размерами частиц при упаковке слоя сферическими частицами. Статистическая плотность заполнения объема слоя сорбента 63%

Диаметр сферических частиц, мкм	Число сферических частиц на 1 мкл (мм <sup>3</sup> )	Число «полостей» между сферическими частицами на 1 мкл (мм <sup>3</sup> )	Отношение числа «полостей»	
			1000	1
1	$1,2 \cdot 10^9$	$3,6 \cdot 10^9$	125	1000
2	$1,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	16	125
3	$4,5 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^8$	5	37
4	$1,9 \cdot 10^7$	$5,6 \cdot 10^7$	2	16
5	$1,0 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^7$	1	8
10	$1,2 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^6$	1/8	1
25	$7,7 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^5$	1/125	1/16
50	$1,0 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^4$	1/1000	1/125

ниями  $H$  значительно выше, чем для больших значений  $Z_f$  и для больших и, следовательно, нежелательных значений  $H$ . Эти соотношения представлены в табл. 6.6. При расчете исходили из максимального значения  $hR_f = 80$  и  $K = 10$  мм<sup>2</sup>/с. На пластинке параллельно разделили 10 образцов. Разрешение и число разделений возрастают с увеличением длины пути разделения, несмотря на менее удовлетворительную эффективность разделения ( $N'/c$ ).

Взаимосвязь между размером частиц и сопротивлением потоку изучали на слое сорбента, состоящем из сферических частиц со статистически плотной пространственной упаковкой. Находящийся в слое растворитель под действием капиллярных сил движется в пространстве между твердыми частицами. Чем меньше промежуточное пространство и больше число частиц, тем выше сопротивление потоку, но одновременно тем быстрее интенсивный обмен вещества внутри каналов, образованных частицами сорбента. В табл. 6.7 сравнивается упаковка слоя сферическими частицами сорбента диаметром 10 и 5 мкм. В последнем случае внутренняя поверхность каналов в 8 раз больше.

## 6.4. Хроматографические характеристики

### 6.4.1. Влияние на хроматографическое разделение типа камеры, активности сорбента и растворителя

Как показано на рис. 6.5 и 6.6, хроматографические характеристики зависят от типа используемой камеры и активности сорбента. На левой стороне оси абсцисс

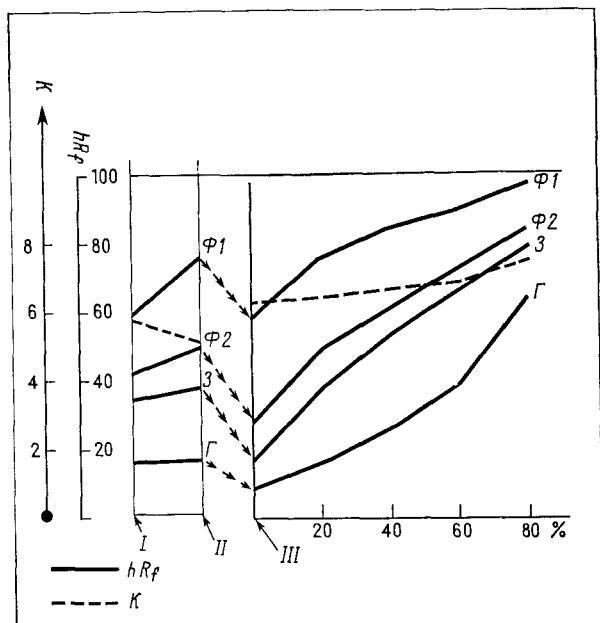


Рис. 6.5. Влияние различных типов камер [N-камера с насыщенной атмосферой (I), сэндвич-камера (II)] и различных величин относительной влажности [камера «Vario» KS (III)] на величины  $hR_f$  и  $K$ .

Условия эксперимента;  $Z_f = 50$  мм, элюент — бензол, объем пробы для каждого липофильного красителя 30 нл = 30 нг.

отложены характеристики условий, существующих в N-камере с насыщенной атмосферой, в так называемой «сэндвич-камере» с расстоянием между поверхностью сор-

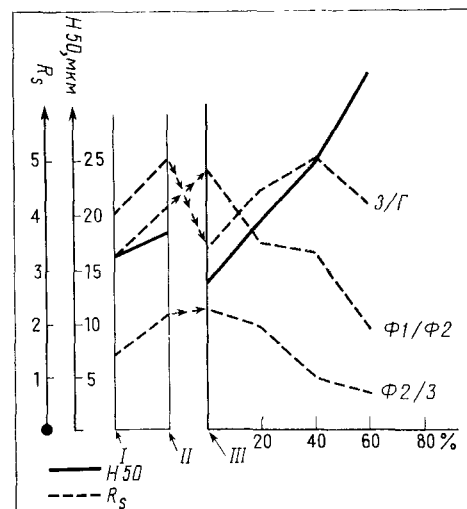


Рис. 6.6. Влияние различных типов камер [N-камера с насыщенной атмосферой (I), сэндвич-камера (II)] и различных величин относительной влажности [камера «Vario» KS (III)] на величины  $H$  и  $R_s$ .

Условия эксперимента:  $Z_f = 50$  мм, элюент — бензол, объем пробы для каждого липофильного красителя 30 нл = 30 нг.

бента и крышкой, равным 1 мм, и в камере типа «Vario» KS. На правой стороне оси абсцисс отложены значения относительной влажности сорбента от 0 до 80%. Значения  $hR_f$  и  $K$  на рис. 6.5, а также величины  $H$  и разрешения пар соседних веществ (рис. 6.6) отложены на ординатах. При сравнении работы N-камеры с насыщенной атмосферой и сэндвич-камеры наблюдается значительное увеличение  $hR_f$ , в особенности в интервале более высоких значений, поскольку в этих условиях трудно осуществить предварительное насыщение слоя из газовой фазы. По этой же причине величины  $K$  меньше, т. е. время перемещения несколько возрастает.

Возрастание величин  $R_f$  при повышении влажности в камере «Vario» KS обусловлено более высокой селективной дезактивацией сорбента. Незначительное увеличение высоты тарелки в сэндвич-камере по сравнению с N-каме-



рой с насыщенной атмосферой пока не получило удовлетворительного объяснения и, возможно, связано с увеличением времени разделения. Значительное увеличение высоты тарелки при повышении относительной влажности в камере «Vario» KS можно объяснить дезактивацией сорбента, т. е. гидрированием силанольных групп.

Улучшение разделения двух соеденных веществ в сэндвич-камере по сравнению с N-камерой с насыщенной атмо-

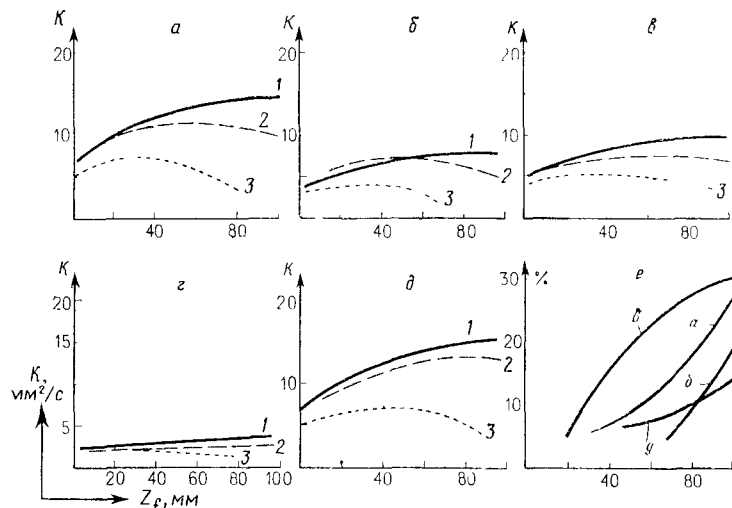


Рис. 6.7. Зависимости  $K$  от  $Z_f$  для различных растворителей (а — д) и различных типов камер.

1 — N-камера с насыщенной атмосферой; 2 — открытая N-камера; 3 — сэндвич-камера с расстоянием между крышкой и поверхностью пластины 1 мм. Элюенты: а — *n*-гексан (полярность 2); б — четыреххлористый углерод (6); в — бензол (10), г — пропанол-1 (21); д — ацетон (23). е — степень заполнения пор (в процентах) по ходу движения различных элюентов в N-камере с насыщенной атмосферой в зависимости от длины пути разделения.

сферой относят главным образом за счет большой разницы в величинах  $hR_f$ . С другой стороны, ухудшение разделения на сорбентах с большей влажностью в камерах «Vario» KS можно приписать возрастанию высоты тарелки.

На рис. 6.7 представлена зависимость коэффициента скорости  $K$  от расстояния, на которое переместится каждый из пяти растворителей: *n*-гексан, четыреххлористый

углерод, бензол, пропанол-1 и ацетон в трех различных типах камер: N-камере с насыщенной газовой атмосферой, сэндвич-камере и открытой N-камере. Открытую N-камеру можно не рассматривать по отношению к другим видам камер в связи с разницей в эффектах испарения, благодаря которым величины  $K$  для этого типа камер значительно занижены, а время разделения существенно завышено.

В сэндвич-камере величины  $K$  должны быть постоянными независимо от длины пути разделения, что было подтверждено в случае бензола и пропанола-1. Сильное возрастание величины  $K$  в случае применения ацетона для значений  $Z_f$ , не превышающих 100 мм, предполагает предварительное насыщение сорбента из газовой фазы благодаря высокому давлению паров ацетона. Это происходит даже в сэндвич-камере с расстоянием между поверхностью сорбента и крышкой 1 мм. Уменьшение  $K$  для гексана при  $Z_f > 70$  мм и для четыреххлористого углерода при  $Z_f > 60$  мм можно объяснить только эффектами испарения. Степень предварительного заполнения пор сорбента из газовой фазы в зависимости от  $Z_f$  можно рассчитать по величине  $K$ , которая различна для N-камеры и 1-миллиметровой сэндвич-камеры. Соответствующие данные приведены в нижней правой части рис. 6.7. Было показано, что, например, в N-камере с насыщенной атмосферой при использовании бензола с  $Z_f$  100 мм поры слоя сорбента заполнены растворителем в среднем более чем на 30%. На основании полученных данных пришли к выводу, что при выборе растворителя или системы растворителей в качестве элюента (табл. 6.9) необходимо учитывать такие характеристики, как удельная масса, температура кипения, давление паров и теплота испарения. Такой подход тем более важен в случае использования смесей растворителей. В соответствии с нашими собственными исследованиями поверхностное натяжение растворителей не играет сколько-нибудь заметной роли в хроматографическом разделении. В присутствии сорбента величина  $\gamma$ , очевидно, изменяется в значительной степени. Однако вязкость растворителя является очень важным фактором, влияющим на величину  $K$  и, следовательно, на  $t$ . Уменьшение вязкости при повышении температуры оказывает положительное влияние на величину  $K$ . Параметры, харак-

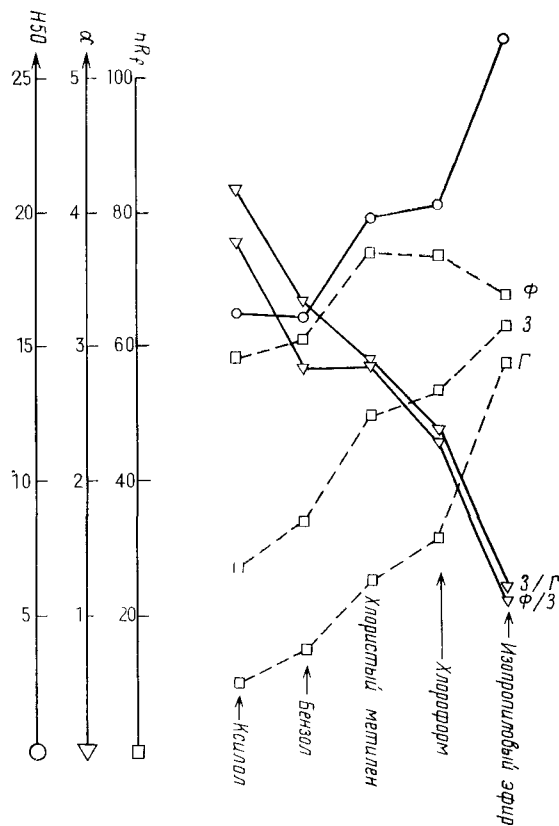


Рис. 6.8. Влияние природы растворителя на величины  $hR_f$ ,  $H$ ,  $\alpha$ . Условия эксперимента:  $N$ -камера с насыщенной атмосферой,  $Z_f = 50$  мм, объем пробы для каждого липофильного красителя 50 нл = 50 нг.

тервизирующие полярность растворителей, представленные в табл. 6.9, такие, как, например, диэлектрическая проницаемость, дипольный момент, коэффициент полярности растворителя и величины  $P'$ , по мнению Снайдера, не связаны друг с другом полностью. Они также не соответствуют нашим собственным измерениям последовательности изменения полярности элюентов. Произведение коэффициента скорости  $K$  на коэффициент вязкости  $\eta$  совпадает практи-

чески для всех растворителей, за исключением пентана, *трет*-бутилового спирта, диэтилового эфира, диоксана и пиридина. Это значит, что скорость движения элюента зависит от вязкости.

На конкретных примерах (рис. 6.8) показана взаимосвязь между некоторыми хроматографическими характеристиками и используемыми растворителями. В соответствии с последовательностью полярностей, представлен-

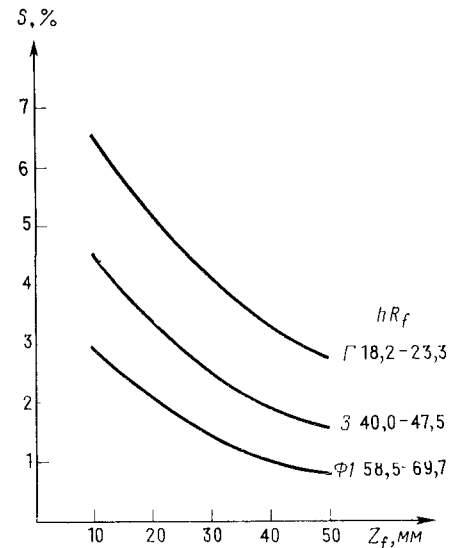


Рис. 6.9. Зависимость стандартного отклонения величин  $hR_f$  от длины пути разделения.

Условия эксперимента:  $N$ -камера с насыщенной атмосферой, элюент — бензол, объем пробы каждого липофильного красителя 20 нл = 20 нг; наносили параллельно восемь образцов на расстоянии 10 мм друг от друга.

ных в табл. 6.9, адсорбция вещества на сорбенте уменьшается в ряду от ксилола до диизопропилового эфира, что ведет к возрастанию величины  $R_f$ . При использовании диизопропилового эфира результаты разделения трех красителей: фиолетового, зеленого и голубого — не позволяют говорить о значительной разнице в величинах адсорбции. Об этом свидетельствует также уменьшение

селективности  $\alpha$  в ряду от ксилола до диизопропилового эфира. Уменьшение адсорбции от более липофильных к менее липофильным растворителям подтверждается увеличением диффузии пятен, которое в свою очередь приводит к возрастанию высоты тарелки  $H$  и ухудшению качества разделения.

Для того чтобы получить согласующиеся величины  $hR_f$  по всей ширине слоя, длина пути разделения должна быть минимальной, несмотря на имеющуюся возможность

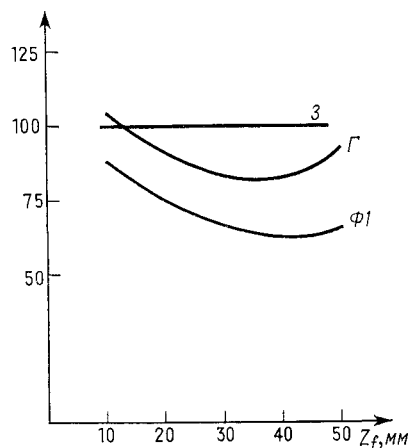


Рис. 6.10. Зависимость площади пиков (мВс) для трех различных красителей от длины пути разделения.

По оси ординат отложены соотношения площадей пиков по отношению к красителю зеленому (100) со средними величинами  $R_f$ .

Условия эксперимента: N-камера с насыщенной атмосферой, элюент — бензол, объем пробы каждого красителя 20 нл = 20 нг (цереус фиолетовый BRN (Ф1), краситель голубой (Г), цереус зеленый (З)); детектирование проводили, изменяя интенсивность отраженного света при 586 нм; восемь параллельных измерений.

с высокой точностью поддерживать параметры хроматографического разделения постоянными (условия предварительного насыщения в камере и температуру) (рис. 6.9). Выполняя это условие, получают стандартное отклонение величин  $hR_f$  менее 1% для фиолетового красителя с самой высокой величиной  $hR_f$ , равной 0,6—0,7 (при  $Z_f$  элюента ~35 мм и  $Z_x$  вещества приблизительно 20 мм). Два других красителя — зеленый и голубой — с меньшими абсо-

лютными значениями  $Z_x$  имеют соответственно менее удовлетворительные стандартные отклонения величин  $hR_f$ . Ошибки возникают при нанесении веществ на один и тот же уровень (линию старта) (имеются в виду не собственно ошибки дозирования) или при первоначальном смачивании слоя. Эти отклонения постепенно сглаживаются во время движения растворителя.

При изменении  $Z_f$  изменяются и соотношения между площадями зон индивидуальных веществ, что проиллюстрировано рис. 6.10. Следовательно, в случае применения внутреннего стандарта для количественных определений необходимо на всей пластинке поддерживать соответствующие значения  $R_f$ . Хорошее соответствие между величинами  $R_f$  можно проследить на рис. П.7 и П.9 (см. цветные вклейки в конце книги). В этом случае на слой сорбента с помощью шприца фирмы «Hamilton» наносили по 30 нл каждого раствора в виде пятен и, кроме того, 1 мкл раствора наносили в виде линии длиной 80 мм с помощью шприца фирмы «Hamilton» и автоматического апликатора. Разделение проводили в N-камере с насыщенной атмосферой при стандартных условиях.

#### 6.4.2. Влияние температуры

Рисунки, представленные в этом разделе, иллюстрируют взаимосвязь между некоторыми хроматографическими параметрами и температурой при использовании липофильных и гидрофильных систем растворителей в N-камере с насыщенной атмосферой и сэндвич-камере. Было установлено, что при изменении температуры от 22 до 60° С величина  $K$  для липофильных систем растворителей сильно возрастает. В этом же интервале температур наблюдается возрастание  $K$  и для гидрофильных систем. Его можно объяснить уменьшением вязкости используемого растворителя и увеличением давления его паров. В N-камере предварительное насыщение сорбента из газовой фазы с повышением температуры сильно возрастает, что подтверждается снижением величины  $R_f$  (рис. 6.11). С повышением температуры разрешение двух соседних веществ, особенно при разделении липофильными раство-

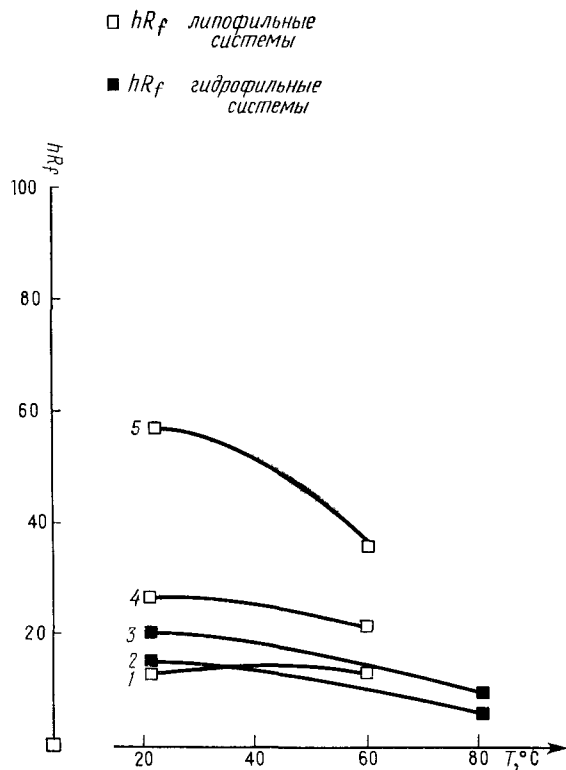


Рис. 6.11. Влияние температуры в  $N$ -камере на величины  $hR_f$ . Объем пробы каждого липофильного красителя 20 нл = 20 нг; в качестве элюента использовали толуол; объем пробы каждой гидрофильной аминокислоты 50 нл = 10 нг; элюировали смесью пропилового спирта и воды в соотношении 80 : 20 или нингидрином.  
1 — голубой краситель; 2 —  $\beta$ -аминокислота; 3 —  $\alpha$ -аминокислота; 4 — зеленый краситель; 5 — фиолетовый краситель.

рителями, значительно ухудшается (рис. 6.12). Сильное предварительное смачивание сорбента из газовой фазы приводит к тому, что для собственно хроматографического процесса остается незаполненной только часть пор в сорбенте.

Результаты, полученные в сэндвич-камере, более приемлемы. При повышении температуры до 60°C для липофильных и гидрофильных растворителей не наблюдается сколько-нибудь значительного уменьшения величины  $R_f$ ,

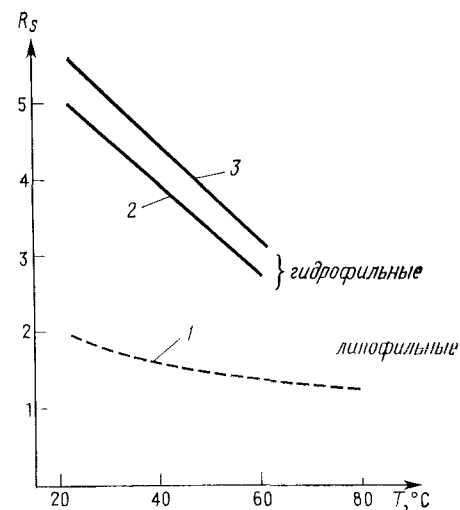


Рис. 6.12. Влияние температуры в  $N$ -камере на величины  $R_s$ . Система липофильных растворителей: 20 нл = 20 нг (для каждого липофильного красителя), элюент — толуол. Система гидрофильных растворителей; 50 нл = 10 нг для каждой аминокислоты; элюент — смесь пропилового спирта и воды в соотношении 80 : 20 или нингидрин.  
1 — система фиолетовый краситель —  $\alpha$ -аминокислота; 2 — система фиолетовый краситель I — азелный краситель; 3 — система зеленый краситель — голубой краситель.

тогда как длительность процесса уменьшается, особенно для гидрофильных растворителей (рис. 6.13). Некоторое ухудшение разрешения при повышенных температурах, наблюдаемое для липофильных элюентов, можно объяснить увеличением диффузии; при этом для гидрофильных растворителей (рис. 6.14) наблюдается лишь очень незначительное ухудшение разрешения. Из приведенных данных ясно, что при проведении хроматографического разделения при повышенной температуре следует исполь-

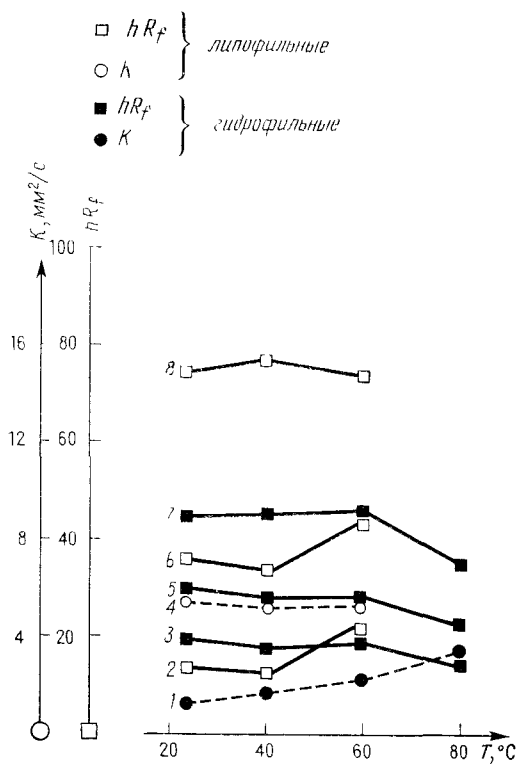


Рис. 6.13. Влияние температуры в сэндвич-камере на величины  $hR_f$  и  $K$ .

Система липофильных растворителей: 20 нл = 20 нг (для каждого липофильного красителя); элюент — толуол.

Система гидрофильных растворителей: 50 нл = 10 нг (для каждой аминокислоты); элюент — смесь пропилового спирта и воды в соотношении 80 : 20 или нингидрин.

1 — величина  $K$ ,  $\text{мм}^2/\text{с}$  гидрофильного элюента; 2 — голубой краситель; 3 —  $\beta$ -аминокислота; 4 — величина  $K$  липофильного элюента,  $\text{мм}^2/\text{с}$ ; 5 —  $\alpha$ -аминокислота; 6 — зеленый краситель; 7 — фиолетовый краситель; 8 — фиолетовый краситель I.

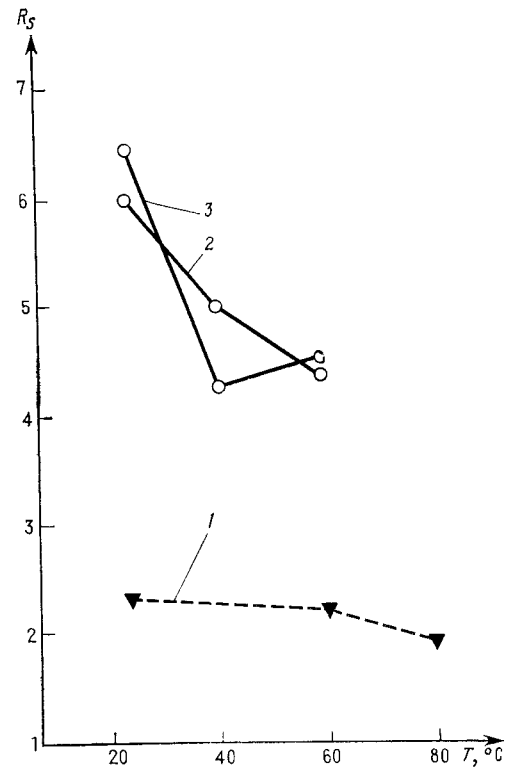


Рис. 6.14. Влияние температуры в сэндвич-камере на величины  $R_s$ .

Система липофильных (—) растворителей: 20 нл = 20 нг (для каждого липофильного красителя); элюент — толуол.

Система гидрофильных (---) растворителей: 50 нл = 10 нг (для каждой аминокислоты); элюент — смесь пропилового спирта и воды в соотношении 80 : 20 или нингидрин.

1 — система фиолетовый краситель —  $\alpha$ -аминокислота; 2 — система фиолетовый краситель I — зеленый краситель; 3 — система зеленый краситель — голубой краситель.

зовать элюенты с низким давлением паров. В этом случае уменьшается время разделения, хотя авторы не уверены в улучшении разделения.

### 6.4.3. Различия между линейной и круговой хроматографией

На приведенных ниже диаграммах сравниваются некоторые хроматографические характеристики линейного и кругового разделения. В качестве основы для сравнения взяты различные величины  $Z_f$  элюента. Разделение проводили восходящим способом в N-камере с насыщенной атмосферой или в чашке Петри, подавая растворитель к перевернутой пластинке через подводящий фитиль диаметром 2 мм. На рис. 6.15 сравнивается разрешение  $R_s$  двух пар красителей при разделении линейным и круговым методами с помощью липофильного элюента. В круговом методе пробу наносили в центр пластинки. В обоих случаях величину  $Z_f$  измеряли от точки подвода растворителя. При разделении двух веществ с высокими значениями  $R_f$ , например фиолетового и зеленого красителей, разрешение  $R_s$  (изменяется от 20 до 50 мм) значительно увеличивается в линейном варианте и в меньшей степени в круговом методе. Только при  $Z_f = 20$  мм оба метода дают равноценную эффективность разделения. При  $Z_f = 50$  мм соотношение разрешений составляет 5,1 : 3,4, причем большая величина относится к линейной хроматографии, что соответствует относительному улучшению разделения на 50%. Этот результат получен при сравнении эффективности разделения двух веществ с меньшими величинами  $R_f$ , например зеленого и голубого красителей. В последнем случае значительное улучшение разрешения с возрастанием длины пути разделения наблюдается в обоих методах. Когда  $Z_f = 20$  мм, разрешение, полученное круговым методом, на 24% выше, чем линейным, но при  $Z_f = 50$  мм эта величина уменьшается до 3%. Приведенные результаты подтверждают хорошо известный факт, что круговую хроматографию лучше использовать для разделения веществ с более низкими значениями  $R_f$ .

На рис. 6.16 и 6.17 сравниваются другие хроматографические параметры двух методов. При эксцентрическом

нанесении проб в круговой ТСХ их объемы аналогичны объемам проб в линейной ТСХ. В линейном варианте ТСХ с увеличением  $Z_f$  величина  $R_f$  уменьшается относительно слабо, а в круговом варианте — очень сильно. Это обуслов-

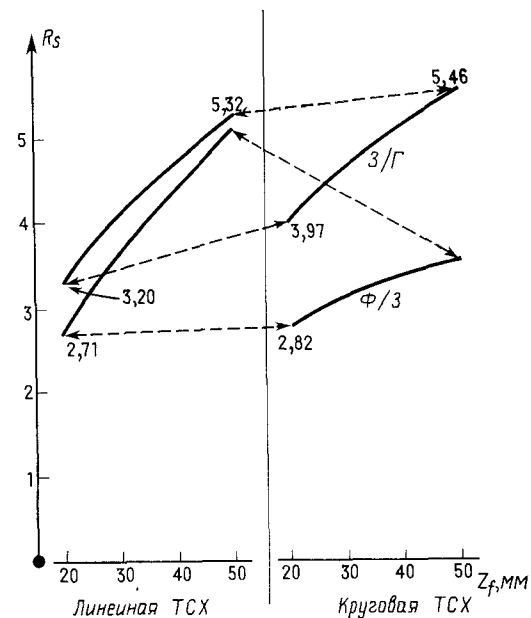


Рис. 6.15. Сравнение величин  $R_s$  в линейной и круговой (подвод элюента в центр) ТСХ в зависимости от длины пути разделения. Условия разделения в линейной ТСХ: N-камера с насыщенной атмосферой; объем пробы для каждого липофильного красителя 20 нл = 20 нг; элюент — бензол. Условия эксперимента в круговой ТСХ: чашка Петри; подвод элюента в центр; объем пробы для каждого липофильного красителя 1,5 мкл = 1,5 мкг; элюент — бензол; ширина апертуры 2 мм.

лено природой самих методов. В случае применения круговой ТСХ в чашке Петри расстояние между растворителем и слоем сорбента невелико, что приводит к сильному предварительному насыщению сорбента из газовой фазы. По этой же причине с увеличением  $Z_f$  возрастает  $K$ . Методом круговой ТСХ можно получить значительно более низкие значения коэффициента  $K$ , которые составля-

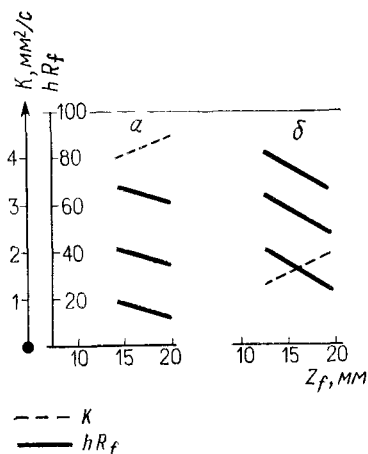


Рис. 6.16. Сравнение величин  $hR_f$ ,  $K$  в линейной и круговой (эксцентрическое нанесение) ТСХ в зависимости от длины пути разделения.

*a* — условия разделения в линейной ТСХ: N-камера с насыщенной атмосферой; объем пробы для каждого липофильного красителя 25 нл = 25 нг; элюент — бензол.

*б* — условия разделения в круговой ТСХ; чашка Петри; объем пробы для каждого красителя 25 нл = 25 нг;  $Z_{f0} = 15$  мм; элюент — бензол.

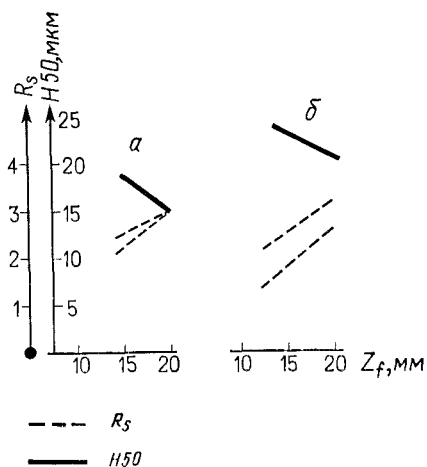


Рис. 6.17. Сравнение величин  $H$  и  $R_s$  в линейной и круговой (эксцентрическое нанесение) ТСХ в зависимости от длины пути разделения  $Z_f$ .

Условия разделения в линейной (*a*) ТСХ: N-камера с насыщенной атмосферой; объем пробы каждого липофильного красителя 25 нл = 25 нг; элюент — бензол. Условия разделения в круговой (*б*) ТСХ; чашка Петри; объем пробы для каждого липофильного красителя 25 нл = 25 нг;  $Z_{f0} = 15$  мм; элюент — бензол.

ют приблизительно треть значений, получаемых в линейном варианте. Следовательно, в круговой ТСХ время разделения должно быть в 3 раза больше, чем в линейной, при одном и том же  $Z_f$  (рис. 6.16). Как можно установить из рис. 6.17, в линейном варианте высота тарелок меньше. При сравнении разрешения становится также ясно, что два вещества с более высокими значениями  $R_f$ , например Ф1/3, лучше разделять линейным методом. При разделении двух веществ с низкими величинами  $R_f$ , например зеленого и голубого красителей, оба метода дают практически одинаковые результаты.

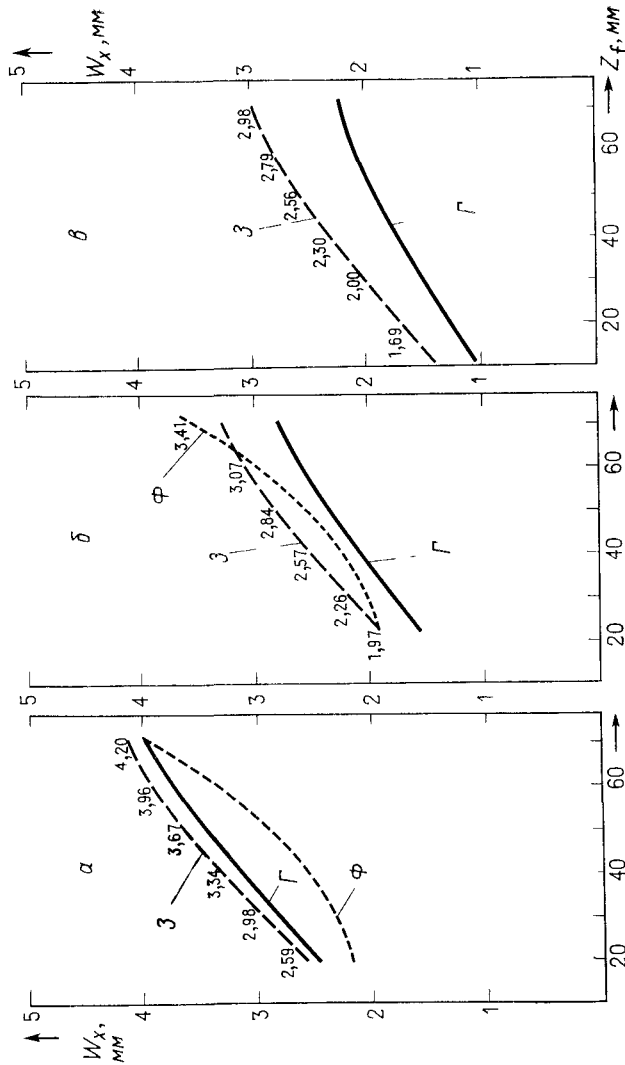
### 6.5. Преимущества ВЭТСХ

На рис. 6.18 представлена зависимость ширины пиков вещества  $w_x$  у основания от длины пути разделения  $Z_f$ , изменяющегося в пределах от 20 до 70 мм. Три графика (слева направо) соответствуют пробам липофильных красителей в количестве 750, 100 и 20 нг. Размывание пиков различно для различных веществ. Оно всегда больше для зеленого красителя со средней величиной  $R_f$  и меньше для голубого с более низким значением  $R_f$ . Во время перемещения фиолетового красителя с большим  $R_f$  на относительно малое расстояние наблюдается лишь небольшое размывание пиков, однако с увеличением расстояния размывание усиливается. Чем меньше количество нанесенного вещества, тем меньше размывание ширины пиков веществ у основания. Обсуждаемые соотношения приведены в табл. 6.8; в нее включено также сравнение размеров пробы в ВЭТСХ и колоночной хроматографии. Исходя из максимальной ширины пиков у основания, рассчитывают объем сорбента, необходимый при нанесении пробы в количестве 20 нг. Он составляет 3—42 мм<sup>3</sup> и соответствует  $Z_f$  от 10 до 70 мм. Пересчитывая эти результаты для колонок соответствующей длины, получают величину внутреннего диаметра в пределах 0,6—0,9 мм. Колонки с такими малыми диаметрами вряд ли найдут применение в высокоэффективной колоночной жидкостной хроматографии. На основании этого можно утверждать, что при разделении на ВЭТСХ-пластинках удовлетворительных результатов можно добиться на удивительно малом объеме

Таблица 6.8

**Зависимость объема сорбента, необходимого для проведения разделения, от длины пути разделения и количества пробы**  
Разделение проводили в N-камере с насыщенной газовой атмосферой; элюент — бензол

Длина пути разделения, мм	Максимальная ширина пика, мм	Объем сорбента, необходимый для разделения		
		ВЭТСХ мм <sup>3</sup>	рассчитанный для колонки	
			длиной, мм	диаметром, мм
<i>Количество пробы 750 нг</i>				
20	2,59	10,4	20	0,812
30	2,98	17,9	30	0,817
40	3,34	26,7	40	0,922
50	3,67	36,7	50	0,967
60	3,96	47,5	60	1,004
70	4,20	58,8	70	1,034
<i>Количество пробы 100 нг</i>				
20	1,97	7,9	20	0,708
30	2,28	13,7	30	0,762
40	2,57	20,6	40	0,809
50	2,84	28,4	50	0,850
60	3,07	36,8	60	0,884
70	3,41	47,7	70	0,931
<i>Количество пробы 20 нг</i>				
10	1,33	2,7	10	0,582
20	1,69	6,8	20	0,656
30	2,00	12,0	30	0,714
40	2,30	18,4	40	0,765
50	2,56	25,6	50	0,807
60	2,79	33,5	60	0,843
70	2,98	41,7	70	0,871



**Рис. 6.18. Зависимость ширины пика у основания  $W_x$  от длины пути разделения.**  
Условия эксперимента: N-камера с насыщенной атмосферой; объем пробы каждого липофильного красителя:  
а) 750 нг = 750 нг; б) 100 нг; в) 20 нг = 20 нг.

сорбента с оптимальной упаковкой частиц, составляем всего 10—30 мкл.

ВЭТСХ-пластинки покрыты оптимальным стандартизованным слоем. Тип сорбента, размер частиц и интервал



Таблица 6.9

Хроматографические и физические характеристики растворителей;  
к силикагелю

Растворитель <sup>a</sup>	Формула	Молекуляр- ная масса	K <sup>b</sup> , мм <sup>2</sup> /с		
			50 (22°C)	75 (22°C)	100 (22°C)
<i>n</i> -Гептан	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>	100,21	9,2	10,6	11,4
<i>n</i> -Гексан	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86,18	12,5	13,9	14,6
<i>n</i> -Пентан	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	72,15	10,6	12,6	13,9
Циклогексан	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	84,16	5,4	6,3	6,7
Сероуглерод	CS <sub>2</sub>	76,14	13,4	15,7	17,7
Четыреххлористый углерод	CCl <sub>4</sub>	153,82	6,1	6,7	7,0
Трихлорэтилен	ClCH=CCl <sub>2</sub>	131,39	8,1	9,6	10,6
Ксилол	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,17	6,7	7,6	8,2
Толуол	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92,14	8,3	9,8	11,0
Бензол	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	78,11	8,6	9,8	10,4
Хлороформ	CHCl <sub>3</sub>	119,38	9,0	10,5	11,6
Дихлорметан	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84,93	10,1	11,8	13,2
Диизопропиловый эфир	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	102,18	11,0	12,4	13,2
<i>tert</i> -Бутиловый спирт	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COH	74,12	1,0	1,1	1,1
Диэтиловый эфир	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O	74,12	11,0	13,3	15,3
Изобутиловый спирт	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> OH	74,12	1,3	1,5	1,6
Ацетонитрил	CH <sub>3</sub> CN	41,05	12,6	14,0	15,4
Изобутилметилкетон	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	100,16	7,0	8,2	9,1
Изопропиловый спирт	CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	60,10	2,1	2,3	2,5
Этилацетат	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,10	9,2	10,9	12,1
<i>n</i> -Пропиловый спирт	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	60,10	2,3	2,6	2,9
Метилэтилкетон	CH <sub>3</sub> COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	72,11	11,1	12,8	13,9
Ацетон	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	58,08	12,7	14,7	16,2
Этанол	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,07	3,4	3,9	4,2
Диоксан	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	5,2	6,0	6,5
Тetraгидрофуран	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	72,11	10,9	11,9	12,6
Метилловый спирт	CH <sub>3</sub> OH	32,04	5,6	6,5	7,1
Пиридин	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	79,10	6,3	7,2	8,0

элюотропные ряды, классифицированные по отношению  
(по данным Халпаана)

при Z <sub>f</sub> (мм)			Длина волны УФ-излуче- ния λ, нм	n <sub>D</sub> <sup>20</sup>	d <sub>4</sub> <sup>20</sup>	Т. кип., °C	
50 (40/60/80°C)	75 (40/60/80°C)	100 (40/60/80°C)					
13,8 15,8	14,3 17,6	14,6 19,2	195	1,388	0,684	98,4	
			195	1,372	0,659	68,8	
			200	1,358	0,626	36,1	
			210	1,426	0,779	80,8	
			380		1,263	46,3	
			265	1,460	1,594	76,8	
				1,481	1,462	86,9	
			290	1,495—1,505	0,860	137—140	
10,4 16,0 47,2	11,9 17,2 —	12,9 18,3 —	285	1,499	0,872	110,6	
			285	1,501	0,879	80,1	
			245	1,447	1,480	61,3	
			230	1,424	1,325	39,7	
				1,368	0,725	68,0	
					0,786	82,6	
			210	1,354	0,714	34,6	
				1,398	0,803	107,7	
			190		0,782	82,0	
				1,396	0,801	115,9	
			205	1,378	0,785	82,4	
			255	1,372	0,901	77,2	
3,9 5,5 9,9	4,3 6,0 11,1	4,5 6,3 —		1,386	0,804	97,2	
					1,379	0,805	79,6
					1,359	0,791	56,2
			335		0,791	78,3	
			205	1,383	1,034	101,3	
7,5 11,6 37,4	8,2 12,5 —	8,5 13,2 —	215	1,422			
			230		0,887	66	
			205	1,331	0,792	64,7	
			305	1,509	0,982	115,3	

Растворитель <sup>а</sup>	Давление паров при 20°C, мм рт. ст.	Теплота испарения <sup>д</sup>	$\eta$ , сП		$\gamma$ (20°C), дин/см
			при 22°C	при 40°C	
<i>n</i> -Гептан			0,40	0,33	20,4
<i>n</i> -Гексан	120	1,4	0,31	0,26	18,4
<i>n</i> -Пентан			0,22		16,0
Циклогексан	77	3,5	0,94	0,71	
Сероуглерод	298	1,8	0,36	0,32	
Четыреххлористый углерод	91	4	0,94	0,74	27,0
Трихлорэтилен	58	3	0,57	0,48	
Ксилол	5—7	13,5	0,68	0,54	
Толуол	21	6,1	0,57	0,47	28,1
Бензол	75	3	0,63	0,49	28,9
Хлороформ	160	2,5	0,56	0,47	27,1
Дихлорметан	356	1,8	0,43	0,36	26,5
Диизопропиловый эфир	135	1,6	0,35		32,0
<i>tert</i> -Бутиловый спирт	31	11	2,82	1,79	
Диэтиловый эфир	449	1	0,24	0,20	17,0
Изобутиловый спирт	9	24	3,71	2,12	
Ацетонитрил			0,39		29,3
Изобутилметилкетон	15	10	0,59		22,7
Изопропиловый спирт	32	10	2,27	1,35	21,7
Этилацетат	77	2,9	0,44	0,36	23,9
<i>n</i> -Пропиловый спирт	14	16	2,09	1,40	23,8
Метилэтилкетон	72	2,8	0,43		24,6
Ацетон	180	2,1	0,32	0,27	23,7
Этанол	44	8,3	1,14	0,82	22,8
Диоксан	30	7,3	1,21	0,92	33,7
Тетрагидрофуран	131	2,3	0,47	0,38	
Метилвый спирт	96	6,3	0,52	0,45	22,6
Пиридин	15	12,7	0,92	0,73	

<sup>а</sup> Растворители расположены в порядке возрастания полярности от лево

<sup>б</sup> При определении коэффициента скорости  $K$  использовали ТСХ-пластинки сыщенной атмосферой.

<sup>в</sup> Нижний предел длин волн УФ-излучения; толщина слоя в см; вещество

<sup>г</sup> Температуру кипения измеряли при атмосферном давлении 760 мм рт. ст.

<sup>д</sup> Относительная теплота испарения (для диэтилового эфира эта величина

<sup>е</sup> ПДК — предельно допустимая концентрация (ч. н. млн).

<sup>ж</sup> Диэлектрическая проницаемость, по данным Уолмана [Wollmann, Phar

<sup>з</sup> Дипольные моменты, рассчитанные по данным Онзагера (по данным Уол

<sup>и</sup> Дипольные моменты, рассчитанные по данным Дебая и измеренные в бен-  
ben Chemie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1969).

<sup>к</sup> Коэффициент полярности растворителя  $E_T$  измеряли при 25°C по методу

<sup>л</sup> Величина  $P'$  — характеристика разделения, связанная с полярностью  
дара [Bohrschneider, J. Chromatogr., 92, 223 (1974)].

<sup>м</sup> Коэффициент скорости  $K$  найден для  $Z_f = 100$  мм при 22°C; коэффициент

ПДК <sup>е</sup>	Диэлектрическая проницаемость <sup>ж</sup>	$\mu^3$	$\mu^H$	$E_T$ , к ккал/моль	$P'$ <sup>л</sup>	$K \cdot \eta^M$	$(K \cdot \eta \cdot 100) / \mu^3$
500						4,56	83
100						4,53	82
1000	1,9		0	30,9	0,0	3,06	55
300	2,0	0	0	31,2	0,0	6,30	114
10	2,6		0	32,6	1,0	6,37	115
10	2,2	0,28	0	32,5	1,7	6,58	119
50	3,4	0,89				6,04	109
200					2,4	5,58	101
200	2,4	0,38	0,4	33,9	2,3	6,27	114
Кацдерогенен	2,3	0,13	0	34,5	3,0	6,55	119
50	4,7	1,27	1,1	39,1	4,4	6,50	118
200	8,9	1,69	1,5	41,1	3,4	5,68	103
500	3,9		1,3	34,0	2,2	4,62	84
100	12,2		1,7	43,9	3,9	3,10	56
400	4,2	1,40	1,3	34,6	2,9	3,67	66
100	18,2	3,12				5,94	108
40	37,5		3,5	46,0	6,2	6,01	109
5						5,37	97
400	18,3		1,7	48,6	4,3	5,68	103
400	6,0		1,9	38,1	4,3	5,32	96
200	20,1	3,10	1,7	50,7	3,9	6,06	110
1000	18,5		2,7	41,3	4,5	5,98	108
1000	20,7	3,09	2,7	42,2	5,4	5,18	94
1000	24,3	3,04	1,7	51,9	5,2	4,79	87
100	2,2	0,40	0,4	36,0	4,8	7,87	143
200	7,4		1,7	37,4	4,2	5,92	107
200	32,6	2,93	1,7	55,5	6,6	3,69	67
5	12,3	2,28	2,2	40,2	5,3	7,36	133
						5,52	100

фильных к гидрофильным.

с закрепленным слоем силикагеля 60F-254 фирмы «Merck» и N-камеру с на-  
сравнения — вода; пропускание 20%.

принята равной 1).

mazie, 29, 708 (1974)].

мэпа см. «ж»).

azole по методу Рейшарта (Reichardt, Lösungsmittel-Effekte in der organisc-  
Димрота и сотр.) (по методу Рейшарта см. «ж»).

растворителя и селективностью — получена Снайдером по методике Рохсней-  
вязкости  $\eta$  — при 22°C.

изменений размеров частиц, а также плотности упаковки на этих пластинках специально подобраны. Применение этих пластинок позволяет проводить предварительную подачу растворителя, достигая высокой эффективности разделения, правильно выполнять операции нанесения пробы и поддерживать постоянство условий разделения. Чем легче проводить операцию нанесения пробы и разделение, тем больше смесей можно разделить. К числу общих преимуществ хроматографического разделения на тонких слоях сорбента следует отнести широкие возможности детектирования и высокую чувствительность методов прямого измерения количеств веществ на слое сорбента, из которого удален элюент. Все эти преимущества характерны в основном именно для высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Halpaap H., J. Chromatogr., 78, 63 (1973).
2. Halpaap H., J. Chromatogr., 78, 77 (1973).

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ ТСХ-РАЗДЕЛЕНИЯ

Д. Ионхен

*Janchen D.*, CAMAG, Muttenz, Switzerland

В настоящее время наибольшее развитие получили два хроматографических метода разделения нелетучих веществ: плоскостная и колоночная хроматографии. Тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография отличаются исключительной гибкостью и широкими аналитическими возможностями.

В начале 60-х годов этот метод благодаря своей простоте получил широкое распространение в большинстве аналитических лабораторий. С появлением ВЭЖХ многие исследователи ожидали, что он вытеснит ТСХ из ряда областей ее применения. Однако и в настоящее время продолжают сосуществовать оба хроматографических метода каждый в своей области применения, дополняя друг друга. В табл. 7.1 сравниваются преимущества и ограничения ВЭЖХ и ТСХ.

Из таблицы следует, что каждый метод имеет свои преимущества. Так, например, ВЭЖХ следует использовать для массовых анализов в течение длительного периода времени, а ТСХ лучше применять во всех тех случаях, когда необходимы гибкость и быстрота оптимизации анализа. Одним из недостатков ВЭЖХ является то, что свойства стационарной фазы изменяются под действием подвижной фазы. Например, хорошо известно, что после нескольких циклов хроматографического разделения характеристики стационарной фазы ухудшаются. Иногда необходимо проводить градиентное элюирование, после которого в течение относительно длительного периода времени сорбент необходимо регенерировать. Как видно

Таблица 7.1

## Сравнение ВЭЖХ и ТСХ

	ВЭЖХ	ТСХ
Замена стационарной фазы	Очень трудна	Легкая
Замена элюента	Трудна	Очень легкая
Качественная идентификация разделенных веществ	Трудна	Возможна
Стоимость анализа	Средняя	Низкая
Сравнительно легко достигаемый предел обнаружения	$10^{-12}$	$10^{-9} \dots 10^{-11}$ а

<sup>a</sup> Метод ВЭТСХ.

из табл. 7.1, ТСХ служит превосходной моделью для массовых анализов с помощью ВЭЖХ. В этом случае с помощью ТСХ получают достоверные данные, которые можно использовать в колоночных методах.

Специалисты в области колоночной хроматографии рассматривают ТСХ как ненаучный невоспроизводимый метод, к которому прибегают только тогда, когда другие методы оказываются несостоятельными. Такое отрицательное отношение отчасти можно понять. Большинство специалистов в области ТСХ косвенно допускают, что они могут получить невоспроизводимые результаты. В количественном ТСХ-анализе при прямом сканировании обычно используют один или несколько калибровочных стандартов, разделяемых на одной пластинке одновременно с определяемым веществом. Этот прием необходим, поскольку, как известно, при разделении равных количеств одного и того же вещества на разных пластинках трудно получить идентичные зоны.

Плохая воспроизводимость в ТСХ связана с условиями разделения. Колоночная хроматография отличается от ТСХ тем, что в последней присутствует третья фаза — газовая.

Общий источник ошибок, особенно в адсорбционном варианте, — пренебрежение влиянием окружающей среды (например, влажности) на слой сорбента перед разделением.

Разделение ТСХ-методом обычно включает следующие стадии. Сначала ТСХ-пластинки с жесткой или гибкой подложкой достают из упаковки, где они хранились. Во время нанесения пробы, которое обычно длится несколько минут, слой сорбента контактирует с атмосферой лаборатории. Известно, что полупериод установления равновесия между силикагелем и парами воды, присутствующими в воздухе, составляет приблизительно 90 с [1]. После нанесения пробы пластинку помещают в камеру для разделения. Поскольку в камере присутствует элюент, атмосфера в ней насыщена парами растворителя. Когда пластинку помещают в элюент, начинается разделение. Скорость перемещения элюента подчиняется закону, описывающему движение потока в хроматографической системе [2], т. е. расширение площади смоченного слоя уменьшается пропорционально квадрату времени.

Когда пластинку помещают в камеру для разделения, между сухим слоем и парами растворителя начинает устанавливаться равновесие. Этот процесс заканчивается, когда фронт элюента достигнет соответствующей области. Установление равновесия, т. е. время предварительной адсорбции паров элюента, предшествующее разделению, является относительно коротким для небольших хроматограмм и довольно длительным при относительно больших площадях сорбирующего слоя. Если элюент состоит из нескольких растворителей, то происходит преимущественная предварительная адсорбция какого-либо из его компонентов. Критически оценивая описываемый метод, можно констатировать, что в ходе ТСХ-анализа состав неподвижной и подвижной фаз изменяется по неизвестному закону.

Параллельно с развитием метода предпринимались попытки осуществить контроль параметров разделения ТСХ. Эти попытки сводились к следующему. Камеры для разделения полностью насыщали парами растворителя [3], разрабатывали устройства для разделения с исключительно малым внутренним объемом [4], насыщали парами элюента атмосферу камер типа сэндвич-камеры [5], контролировали относительную влажность [1], исследовали влияние

предварительного наполнения слоя элюентом [6, 7] и принимали ряд других мер. Однако все это мало повлияло на проведение массовых анализов методом ТСХ. Существует мнение, что целью ТСХ является хорошее разделение, а не получение истинных величин  $R_f$ . Однако, как будет показано ниже, воспроизводимость величин  $R_f$  является необходимым условием правильного ТСХ-анализа.

Полный контроль всех параметров процесса разделения, в том числе характеристик неподвижной, подвижной и газовой фаз, важен по следующим причинам.

1) Для получения достоверной количественной и качественной информации необходимо, чтобы хроматограммы были воспроизводимы, что позволит снизить число стандартных растворов, требующихся для калибровки.

2) Контроль характеристик всех трех фаз позволяет оптимизировать хроматографическое разрешение.

3) С помощью соответствующих методик эксперимента информацию, полученную ТСХ, можно применять в ВЭЖХ.

Рассмотрим несколько основных теоретических положений, которые помогут нам лучше понять некоторые результаты эксперимента.

С помощью величины  $R_f$  охарактеризуем хроматограмму после окончания процесса разделения:

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное веществом}}{\text{расстояние, пройденное фронтом растворителя}}.$$

Истинные или исправленные величины  $R_f - R'_f$ , с помощью которых получают данные об удерживании, сильно отличаются от наблюдаемых величин  $R_f$ . Между ними существует следующая взаимосвязь:

$$R'_f = R_f \cdot 1,1 \cdot \frac{V_m}{V_m - V_v},$$

где  $R'_f$  — истинная величина  $R_f$ , т. е. истинный путь подвижной фазы вдоль сорбента;  $V_m$  — кажущийся объем подвижной фазы;  $V_v$  — та часть кажущегося объема подвижной фазы, которая предварительно адсорбируется

на сухом слое, т. е. оказывает косвенное воздействие на разделение;  $(V_m - V_v)$  равно истинному объему подвижной фазы; 1,1 — усредненный эмпирический коэффициент, компенсирующий постепенное уменьшение концентрации растворителя от 100%-ного до нулевого насыщения вблизи фронта растворителя. Этот коэффициент приравнивают 1 после прекращения перемещения элюента, когда его фронт достигнет заранее проведенной линии.

Чтобы получить истинное значение  $R'_f$ , величину  $R_f$  нужно умножить на коэффициент  $\psi$ . Для получения достоверных данных следует использовать только истинные значения  $R'_f$  и  $V_v$ . Поскольку эти величины трудно измерить, условия разделения выбирают таким образом, чтобы значение  $\psi$  было как можно ближе 1.

Соотношение между  $R'_f$  и коэффициентом емкости (или коэффициентом извлечения)  $k$  можно записать в следующем виде:

$$R'_f = \frac{1}{k+1}, \quad \text{где } k = \frac{t_s}{t_m}.$$

Величина  $k$  для данного вещества равна отношению времени нахождения вещества в подвижной фазе к времени его удерживания неподвижной фазой.

Хроматографическое разрешение в ТСХ  $R_s$  определяют как

$$R_s = 1/4 \left( \frac{k_1}{k_2} - 1 \right) \cdot \sqrt{R'_f \cdot N} (1 - R'_f),$$

или после подстановки  $k$  вместо  $R'_f$

$$R_s = 1/4 \underbrace{\left( \frac{k_1}{k_2} - 1 \right)}_{\text{член 1}} \cdot \underbrace{\sqrt{\frac{1}{k+1}}}_{\text{член 2}} \cdot N \underbrace{\frac{k}{k+1}}_{\text{член 3}},$$

где  $N$  — число теоретических тарелок.

Первый член определяет селективность системы. Если величины  $k_1$  и  $k_2$  одинаковы, разделение становится невоз-

можным. Второй член характеризует неподвижную фазу. С помощью третьего члена учитывают положение зон двух веществ на хроматограмме, т. е. численные значения  $k_1$  и  $k_2$ .

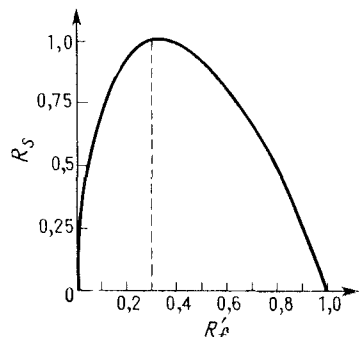


Рис. 7.1. График зависимости  $R_s$  от величины  $R'_f$  ( $R'_f$ ) при данной селективности (член 1 является постоянным).

Можно показать, что на сорбирующем слое с постоянными характеристиками максимальное разрешение можно получить при  $R'_f = 0,3$ . Величина разрешения, составляющая более 75% максимальной величины, чаще всего соответствует  $R'_f$  в интервале 0,1—0,6. Если свойства слоя в продольном направлении неоднородны, интервал максимальных значений  $R_s$  несколько сместится, при этом наибольшее значение  $R_s$  уменьшается.

### 7.1. Экспериментальная часть

Анализы проводили на четырех видах пластинок:

1) пластинках размером  $20 \times 20$  см, покрытых окисью алюминия марки DSF-B, фирмы «Самэг»; 2) пластинках размером  $20 \times 20$  см, покрытых слоем силикагеля 60 F-254, фирмы «Merck»; 3) пластинках для нано-ТСХ размером  $50 \times 50$  мм, покрытых слоем силикагеля 60 F-254 для ВЭТСХ фирмы «Merck»; 4) пластинках размером  $50 \times 50$  мм, покрытых слоем силикагеля марки «Nagel» для нано-ТСХ фирмы «Macherey».

Для хроматографического разделения использовали различные типы камер.

При работе с камерой «Vario» KS фирмы «Самэг» [8] сорбент предварительно приводили в равновесие (кондиционировали) с парами растворителей, находящихся в соответствующих углублениях в днище. В камеру помещали покровную пластинку и начинали разделение. Во всех

случаях условия предварительного кондиционирования изменяли поперек пластинки на участках слоя, отделенных друг от друга очень узкими полосами без сорбента. Перемещение элюента на всех участках ограничивали расстоянием, равным 100 мм, считая от места нанесения.

В ходе экспериментов использовали камеру фирмы «Самэг» (номер по каталогу 22255), предназначенную для обычных пластинок размером  $20 \times 20$  см, так называемую «лотковую» камеру этой же фирмы (номер по каталогу 22155) для высокоэффективных ТСХ-пластинок. В один из лотков камеры наливали жидкость для предварительного насыщения, туда же помещали тампон для ускорения насыщения. В соседний лоток помещали пластинку так, чтобы ее сорбирующий слой был обращен к тампону, добавляли элюент и начинали разделение. Процесс проводили в камере сэндвичевого типа с покровной стеклянной пластинкой.

Третьим видом камер была U-камера, выпускаемая фирмой «Самэг» [9, 10]. Эта камера установлена на столике с регулируемым уровнем. Она снабжена ячейкой дозирования для элюента и клапаном для введения пробы. Перед нанесением пробы проводили предварительное кондиционирование сорбента, продувая через камеру воздух со скоростью  $\sim 50$  см<sup>3</sup>/мин. Воздух предварительно насыщали парами, барботируя его через сосуд со специальной жидкостью. Элюент подавали со скоростью 1,4 см<sup>3</sup>/мл. \*

Для нанесения пробы на макропластинки пользовались капиллярными пипетками. Пробы в виде линии наносили при помощи аппликатора «Chromatocharger» фирмы «Самэг» (номер по каталогу 27500). Нанесение на сухие ВЭТСХ-пластинки осуществляли платино-иридиевым капилляром (номер по каталогу фирмы «Самэг» 28701). В смоченный растворителем слой пробу вводили через впускной клапан (номер по каталогу 28710).

В большинстве экспериментов использовали красители, что позволяло следить за разделяемыми зонами на всех ступенях процесса. Случайно услышанное автором мнение,

\* Такая размерность объемной скорости объясняется особенностями калибровки использованной авторами аппаратуры. — Прим. перев.

что описанные ниже эффекты относятся только к красителям, но не к «реальным хроматограммам», не следует принимать во внимание.

### 7.2. Модифицирование стационарной фазы веществами, не входящими в состав элюента

Активность сорбента является важным хроматографическим параметром. Активность, таким образом, связана с наличием «свободной поверхности» — свободных активных центров. В адсорбционной хроматографии активность

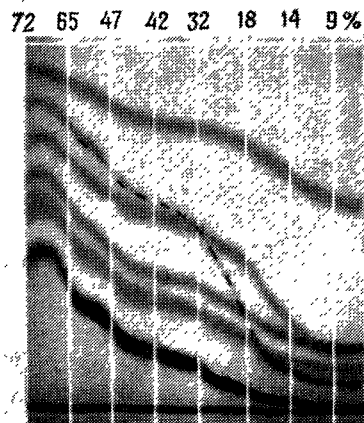


Рис. 7.2. ТС-хроматограмма многокомпонентной смеси красителей, полученная на участках силикагеля различной активности.

зависит от степени предварительного насыщения слоя сорбента водой. Такие слои адсорбируют воду из окружающей атмосферы в течение нескольких минут.

Рис. 7.2 иллюстрирует разделение многокомпонентной смеси красителей [8] на слоях окиси алюминия различной активности. Эксперименты проводили в камере «Vario» KS с предварительным насыщением сорбента парами раствора серной кислоты в течение 40 мин. В качестве элюента использовали бензол. Независимо от общего возрастания величины  $R_{fкр}$  с увеличением относительной влажности в ходе разделения произошли непредвиденные изменения в последовательности перемещения разделенных веществ.

### Заключение

В адсорбционной хроматографии при изменении относительной влажности сорбента (в описанном примере под прямым углом к продольной оси хроматограммы) рекомендуется контролировать чувствительность каждой хроматографической системы. Относительную влажность обычно

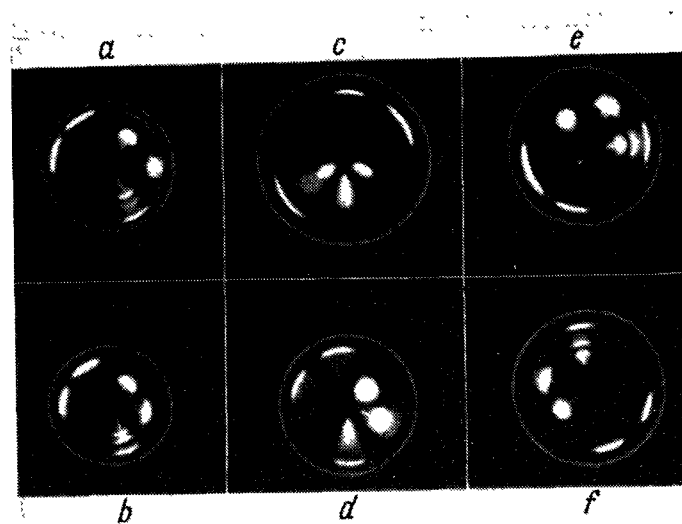


Рис. 7.3. Хроматограммы смесей дансильных аминокислот.

нельзя контролировать в ходе массовых ТСХ-определений. Если величина  $R_{fкр}$  зависит от относительной влажности, вещество может перемещаться в неподходящем интервале значений  $R_f$  при неблагоприятном составе газовой атмосферы. Для того чтобы предотвратить инверсию, необходимо контролировать относительную влажность или видоизменить хроматографическую систему. При возникновении инверсии вещества нельзя разделить вообще.

В распределительной хроматографии относительная влажность не является решающим фактором, за исключением того случая, когда в роли неподвижной жидкой фазы

выступает вода. При очень низкой относительной влажности высушивание может привести к тому, что емкость неподвижной жидкой фазы падает. С другой стороны, неподвижные жидкие фазы в распределительной хроматографии можно модифицировать путем установления динамического равновесия между парами воды в газовой атмосфере разделительной камеры и водой, содержащейся в неподвижной жидкой фазе на поверхности твердого носителя. Рис. 7.3 иллюстрирует результаты разделения сильных аминокислот на силикагеле MN в U-камере при элюировании смесью хлороформа, этилацетата, метилового спирта и воды в соотношении 45 : 45 : 10 : 1, причем растворы веществ *a* и *b* были взяты в количестве 100 мкл, а растворы веществ *c* — *f* — в количестве 150 мкл. Образцы наносили слева направо в следующей последовательности: DNS-валин, DNS-лейцин, DNS-глицин, DNS-аланин, DNS-смесь. Величина  $R_f$  судана-II была принята за 1.

Динамическое предварительное насыщение из газовой фазы проводили в следующей последовательности: (для вещества *a* его не проводили) для вещества *b* в течение 2 мин 50%-ной уксусной кислотой, для вещества *c* в течение 2 мин 5%-ной аммиачной водой, для вещества *d* в течение 5 мин диметилформамидом, для вещества *e* в течение 5 мин 20%-ной муравьиной кислотой, для вещества *f* концентрированной уксусной кислотой. Предварительное насыщение уксусной кислотой и аммиачной водой не приводило к существенному изменению результатов, в то время как муравьиная кислота и диметилформамид оказывали на них значительное влияние.

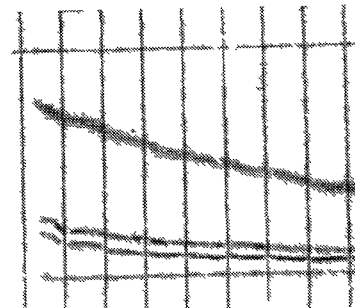
### 7.3. Влияние предварительного насыщения слоя сорбента компонентами элюента

При использовании разделительных камер в адсорбционной хроматографии необходимо учитывать преимущественную адсорбцию отдельных компонентов элюента. Степень преимущественной адсорбции зависит от площади хроматограммы. В ходе систематического исследования этого явления в качестве сорбента использовали силикагель, в качестве элюента — смесь бензола и метанола в соотношении 99 : 1. Изучали хроматографическое разделение смеси красителей. ацеторапана, индофенола, масляного желтого — в зависимости от изменения относительной влажности.

На рис. 7.4 представлена хроматограмма, полученная в камере «Vario» KS с градиентом влажности от 72%

в камере «Vario» KS с градиентом влажности от 72%

Рис. 7.4 ТС-хроматограмма смеси красителей на участках сорбента с различной относительной влажностью.



(слева) до 14% (справа) при кондиционировании в течение 30 мин. Как следует из результатов разделения, на величину  $R_{fкр}$  сильно влияет активность сорбирующего слоя. В этом эксперименте не наблюдалось инверсии, кото-



Рис 7.5. ТС-хроматограмма смеси красителей, полученная в камере «Vario» KS.

Три участка слева насыщали парами элюента в течение 10 мин и три участка справа оставались ненасыщенными; два участка в центре насыщали бензолом в течение 10 мин.

рая могла бы обесценить его результаты. Остальные участки хроматограммы предварительно насыщали при 42%-ной относительной влажности, что соответствовало пятому участку сорбента слева.

На рис. 7.5 представлена хроматограмма для той же смеси красителей и тех же элюентов, полученная в камере



«Vario» KS. Три участка сорбента слева подвергали воздействию паров элюента в течение 10 мин. Три участка сорбента справа не насыщали. Два центральных участка в течение 10 мин насыщали парами чистого бензола. Полученные результаты совершенно поразительны. При выдерживании сухого слоя в парах элюента последовательность перемещения индофенола и ацеторанжа изменялась на обратную, однако, если участки сорбента обработать

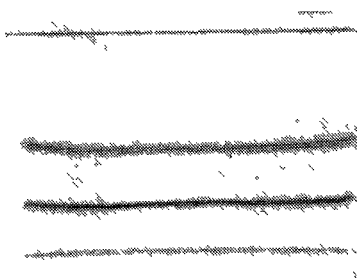


Рис. 7.6. Хроматограмма смеси красителей, полученная после кондиционирования пластинки вне камеры до относительной влажности 42%.

В этих условиях индофенол и ацеторанж не разделяются

парами чистого бензола, т. е. компонента, составляющего 99% элюента, инверсия не наблюдалась. Этот факт показывает, что результаты разделения данной смеси красителей в обычных камерах являются практически случайными. Это подтверждает хроматограмма на рис. 7.6, полученная при аналогичных хроматографических условиях, как и в предыдущем случае. Пластинку предварительно насыщали вне камеры в атмосфере с относительной влажностью 42%, затем ее помещали в лотковую камеру и сразу же начинали разделение. Индофенол и ацеторанж в этих условиях не разделялись. При длительном выдерживании сухого слоя в парах растворителя результаты разделения приближались к результатам, полученным на левых участках пластинки (рис. 7.5), а при кратковременном выдерживании — к результатам, полученным на правых участках. Время экспонирования в камере зависит от расстояния между уровнем растворителя и местом нанесения пробы.

Эти наблюдения подтверждены многочисленными хроматограммами, полученными в основном для тех же самых хроматографических систем на ВЭТСХ-пластинках с сили-

кагелем размером 50 × 50 мм. После нанесения пробы пластинки помещали в лотковую камеру, насыщенную парами элюента (смесь бензола и метилового спирта в соот-

Таблица 7.2

Условия и результаты разделения смеси красителей

Кондиционирование сорбента смесью бензол — метиловый спирт (99 : 1)			$R_f$		
до разделения	во время разделения	элюент	масляный желтый	индофенол	ацеторанж
Нет	Нет <sup>а</sup>	Бензол — метиловый спирт (99 : 1)	0,56	0,08	0,18
10 мин	Да	То же	0,55	0,40	0,29
Нет	Да	» »	0,59	0,17	0,21 <sup>б</sup>
10 мин	Да	Бензол	0,51	0,32	0,25

<sup>а</sup> С покровным стеклом

<sup>б</sup> Разрешение песочное

ношении 99 : 1). Разделение начинали, добавляя элюент в лоток с пластинкой. Условия эксперимента представлены в табл. 7.2.

### Заключение

Если один из компонентов элюента адсорбируется в значительно большей степени, чем другой (или другие), то разделение в больших камерах приводит к случайным не воспроизводимым результатам. Если в соответствии с рекомендациями [11] элюент для адсорбционной хроматографии состоит в основном из неполярного растворителя и небольшого количества относительно полярного растворителя, то в большинстве случаев будет происходить выборочная адсорбция. Чтобы получить воспроизводимые результаты, предварительно полностью насыщают слой сорбента или вообще его не кондиционируют. Как пока-

зали исследования влияния больших  $\psi$ -величин (см. выше), для разделения более перспективны ТСХ-пластинки без предварительного кондиционирования («сэндвичевый» вариант конструкции). Это положение справедливо для адсорбционной хроматографии. В распределительном варианте использование предварительного кондиционирования неподвижной жидкой фазы подвижной фазой позволяет улучшить разделения.

#### 7.4. Значение предварительной адсорбции растворителя сухим сорбентом (величины $V_s$ ) для разделения

На рис. 7.7 представлена хроматограмма, полученная на пластинке с силикагелем, при элюировании пробы судана-II, нанесенной в виде линии, этилацетатом в камере

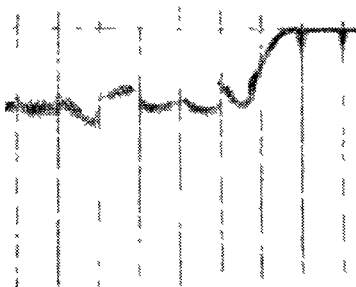


Рис. 7.7. Хроматограмма перемещения зон судана-II на участках сорбента, кондиционированных в течение 15 мин разными растворителями.

«Vario» KS. Поскольку судан-II перемещается по слою силикагеля вместе с этилацетатом на величину  $R_f$  — 1, его можно использовать для отметки действительного фронта этого элюента. Перед подачей элюента на слой отдельные участки сорбента кондиционировали в течение 15 мин парами различных растворителей. Первые три участка, считая слева направо, обрабатывали этилацетатом, четвертый участок — хлороформом, пятый — смесью бензола и метилового спирта в соотношении 98 : 2, шестой — бензолом, седьмой — циклогексаном; три последних участка не кондиционировали. На участках сорбента без предварительного насыщения судан-II мигрировал вместе

с фронтом растворителя, на остальных участках этого не происходило. Существуют два возможных объяснения описанного явления:

1) вследствие адсорбции растворителей, полярность которых отличается от полярности этилацетата, неподвижная фаза модифицируется и в результате соотношение  $t_s/t_m$  увеличивается;

2) во всех случаях истинная величина  $R_f$ , т. е.  $R'_f$ , равна 1, а это означает, что продвигающийся фронт элюента вытесняет растворитель, адсорбированный сухим сорбентом (положение действительного фронта элюента отмечено красителем).

Экспериментальные результаты, представленные на рис. 7.8, опровергают первое предположение. Разделение

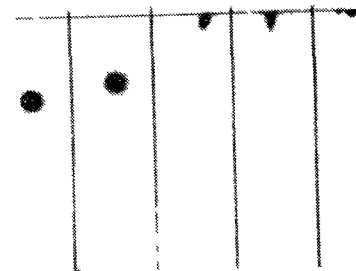


Рис. 7.8. Хроматограмма отдельных зон судана-II, опровергающая первое предположение.

проводили в камере «Vario» KS на пластинке с силикагелем, используя в качестве пробы раствор судана-II. Перед подачей элюента на сорбент в течение 15 мин кондиционировали два участка сорбента, расположенные слева: первый участок — смесью этилацетата с бензолом (9 : 1), второй участок — смесью этилацетата с метиловым спиртом (9 : 1). Разделение на участках 1 и 5 проводили смесью этилацетата с бензолом в соотношении 9 : 1, на участках 2 и 4 — смесью этилацетата с метиловым спиртом (9 : 1), на центральном участке элюентом служил этилацетат. В отличие от предыдущей хроматограммы (рис. 7.7) здесь не было обнаружено разницы между величинами  $R'_f$  красителя на участках сорбента с предварительным насыщением и без него независимо от полярности элюента по отноше-

нию к этилацетату. Второе объяснение обсуждаемого явления подтверждается хроматограммой на рис. 7.9. На пластинку с силикагелем в точки, отмеченные крестиками, наносили пробы судана-II. Левую часть пластинки предварительно кондиционировали в течение 15 мин этилацетатом, правую часть пластинки не обрабатывали. Затем к слою сорбента подвели этилацетат, содержащий 0,115% судана-II. Элюент перемещался до тех пор, пока его фронт на обоих краях пластинки не достигал отмеченного уровня.

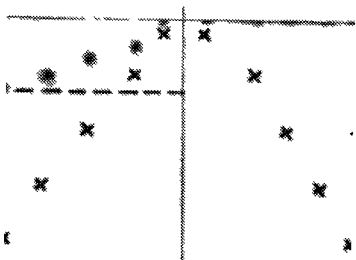


Рис. 7.9. Хроматограмма отдельных зон судана-II, подтверждающая второе предположение.

Истинный фронт растворителя соответствовал границе области красного оттенка, на рисунке обозначенной штриховой линией.

На левой стороне пластинки истинный фронт растворителя достигал значения  $R_f$ , равного только 0,65 ( $R'_f = R_f \cdot 0,65$ ). Фронт элюента (этилацетат, помеченный красителем) вытеснял этилацетат, адсорбированный слоем сорбента в результате предварительного кондиционирования из газовой фазы. Пробы судана-II, нанесенные на слой, перемещались на величину  $R_f = 0,65$ , т. е. на величину  $R'_f = 1$ , соответствующую чистому этилацетату. На правой стороне пластинки элюент с красителем, так же как и все пробы, перемещался вместе с фронтом ( $R_f = 1$ ).

#### Заключение

За исключением распределительной хроматографии (жидко-жидкостной хроматографии), кондиционирование слоя сорбента парами элюента является нежелательным, так как в некоторых случаях это приводит к сильному

уменьшению длины пути разделения ( $V_i$  может достигать 50%  $V_m$ ). Тогда зоны разделенных веществ с  $R_f \gg \gg 0,5$  приблизятся к фронту ( $R'_f = 1$ ), что означает отсутствие разделения. В этом случае получаемая из хроматограммы как качественная, так и количественная информация становится ненадежной. Использование сэндвич-камеры с ненасыщенной газовой атмосферой в типично адсорбционной хроматографии позволяет проводить разделение в лучших условиях. Как известно, механизм разделения на тонком слое силикагеля большей частью является промежуточным между адсорбционным и распределительным. Поэтому надо проводить или полное предварительное насыщение или не проводить насыщения вообще в зависимости от предполагаемого механизма разделения. Кондиционирование не следует проводить в условиях, при которых слой сорбента насыщается только частично, или в условиях, приводящих к изменению степени насыщения в ходе разделения.

#### 7.5. Использование данных ТСХ в ВЭЖХ. Сравнение кондиционирования из газовой и жидкой фаз

Разделение в сэндвич-камере с ненасыщенной атмосферой, очевидно, не подходит при использовании данных ТСХ в ВЭЖХ. В ВЭЖХ пробу вводят в колонку только после того, как стационарная и подвижная фазы придут в равновесие. Применение U-камеры фирмы «Camag» открывает сходный экспериментальный подход. В U-камере пробу вводят в поток элюента через специальный клапан (номер по каталогу 28710).

В связи с этим необходимо определить экспериментально, какое количество элюента следует пропустить через слой сорбента для достижения равновесия между стационарной и подвижной фазами, а также выяснить, может ли предварительное насыщение из газовой фазы заменить насыщение жидкой фазой и в какой степени. В первой серии экспериментов судан-II, отмечающий положение  $R'_f = 1$ , элюировали этилацетатом на ВЭТСХ-пластинке размером  $50 \times 50$  мм с силикагелем фирмы «Merck». После нанесения первой пробы в центр пластинки через центральный

капилляр со скоростью 1,4 с/мкл подавали подвижную фазу. После ввода каждых 30 мкл подвижной фазы скорость потока уменьшали и в капилляр для элюента вводили очередную небольшую пробу объемом 0,3 мкл и затем скорость потока подвижной фазы вновь увеличивали

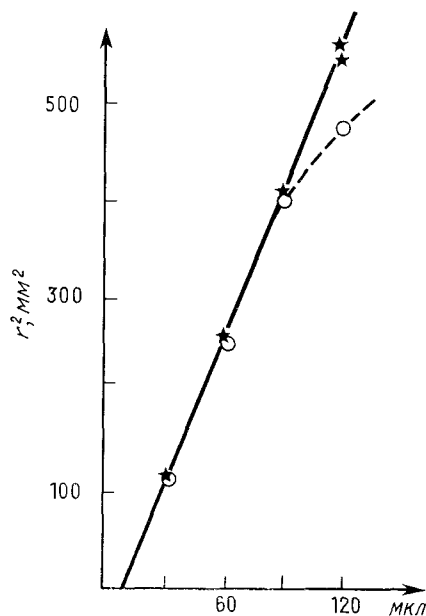


Рис. 7.10. График зависимости  $r^2$  от количества элюента.

до 1,4 с/мкл. После ввода 120 мкл элюента разделение прекращали, хроматограмму фотографировали и на увеличенных снимках измеряли радиусы концентрических окружностей с точностью  $\pm 0,15$  мм. Квадраты средних значений радиусов, измеренных в различных направлениях от центра (табл. 7.3), откладывали на оси ординат, а объем введенной подвижной фазы — на оси абсцисс (рис. 7.10). В табл. 7.3 также представлены условия предварительного динамического насыщения слоя.

Точки, соответствующие первой пробе эксперимента под номером 61, проводившегося без предварительного

Таблица 7.3

Влияние условий кондиционирования на величину квадрата радиуса смоченной зоны ( $r^2$ )

Объем элюента, мкл	Без предварительного кондиционирования	Предварительное кондиционирование в течение 2 мин	
		этилацетат	этилацетат — метиловый спирт (9 : 1)
	эксперимент № 61	эксперимент № 62	эксперимент № 63
120	473	564	546
90	408	410	410
60	252	256	256
30	112,4	115,6	115,6

уравновешивания слоя, образуют кривую, все другие графики представляют собой прямые линии, построенные с высокой точностью. Прямая линия, построенная по значениям  $r^2$ , найденным методом линейной регрессии, пересекает ось абсцисс в точке, соответствующей 7 мкл. Результаты эксперимента показали, что в данной хроматографической системе равновесие устанавливается через 2 мин при динамическом кондиционировании из газовой фазы или при пропускании 30 мкл элюента.

Во второй серии экспериментов исследовались (методом линейной ТСХ) вещества, продвигающиеся с относительно неполярным растворителем до  $R_f \leq 0,6$ . Смесь красителей ариабели красного и масляного желтого разделяли на том же типе силикагеля и при тех же условиях, как и в предыдущей серии экспериментов. Подачу порций образца чередовали с подачей элюента порциями объемом 50 мкл. В экспериментах № 73 и № 76 разделение начинали с введения пробы, в экспериментах № 74 и № 75 первоначально вводили 50 мкл элюента. Полученные результаты, а также данные о перемещении ариабели красного представлены в табл. 7.4 и на рис. 7.11.

В экспериментах № 73 и № 76 зависимость квадратов радиусов смоченных областей от объема введенного элюента

линейна, но это обусловлено разными причинами. В случае использования неполярного чистого толуола в отсутствие избирательной адсорбции равновесие устанавливалось сразу же после того, как подвижная фаза смачивала сорбент. В эксперименте № 76 для приведения системы в равновесие достаточно интенсивного динамического кондиционирования парами элюента. Для достижения этой же

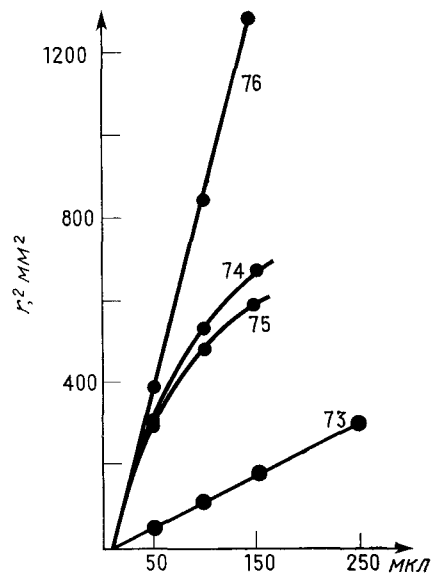


Рис. 7.11. График зависимости  $r^2$  от количества элюента.

цели с помощью подвижной фазы требовалось несколько более 150 мкл элюента. На первый взгляд может показаться удивительным, что уравнивание из газовой фазы является более эффективным. Это объясняется относительно высоким содержанием в газовой фазе метилового спирта и проникновением его во все участки слоя.

В случае высокой избирательной адсорбции компонентов элюента, присутствующего в незначительных количествах, следует проводить предварительное насыщение сорбента из газовой фазы. Можно также осуществлять уравни-

Таблица 7.4

Влияние условий кондиционирования на величину квадрата радиуса смоченной зоны ( $r^2$ )

Объем элюента, мкл	Эксперимент			
	№ 73	№ 74	№ 75	№ 76
	без предварительного кондиционирования			предварительное кондиционирование в течение 5 мин смесью толуол — метиловый спирт (95 : 5)
	элюент			
толуол	толуол — метиловый спирт (95 : 5)			
250	306	—	—	—
200	234	676	—	—
150	174	676	600	1332
100	114,5	529	484	841
50	50,4	309	289	388

вешивание из жидкой подвижной фазы, но для этого необходим такой объем элюента, чтобы его фронт достигал края слоя до установления равновесия. Кондиционирование элюентом можно использовать в непрерывном разделении. Все кривые, рассчитанные методом линейной регрессии, пересекают ось абсцисс в точке с координатой, существенно превышающей 8 мкл.

Эти выводы, полученные из нескольких экспериментов, не следует рассматривать как общее правило, которое охватывает любые условия разделения. Цель настоящей главы — обратить внимание хроматографистов на неизбежные (желательные или нежелательные) в тонкослойной хроматографии взаимодействия между всеми тремя фазами: сорбентом, элюентом и газовой фазой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geiss F., Schlitt H., Klose A., Z. anal. Chem., 213, 331 (1965).
2. De Ligny C. L., Kok E. C., J. Chromatogr., 38, 224 (1968).
3. Stahl E., Chemiker Ztg., 82, 323 (1958).

4. Brenner M., Niederwieser A., *Experientia*, **17**, 237 (1961).
5. Jänchen D., *J. Chromatogr.*, **14**, 261 (1964).
6. Giess F., Schlitt H., *Chromatographia*, **1**, 387 (1968).
7. Giess F., «Die Parameter Der Dünnschichtchromatographie», Vieweg (1972).
8. CAMAG, product bulletin 251—400 «The Vario-KS-chamber» (1969).
9. Kaiser R., *Z. anal. Chem.*, в печати (Euroanalysis issue II, 1976).
10. CAMAG, Firmendruckchrift 281—600 (1975).
11. Massart D. L., *J. Chromatogr.*, **79**, 157 (1973).

## Глава 8

## ВОЗМОЖНОСТИ И ПРАКТИКА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ют. Б. Хезел

*Hesel Ute B.*, Opton, Oberkochen, BDR

По сравнению с классической ТСХ ВЭТСХ является значительно более быстрым методом, легче поддающимся стандартизации. В настоящей главе детально рассмотрены различные методы введения проб в ТСХ-систему и способы прямого фотометрического детектирования ВЭТСХ-пластинок (методы измерения отражения, пропускания, одновременного измерения пропускания и отражения, способы детектирования, основанные на возбуждении и гашении флуоресценции). Стандартное отклонение результатов этого метода не превышает 2,5%. Эффективность ВЭТСХ проиллюстрирована на практических примерах. Одновременно с этим изложены основные требования к оборудованию, применяемому для количественного детектирования ВЭТСХ-пластинок.

### 8.1. Введение

Начиная приблизительно с 1968 г. в продаже появились установки для количественного детектирования ТС-хроматограмм методом прямого фотометрического сканирования. В результате длительного совершенствования этот метод стал незаменимым инструментом в ежедневных массовых анализах, проводимых в лабораториях фармацевтической и пищевой промышленности и клинической химии.

В газовой хроматографии перед анализом пробы необходимо перевести в газообразное состояние. Многие органические вещества, особенно высокомолекулярные, разлагаются при высоких температурах, причём ряд веществ превращается в легколетучие производные. Проведенные

недавно расчеты показали, что из-за этих трудностей 90% всех органических веществ лучше анализировать методом жидкостной хроматографии, т. е. колоночной жидкостной или тонкослойной хроматографией. Решение многих аналитических задач методами КЖХ и ТСХ основано на одном и том же механизме разделения. Эти методы в основном различаются способом перемещения элюента (в КЖХ — под действием давления, в ТСХ — под действием капиллярных сил) и формой стационарной фазы (в КЖХ сорбент принимает форму колонки, в ТСХ — тонкого слоя).

В то время как в КЖХ хроматографическая система жестко связана с детектором, в ТСХ разделение проводят в камере независимо от типа детектора. В связи с этим ТСХ является более гибким методом для решения разнообразных задач разделения и для разработки новых методик. Показания фотометрической детектирующей системы в ТСХ обычно не зависят от состава элюента. Жидкостную колоночную хроматографию целесообразно использовать в лаборатории для однотипных анализов, тогда как ТСХ с последующим фотометрическим детектированием — в лабораториях, где имеют дело с самыми различными задачами разделения. Для количественной оценки хроматограмм пригоден только фотометрический метод\*, поскольку даже опытный оператор при визуальном определении допускает ошибку не менее 10%. Дополнительным приемом при проведении количественного детектирования является удаление пятна вещества вместе с сорбентом с подложки. После этого проводят жидкостное извлечение вещества из сорбента. Количественное определение поглощения или флуоресценции раствора осуществляют с помощью фотометра [1]. Широкому распространению этого метода мешает ряд препятствий.

а) Проведение всех операций требует относительно больших затрат времени; так, например, детектирование 10 пятен занимает 2 ч.

\* Автор имеет в виду только оптические методы. Прецизионное количественное детектирование можно проводить также электрохимическими и исключительно чувствительными ядерно-физическими методами. — *Прим. перев.*

Длительность анализа является важным фактором с точки зрения экономической эффективности этого метода. Кроме того, увеличение продолжительности анализа отрицательно влияет на результаты определения веществ, которые при удалении с пластинки и элюировании под действием света, кислорода или других факторов подвергаются необратимым изменениям.

б) В ходе жидкостного экстрагирования не удается полностью извлечь определяемое вещество из сорбента. Получаемый раствор засоряется взвешенными частицами сорбента, что приводит к возрастанию неспецифического фонового поглощения.

Как правило, после разделения вещества прочно адсорбированы силикагелем и их можно экстрагировать только достаточно большими количествами растворителей. В очень редких случаях вещество удается извлечь полностью. Кроме того, при элюировании в раствор всегда попадает какая-то часть силикагеля, что вызывает рассеяние света при проведении измерений. На фотоумножитель детектирующей системы попадает меньшее количество света, что приводит к кажущемуся возрастанию поглощения. Уменьшив влияние фона, можно частично устранить два указанных выше источника ошибок. Для этого одновременно измеряют поглощение исследуемого и стандартного растворов в аналогичных условиях для одной и той же ТСХ-системы.

в) Метод жидкостного извлечения можно использовать лишь тогда, когда в хроматографической зоне (пятне) присутствует достаточное количество вещества. Для более полного извлечения исследуемого вещества необходимо не менее 5 мл растворителя. Для того чтобы измерения поглощения отличались чувствительностью, при экстрагировании, например, 5 мл растворителя в зоне должно присутствовать 10—100 мкг вещества. При меньшем содержании исследуемого вещества перед детектированием следует провести концентрирование раствора. Однако предварительное концентрирование удлиняет анализ и вносит дополнительные ошибки. Большие количества вещества в хроматографической зоне перегружают сорбент (сорбционная емкость сорбента превышает), что приводит к «образованию хвостов» — размыванию зоны в продоль-

ном направлении. Это явление наблюдается даже в макро-ТСХ-разделении на ТСХ-пластинках размером  $20 \times 20$  см.

ВЭТСХ-пластинки с закрепленным слоем непригодны для использования в этом методе, так как перегрузка сорбента происходит при содержании вещества в зоне более 10 мкг. При прямых фотометрических измерениях в макро-ТСХ для получения пиков одинаковой высоты достаточно

Таблица 8.1

Сравнение макро-ТСХ и ВЭТСХ

	Макро-ТСХ	ВЭТСХ
Размер пластинок	$20 \times 20$ см	$10 \times 10$ см $10 \times 20$ см
Сорбент	Силикагель	Силикагель
Высота тарелки	30 мм	12 мм
Объем пробы, отбираемый капилляром, приходящийся на одно пятно	1—5 мкл	Около 0,1—0,2 мкл
Диаметр пятна	Около 3—6 мм	Около 1—1,5 мм
Диаметр разделенных пятен	Около 6—15 мм	Около 2—5 мм
Длина пути разделения	10—15 см	3—6 см
Время разделения	Около 30—200 мин	Около 3—20 мин
Количество вещества в пятне при определении по методу		
абсорбции	Около 0,05—5 мкг	Около 0,005—0,5 мкг
флуоресценции	Около 1—1000 нг	Около 0,1—100 нг
Пределы обнаружения		
абсорбции	0,005—0,05 мкг	0,0005—0,005 мкг
флуоресценции	0,1—1 нг	0,01—0,1 нг
Число отдельных участков сорбента на пластинке	~ 10	~ 18 или ~ 36
Число проб на одной пластинке при определении методом парных проб с тремя стандартами	$0,5 \times 10 = 3 - 2$	$0,5 \times 18 = 3 = 6$ или $0,5 \times 36 = 3 = 15$

одной десятой части вещества, содержащегося в зоне, в ВЭТСХ — одной сотой (табл. 8.1).

В заключение можно сказать, что количественное определение пятен на ВЭТСХ-пластинках методом жидкостного извлечения не является целесообразным. Возможности фотометрического детектирования пятен веществ непосредственно на пластинке описаны в разд. 8.3—8.6.

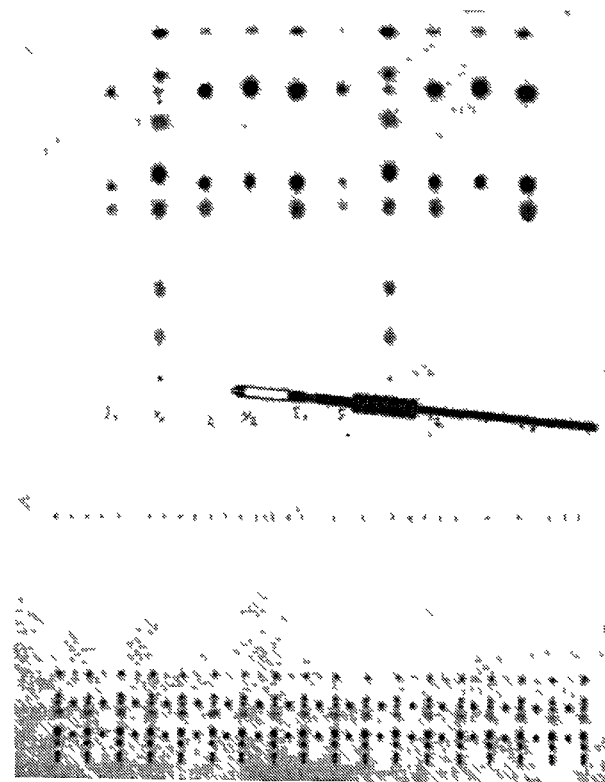


Рис. 8.1. Сравнение макро-ТС- и ВЭТС-хроматограмм многокомпонентных смесей красителей.

Вверху макро-ТС-хроматограмма и стеклянный микро-капилляр, внизу ВЭТС-хроматограмма и платино-иридиевый капилляр для нанесения проб. У ВЭТСХ-пластинки можно использовать обе стороны.



К недостаткам макро-ТСХ относятся большая длительность разделения и неудовлетворительное соотношение между числом определяемых веществ и числом стандартов, поскольку на таких хроматограммах можно выделить только 12 отдельных участков сорбента.

Использование ВЭТСХ (или нано-ТСХ) позволяет преодолеть эти недостатки.

В описанных ниже экспериментах разделение проводили на ВЭТСХ-пластинках с закрепленным слоем фирмы «Merck» (Дармштадт, ФРГ; пластинки размером  $10 \times 10$  или  $10 \times 20$  см с силикагелем 60 F-254 или без флуоресцентного индикатора). Благодаря тщательному подбору силикагеля удалось улучшить хроматографическое разрешение. При диаметре стартового пятна не более 1,5 мм оптимальное хроматографическое разрешение было получено на длине пути элюента 3—5 см. При элюировании одним и тем же растворителем длительность разделения методом ВЭТСХ по сравнению с макро-ТСХ сократилась в 5—10 раз и составляла 4—20 мин. Сокращение времени и длины пути разделения привело к уменьшению диффузии пятен в боковых направлениях, в результате чего диаметр пятна после разделения в редких случаях превышал 4,5 мм. Это позволило разделить ТСХ-пластинку на участки шириной 5 мм. Таким образом, пластинку размером  $10 \times 10$  см удалось разделить на 18 участков, а пластинку размером  $10 \times 20$  см — на 36 участков (рис. 8.1), что очень удобно для стандартизации методик в массовых анализах (см. разд. 8.4).

## 8.2. Методы нанесения пробы

Шприцы емкостью 1 мкл и стеклянные микрокапилляры, используемые в макро-ТСХ, непригодны в ВЭТСХ. С их помощью нельзя получить зоны достаточно малого диаметра, который в ВЭТСХ не должен превышать 2 мм. Рипфан и Халпаап [2] использовали шприц емкостью 1 мкл, выпускаемый фирмой «Hamilton» (США) в сочетании с микрометром типа «Agla», выпускаемым фирмой «Hornuth + Vetter» (Гейдельберг, ФРГ). Йорк использовал 10-микролитровый шприц фирмы «Hamilton» в сочетании с микрометром фирмы «Dasaga» (Гейдельберг, ФРГ).

Медленно вращая винт микрометра, с помощью этих устройств наносят пробы объемом 500—2000 нл, что особенно важно для исследования растворов с очень низкой концентрацией. Однако в этих устройствах трудно проводить замену исследуемого раствора на стандартный.

В описываемых в данном разделе экспериментах использовали платино-иридиевые капилляры, предложенные Кайзером (рис. 8.2) и выпускаемые фирмой «Antech», D-6702 (Бад Дюркхейм, ФРГ). Внутренний диаметр капилляров приблизительно равен 0,15 мм, емкость 0,23 мкл. Калибровку капилляра проводили с помощью раствора красителей фотометрическим методом. Для этого капилляры несколько раз наполняли раствором и опорожняли на фильтровальную бумагу. После извлечения красителей из бумаги концентрацию полученного раствора определяли фотометрически и по полученным результатам рассчитывали емкость капилляра. Платино-иридиевый капилляр с помощью платиновой проволоки соединяли со стеклянным стержнем. Первые эксперименты выполняли вручную.

После нанесения пробы капилляр следует хранить в жидкости, например в метиловом спирте. При погружении капилляр не должен удариться о дно сосуда. Если капилляр все же получит повреждения, их исправляют с помощью платиновой проволоки, которую вставляют в капилляр и затем вращают.

При нанесении пробы капилляр может засориться частицами сорбента; в этом случае его прочищают тонкой платиновой проволокой.

Чтобы капилляр не засорялся частицами сорбента, его укрепляют в аппликаторе «Eva-Chrom-TLC» фирмы «Orton» (США). С помощью ручки балансира капилляр в вертикальном положении плавно опускают на слой сорбента. При проведении массовых анализов с применением аппликатора в выборке из десяти опытов стандартное отклонение результатов составляло менее 2,5% (см. разд. 8.4). Новый раствор или стандарт наносили из одного и того же капилляра, дважды промывая его перед каждым нанесением. Для раствора судана красного в бензоле остаточная ошибка составляла 4%. Если проводить двойную промывку капилляра наносимым раствором, то остаточной

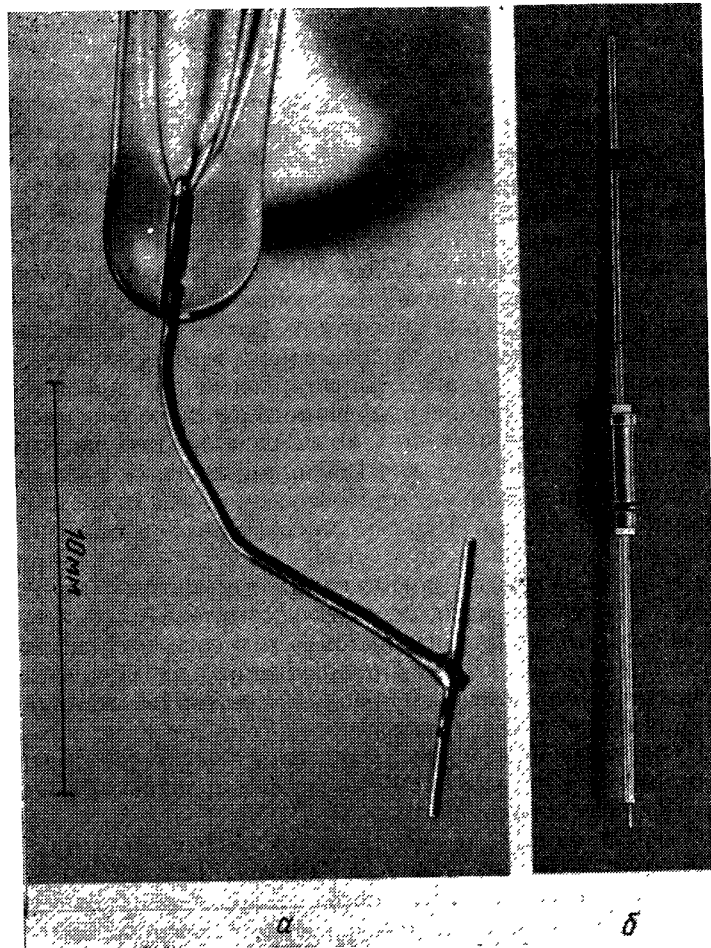


Рис. 8.2. *a* — платино-иридиевый капилляр, прикрепленный платиновой проволокой к стеклянному стержню (данные Кайзера); *b* — устройство для нанесения проб в методе ВЭТСХ (платино-иридиевый капилляр). Фирма «Antech» выпускает три вида капилляров емкостью 100, 200 и 500 нл.

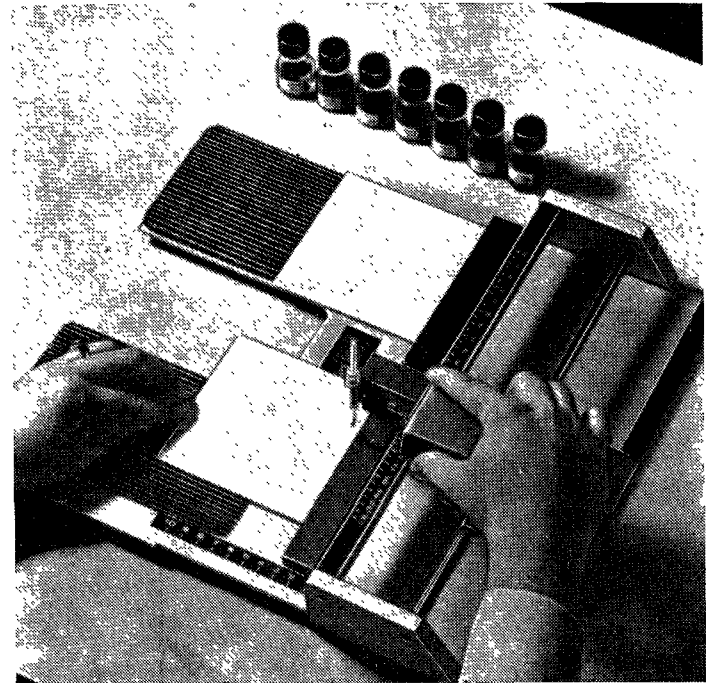


Рис. 8.3. Аппликатор «Eva-Stom-TLC» с платино-иридиевым капилляром для нанесения проб в ВЭТСХ.

ошибкой можно полностью пренебречь. В ходе экспериментов использовали одинаковые объемы проб и стандартных растворов. Количество вещества в пятне регулировали путем нанесения растворов различной концентрации.

### 8.3. Фотометрические методы [4—6] количественного детектирования в ВЭТСХ [2]

#### 8.3.1. Измерения по методу пропускания и отражения

В ходе фотометрических измерений апертуру скапирующего устройства настраивают с учетом диаметра определяемых пятен. По аналогии с фотометрией растворов

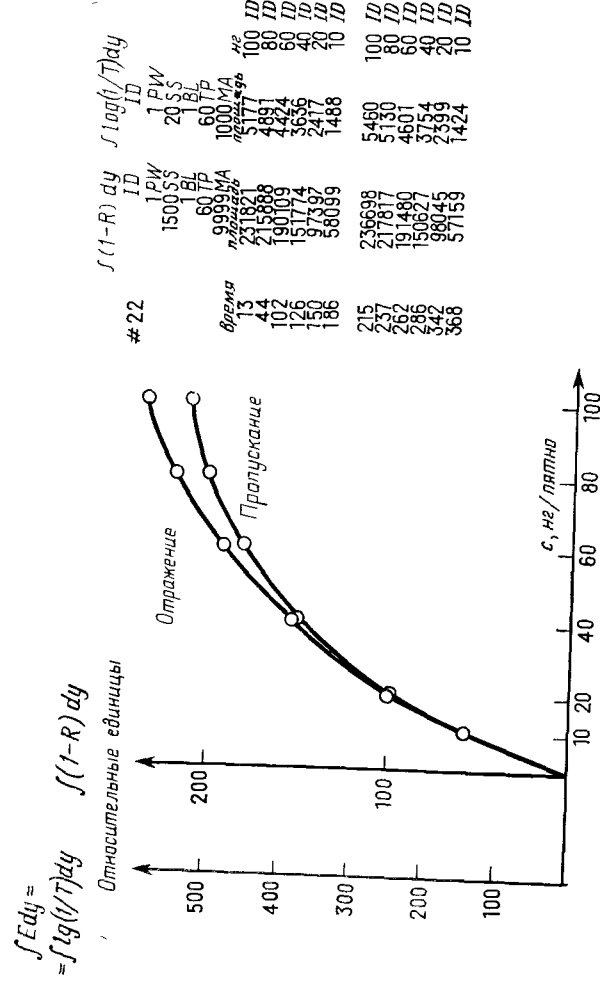


Рис. 8.4. Сравнение результатов сканирования по методу отражения и пропускания пятен судана красного, содержащих 10—100 нг вещества при длине волны облучения 500 нм. Детектирование проводили по методу парных проб. Приведены калибровочные кривые и диаграммная лента электронного интегратора.

количественное детектирование в ТСХ проводят путем измерения пропускания света, согласно закону Ламберта—Бера:  $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ , который выполняется в том случае, когда образец не рассеивает свет. Слой сорбента сильно рассеивает свет, следовательно, указанное условие в ТСХ не выполняется. В связи с этим соотношение между поглощением света и количеством вещества в пятне не является линейным (рис. 8.4, нижняя кривая).

Для того чтобы количественно определить содержание вещества в пятне, измеряют интенсивность рассеянного или отраженного света. Чистый слой сорбента отражает практически весь падающий свет, тогда как пятна, содержащие анализируемые вещества, поглощают часть света. Интенсивность отраженного света при этом уменьшается в зависимости от количества вещества в пятне и длины волны падающего света.

При измерениях по методу пропускания получают пики с большей высотой, чем по методу отражения (рис. 8.5). В методе пропускания свет проходит через слой сорбента. Изменения толщины сорбента в значительной степени влияют на интенсивность пропущенного света, что приводит к достаточно большим колебаниям нулевой линии. Практическое значение имеет соотношение между величиной полезного сигнала и величиной фоновых помех; в измерениях по методу отражения это соотношение всегда больше (рис. 8.5). Именно поэтому при измерениях по методу отражения предел обнаружения ниже, а воспроизводимость выше, чем в методе пропускания, и количественные измерения можно проводить в более широких пределах.

Использование метода пропускания ограничено еще и тем, что материал подложки (в общем случае — стекло) и слой сорбента поглощают УФ-излучение. Поэтому измерение пропускания света с длиной волны меньше 325 нм возможно только в методе гашения флуоресценции (недостатки последнего описаны ниже). Предположим, что более 80% веществ, разделяемых методом ТСХ, поглощают только УФ-свет, тогда ясно, что в лабораторной практике нельзя проводить измерения по методу пропускания, особенно в УФ-области. В связи с этим часто применяют опрыскивание пластинки растворами красите-

Деление шкалы =  $Skt$

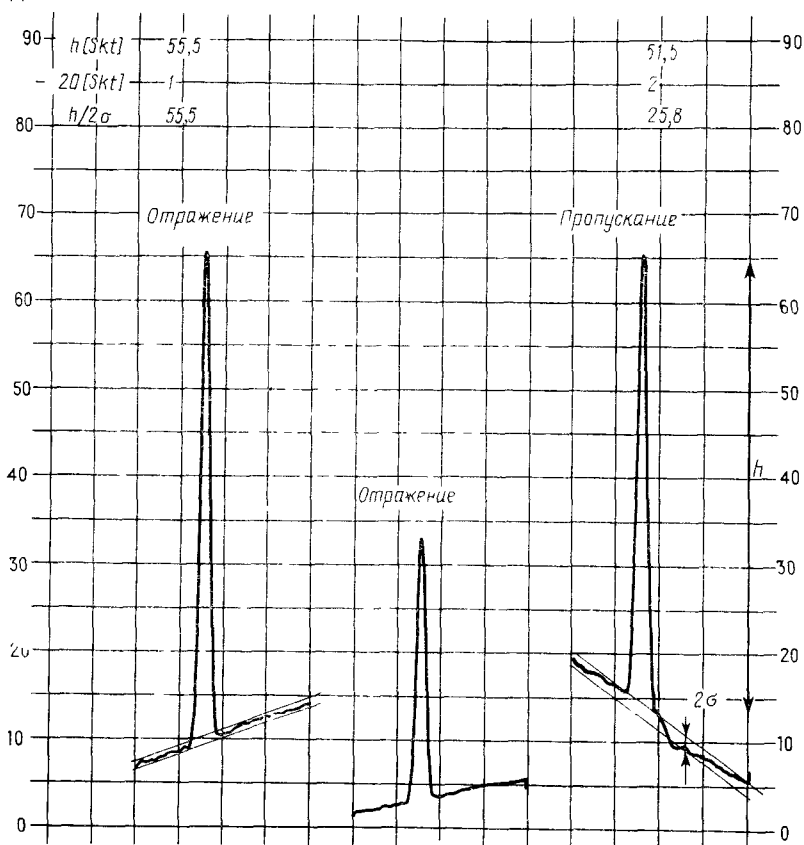


Рис. 8.5. Сравнение интенсивностей отраженного и проходящего света при сканировании пятна, содержащего 20 нг судана красного;  $\lambda = 500$  нм.

лей, что приводит к ухудшению воспроизводимости и дополнительным затратам времени. Измерения по методу отражения можно проводить по всей области спектра от 196 до 2500 нм, т. е. и в области УФ-излучения, что имеет большое практическое значение. При детектировании

по методу отражения график зависимости между количеством вещества в пятне и площадью соответствующего пика, полученный при оптическом сканировании, имеет

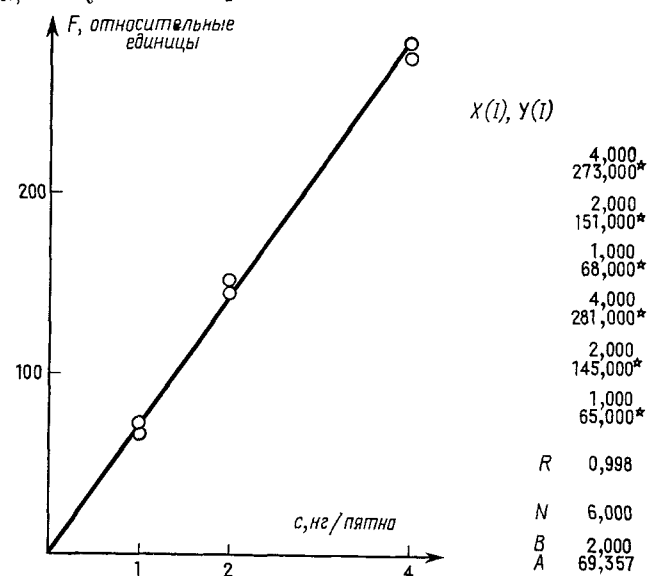


Рис. 8.6. Результаты определения по методу отражения очень маленьких количеств судана красного (1—4 нг) при  $\lambda = 500$  нм в методе парных проб.

Калибровочная прямая и диаграмма настольной ЭВМ для расчета линий регрессии и коэффициента корреляции  $R$ .

вид слегка искривленной линии, проходящей через начало координат (рис. 8.4, верхняя кривая). При анализе малых количеств веществ эта зависимость имеет вид прямой линии, проходящей через начало координат (рис. 8.6).

### 8.3.2. Выравнивание нулевой линии путем одновременного измерения интенсивности отражения и пропускания [7,8]

Предел обнаружения в фотометрических измерениях зависит только от наличия неоднородностей в слое сорбента (шум, возникающий в электронных схемах, на него

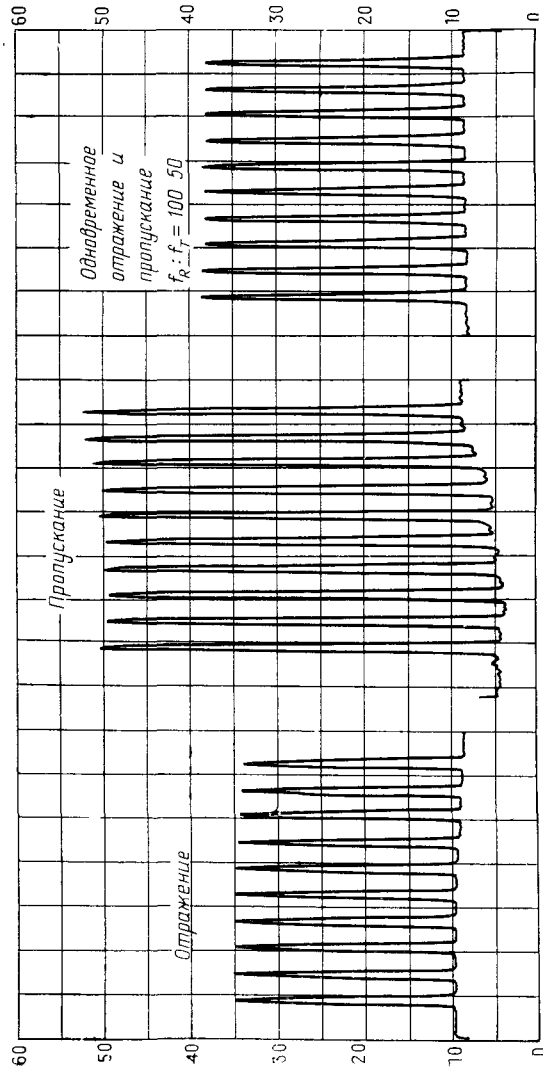


Рис. 8.7. Хроматограммы, полученные при сканировании в перпендикулярном направлении к продолженной оси ТС-хроматограммы 10 пятен судана красного (60 нг вещества в каждой) при  $\lambda = 500$  нм. Сканирование проводили по методу отражения, пропускания и одновременного сочетания методов отражения и пропускания.

не влияет). Излучение видимой области спектра рассеивается не в такой степени, как УФ-излучение, и поэтому проникает в слой. В связи с этим при детектировании в длинноволновой области спектра изменения толщины слоя приводят к флуктуациям нулевой линии, которые в макро-ТСХ больше по величине, чем в ВЭТСХ. Это объясняется тем, что ВЭТСХ-слои более однородны по толщине и благодаря большему рассеянию света поверхностью сорбента в слой проникает меньшее количество света. Несмотря на то что в методе ВЭТСХ дрейф нулевой линии значительно ниже, даже в этом случае (рис. 8.7) при сравнении результатов детектирования по методу отражения и пропускания можно заметить взаимосвязанные отклонения нулевой линии. В более толстых участках слоя происходит более интенсивное диффузное отражение и через слой проходит меньшее количество света. По этой причине интенсивности отражения и пропускания складываются. Для того чтобы выровнять нулевую линию, одновременно измеряют интенсивность отражения и пропускания на одном и том же участке слоя при одной и той же длине волны (патент ФРГ 2047952, англ. патент 1328734, патент США 3746869, рис. 8.7). Это позволяет увеличить соотношение между величиной полезного сигнала, высотой пика и усредненной величиной флуктуаций нулевой линии, что снижает предел обнаружения.

### 8.3.3. Методы измерения интенсивности поглощения УФ-излучения и гашения флуоресценции

Метод измерения отражения и гашения флуоресценции можно применить также для определения ТСХ-пятен веществ, поглощающих УФ-излучение. Последний метод можно рекомендовать для проявления пятен веществ, поглощающих УФ-излучение. Однако с точки зрения количественного детектирования метод гашения флуоресценции имеет ряд недостатков и ограничений по сравнению с методом отражения.

Флуоресцентный индикатор добавляют в слой по возможности равномерно. При возбуждении индикатора коротковолновым излучением возникает чаще всего зеленое

свечение (рис. 8.8). Если хроматограмму облучать коротковолновым излучением, то на фоне ярко флуоресцирующего сорбента, содержащего индикатор, проступают темные пятна веществ. Эти вещества играют роль фильтров, поглощающих часть возбуждающего флуоресценцию излучения. Поглощение снижает интенсивность флуоресценции индикатора в пятне. Следовательно, с точки зрения законов физики в описываемом методе происходит не гашение, а поглощение излучения с длиной волны, выбранной для

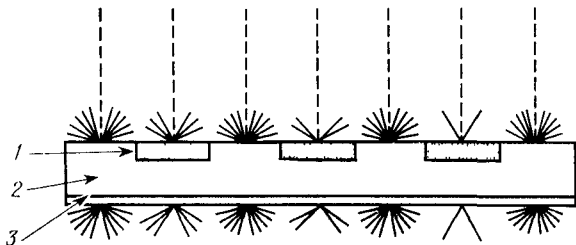


Рис. 8.8. Схематическое изображение механизма гашения флуоресценции.

1 — зона вещества, 2 — сорбент с флуоресцирующим индикатором, 3 — стеклянная подложка.  
 - - - - - возбуждающее излучение с длиной волны 254 нм (ртутная лампа).  
 — — — — — испускаемое излучение

возбуждения флуоресценции. Поэтому метод гашения более правильно было бы назвать методом ослабления флуоресценции [9].

Как показано на рис. 8.9 (II и IV), при сканировании по отражению излучения ртутного источника с длиной волны 254 нм и по ослаблению флуоресценции при той же длине волны получаются пики одинаковой высоты. Однако по сравнению с методом отражения метод ослабления флуоресценции характеризуется более высоким уровнем фона, связанного с неоднородным распределением индикатора в слое сорбента. Именно поэтому, несмотря на одинаковые высоты пиков, отношение высоты пиков к уровню фона в методе отражения выше, чем в методе ослабления флуоресценции. Даже при измерении отражения на ВЭТСХ-пластинках с флуоресцентным индикатором фон значительно больше электрических помех фотометра.

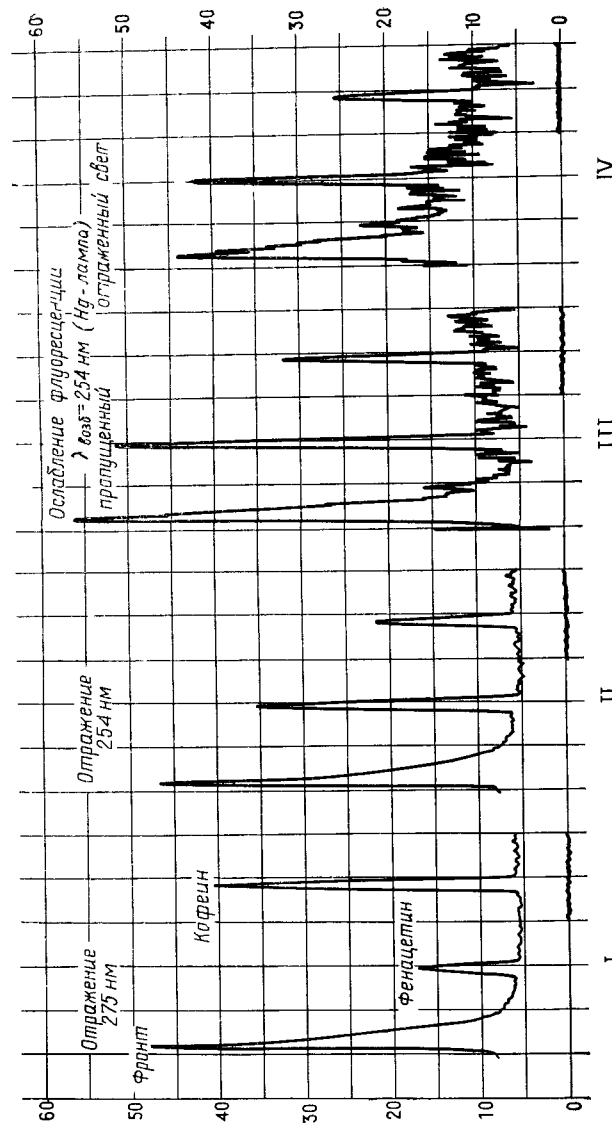


Рис. 8.9. Диаграммы, полученные сканированием ТС-хроматограмм смеси лекарственных веществ по методу отражения и ослабления флуоресценции.

Остаточные фоновые помехи можно отчасти объяснить поглощением индикатором УФ-излучения.

В принципе явление гашения флуоресценции можно использовать при фотометрическом определении пятен веществ, поглощающих в УФ-области. Для этого измеряют интенсивность длинноволнового флуоресцентного излучения, прошедшего через подложку и слой сорбента. Однако, как это следует из рис. 8.9 (III), в описываемом способе наблюдается ухудшение соотношения полезного сигнала к интенсивности фоновых помех.

В методе ослабления флуоресценции применяют фотометр, снабженный только одной ртутной лампой и фильтром. Для возбуждения флуоресценции удобна спектральная линия при 254 нм (или также излучение с длиной волны 281—313 нм). Таким образом, для измерения поглощения в УФ-области, очень важной для анализа органических веществ, пригодны только несколько длин волн выше 254 нм. Метод ослабления флуоресценции проигрывает в селективности и чувствительности при определении веществ, максимум поглощения которых находится в УФ-области. Это связано с тем, что в описываемом методе возбуждающее излучение обычно не подстраивают к максимуму поглощения определяемого вещества. На рис. 8.9 (I, II) показано, как получить оптимальную высоту пика, изменяя длину волны излучения спектрофотометра.

В измерениях по методу ослабления флуоресценции часто пользуются монохроматором, который позволяет измерять пропускание длинноволнового излучения флуоресцентного индикатора (рис. 8.9, III).

Метод ослабления флуоресценции позволяет определять только вещества с максимумом поглощения выше 240 нм. Максимум возбуждения флуоресцентного индикатора находится около 280 нм, ниже 240 нм трудно получить какое-либо возбуждение индикатора. Именно поэтому вещества, поглощающие ниже 240 нм, не могут выступать в качестве фильтра по отношению к флуоресцентному индикатору и их нельзя детектировать описываемым способом. К таким веществам, например, относятся бензойная кислота  $\lambda = 226$  нм, глюкозиды дигиталиса  $\lambda = 225$  нм, фенобарбитал  $\lambda = 215$  нм, сульфат атропина  $\lambda = 196$  нм.

В заключение можно констатировать, что количествен-

ное детектирование, основанное на измерении интенсивности отраженного света, дает лучшие результаты по сравнению с методами пропускания и ослабления флуоресценции. При проведении измерений этим методом имеется возможность выбора оптимальной длины волны излучения. Для количественной оценки хроматограмм, полученных с помощью флуоресцентного индикатора, измерения также лучше проводить по методу отражения.

#### 8.3.4. Методы измерения интенсивности флуоресценции

Прямое измерение интенсивности флуоресценции веществ на тонком слое сорбента обладает рядом существенных преимуществ по сравнению с методом ослабления флуоресценции.

а) Повышенной селективностью, так как в смесях веществ детектируют только флуоресцирующие вещества. По сравнению с методами измерения интенсивности поглощения имеется более широкий выбор условий возбуждения флуоресценции и детектирования флуоресцентного излучения.

б) Более высокой чувствительностью (предел обнаружения ниже в 10—1000 раз).

в) Широким интервалом линейной зависимости между количеством вещества в пятне и интенсивностью флуоресценции. Аналогично фотометрии растворов между интенсивностью флуоресценции  $I_F$  и количеством вещества в пятне существует экспоненциальная зависимость:

$$I_F \sim I_{0\lambda} \cdot (1 - 10^{-\varepsilon_{\lambda} c}),$$

где  $I_{0\lambda}$  — интенсивность возбуждающего излучения.

Эта формула является следствием закона Ламберта — Бера и подтверждается опытами с родамином В (рис. 8.10). Основное соотношение флуориметрии, являющееся линейным приближением приведенной выше формулы,

$$I_F \sim I_{0\lambda} \cdot \varepsilon_{\lambda} \cdot c$$

справедливо для малых произведений  $\varepsilon_{\lambda} c$ , т. е. для малых количеств веществ в пятнах. Так, например, при измере-

нии флуоресценции родамина В, количество которого в зоне изменяется от 0,01 до 0,5 нг (рис. 8.11), получают прямую калибровочную линию, проходящую через начало координат. Чтобы снизить предел обнаружения, необходимо, чтобы коэффициент пропорциональности  $I_0 \lambda \varepsilon \lambda$  был как можно выше. Используя квазинепрерывный источник

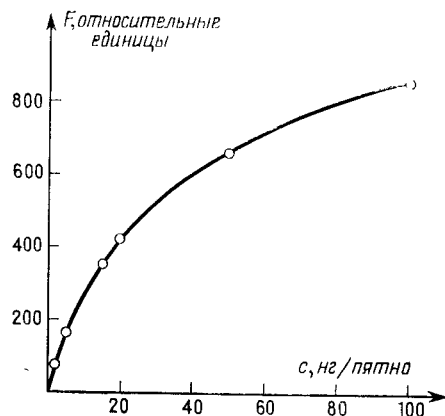


Рис. 8.10. Калибровочный график результатов измерений по методу флуоресценции пятен родамина В, содержащих 2—100 нг вещества:  $\lambda_{\text{возб}} = 546$  нм (ртутная лампа);  $\lambda_{\text{исп}} = 585$  нм (фильтр FL56).

излучения — ксеноновую лампу, подбирают оптимальную величину  $\varepsilon_{\lambda}$ . Как показывает опыт, лучше применять не ксеноновую лампу с длиной волны излучения, близкой к максимуму возбуждения вещества, а ртутную лампу среднего давления с высокой интенсивностью излучения, обеспечивающую высокие значения произведения  $I_0 \lambda \varepsilon \lambda$ .

г) Результаты детектирования флуоресценции не зависят от формы пятна [10].

Интенсивность флуоресцентного излучения измеряют с помощью фотоумножителя. Так как получаемый сигнал линейно зависит от количества флуоресцирующего вещества в пятне, здесь не нужны дополнительные математические преобразования, требующиеся после измерений по методу поглощения. В описываемом способе пятно

детектируют полностью независимо от конкретных особенностей распределения вещества по его площади. Количество вещества связывают с площадью пика, полученного в ходе записи результатов сканирования.

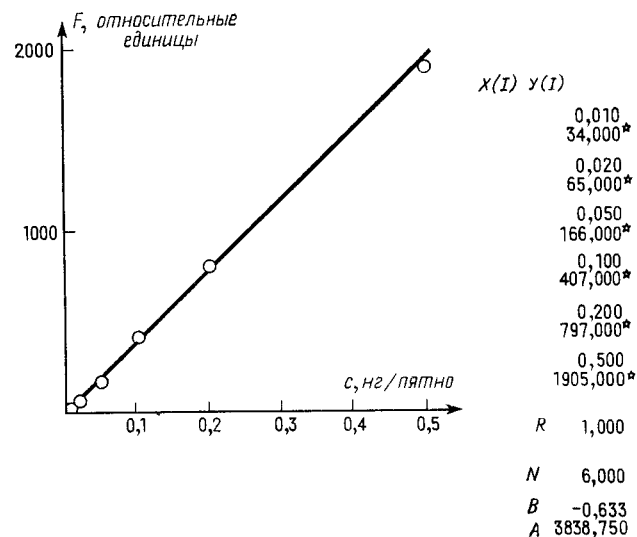


Рис. 8.11. Калибровочный график и диаграмма настольной ЭВМ для расчета линий регрессии и коэффициента корреляции  $R$  при сканировании пятен родамина В (0,01—0,5 нг);  $\lambda_{\text{возб}} = 546$  нм (ртутная лампа);  $\lambda_{\text{исп}} = 585$  нм (фильтр FL56).

Независимость результатов детектирования от формы зоны является важным фактором при исследовании экстрактов. В этих условиях становится возможным получение дополнительной информации за счет сравнения пятен, полученных при одномерном и двумерном разделении.

#### 8.4. Воспроизводимость

Воспроизводимость прямого фотометрического детектирования зависит от ряда факторов: а) воспроизводимости операции нанесения пробы; б) воспроизводимости функционирования сканирующих устройств и в) воспроизво-



димости величин  $R_f$ , получаемых на одной и той же ТСХ-пластинке.

В настоящее время еще не разработаны методы прямого определения воспроизводимости результатов нанесения пробы на тонкий слой сорбента. Приводимые ниже данные получены с помощью платино-придиевого капилляра в сочетании с аппликатором «EVA-Chrom-TLC», описанным в разд. 8.2.

Воспроизводимость функционирования фотометрической системы складывается из воспроизводимости работы привода установки, фотоумножителя и интегратора, свя-

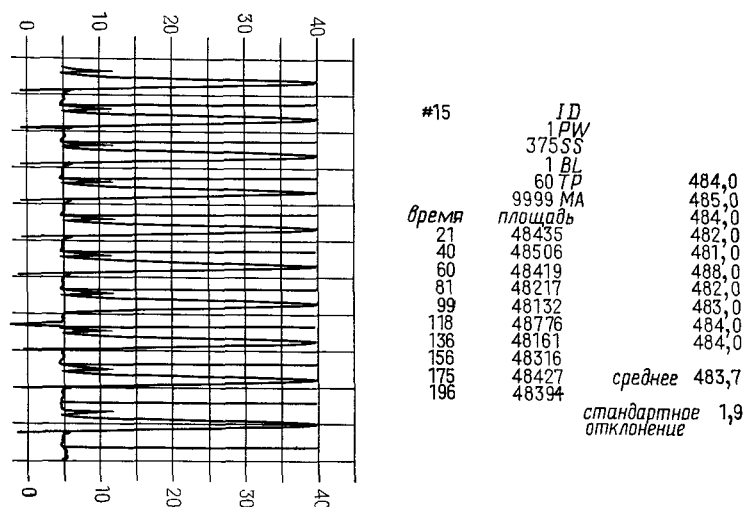


Рис. 8.12. Диаграмма интегратора и настольной ЭВМ для подсчета стандартного отклонения, а также хроматограмма повторного сканирования одного и того же пятна (80 нг вещества) ( $\lambda = 275$  нм) по методу отражения для определения воспроизводимости работы спектрофотометра «Opton» КМ 3.

занного с ЭВМ. Рис. 8.12 иллюстрирует воспроизводимость определения пятна, содержащего 80 нг кофеина, которое сканировали (10 раз) на спектрофотометре «Opton» КМ 3. Между отдельными измерениями пятно удаляли из области детектирования, а затем снова вводили его после возвращения системы детектирования в исходное

состояние. Следует отметить, что полная настройка сканирующей системы, очень важная для получения воспроизводимых результатов, занимает менее 2 с на одно пятно. Стандартное отклонение отдельных значений

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

результатов определения детектирующей системы значительно меньше 1%.

Воспроизводимость величин  $R_f$  в основном зависит от толщины слоя сорбента вдоль пути разделения. Как показывают предварительные исследования, это относится в большей степени к макро-ТСХ, чем в ВЭТСХ. С другой стороны, при искривлении фронта элюента величины  $R_f$  изменяются. Чтобы исключить влияние этих факторов, одновременно анализируют исследуемый и стандартный растворы по методу парных проб, предложенному Фреем [11] (рис. 8.13). Анализ обоих растворов проводят на разных половинках одной и той же пластинки.

Этот метод позволяет в известной степени усреднить изменения хроматографических свойств пластинки. Если проводить разделение определяемой и стандартной смесей только на соседних участках сорбента, то усреднение не произойдет. Метод Фрея успешно использовали на ВЭТСХ-пластинках (рис. 8.13). С увеличением числа отдельных участков на пластинке метод парных проб стал пригоден и для использования в ВЭТСХ. Для проведения количественного определения обычно рекомендуется 3 стандартных раствора. Например, на макро-ТСХ-пластинке можно выделить 10 участков сорбента, т. е. наносить 5 неизвестных и стандартных проб. На макро-ТСХ-пластинке методом парных проб можно проанализировать только  $5 - 3 = 2$  пробы. На ВЭТСХ-пластинке размером  $10 \times 10$  см можно выделить 18 отдельных участков сорбента и, следовательно, определить 6 проб ( $0,5 \cdot 18 - 3 = 6$ ). На ВЭТСХ-пластинке размером  $10 \times 20$  см приблизительно с 36 отдельными участками сорбента удается определить 15 проб ( $0,5 \cdot 36 - 3 = 15$ ). Этого числа проб и стандартов достаточно для получения калибровочных кривых применительно к каждой пластинке.

В заключение отметим, что при использовании метода парных проб число проб, разделяемых на одной ВЭТСХ-пластинке, с последующим количественным детектированием по сравнению с макро-ТСХ увеличивается в 3—7,5 раз. Если учесть, что продолжительность ВЭТСХ-разделения в 5—10 раз меньше по сравнению с макро-ТСХ,

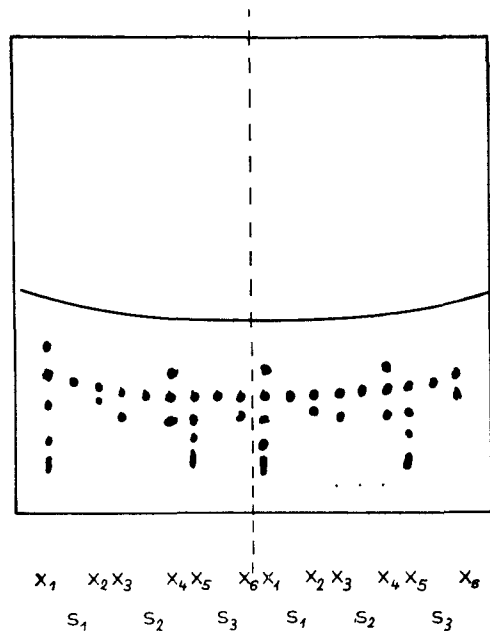


Рис. 8.13. ВЭТСХ-хроматограмма на пластинке размером  $10 \times 10$  см, полученная методом парных проб ( $S_1 - S_3$  — стандарты,  $X_1 - X_6$  — пробы).

то общее время хроматографического анализа сокращается в 15—75 раз.

Рис. 8.14—8.16 иллюстрируют воспроизводимость фотометрического детектирования ВЭТСХ-хроматограмм (на слой сорбента наносили 10 проб одного и того же раствора).

При массовых анализах получают стандартные отклонения менее 2,5%, их можно уменьшить применением метода парных проб.

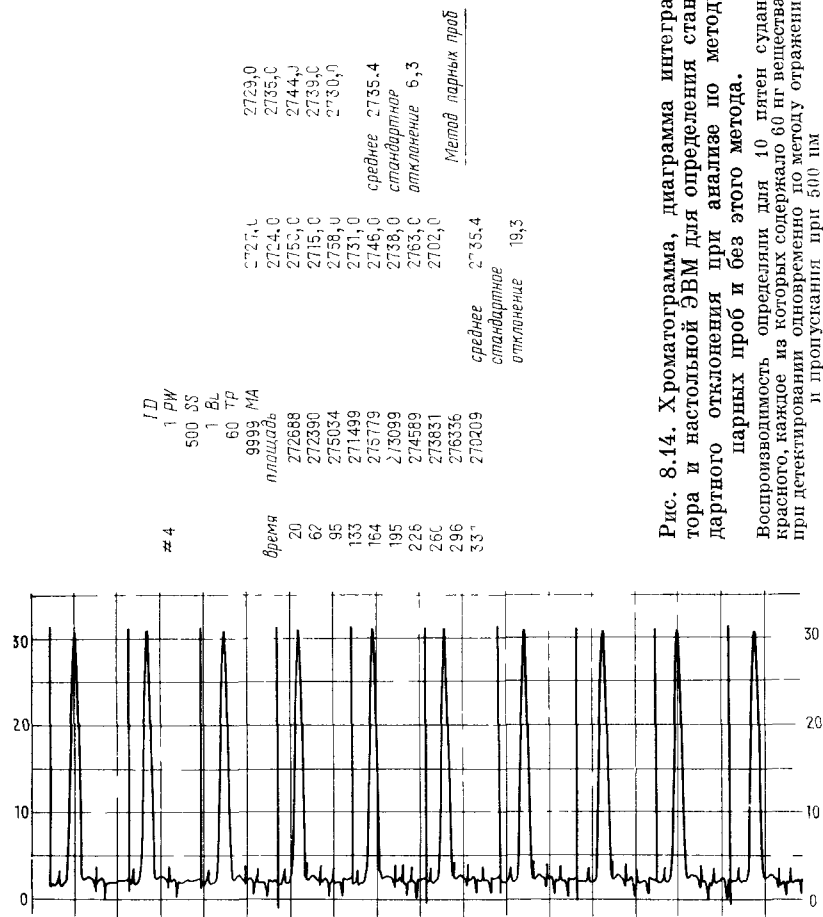


Рис. 8.14. Хроматограмма, диаграмма интегратора и настольной ЭВМ для определения стандартного отклонения при анализе по методу парных проб и без этого метода.

Воспроизводимость определяли для 10 проб сулана красного, каждое из которых содержало 60 нг вещества, при детектировании одновременно по методу отражения и пропускания при 500 нм.

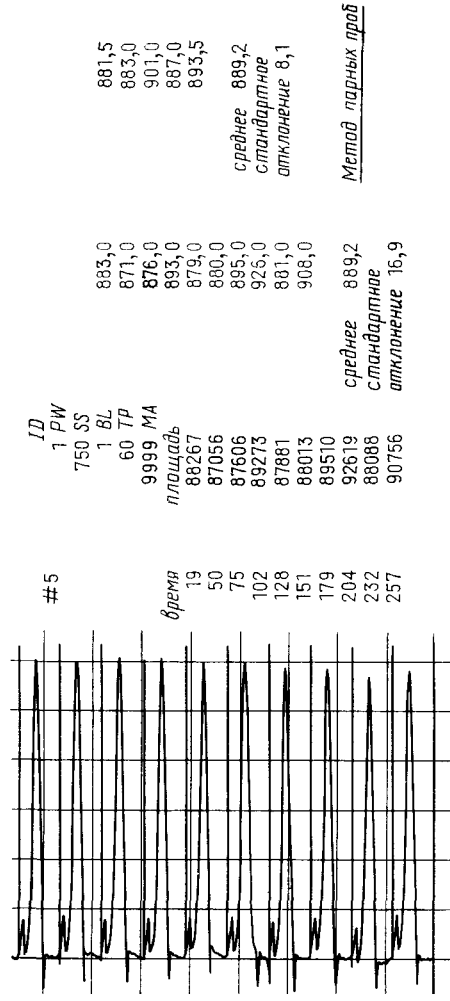


Рис. 8.15. Хромотограмма, диаграмма интегратора и настольной ЭВМ для определения стандартного отклонения при анализе по методу парных проб или без него.  
Воспроизводимость определяли для 10 пятен кофеина, каждое из которых содержало 80 нг вещества, при детектировании по методу отражения при 275 нм.

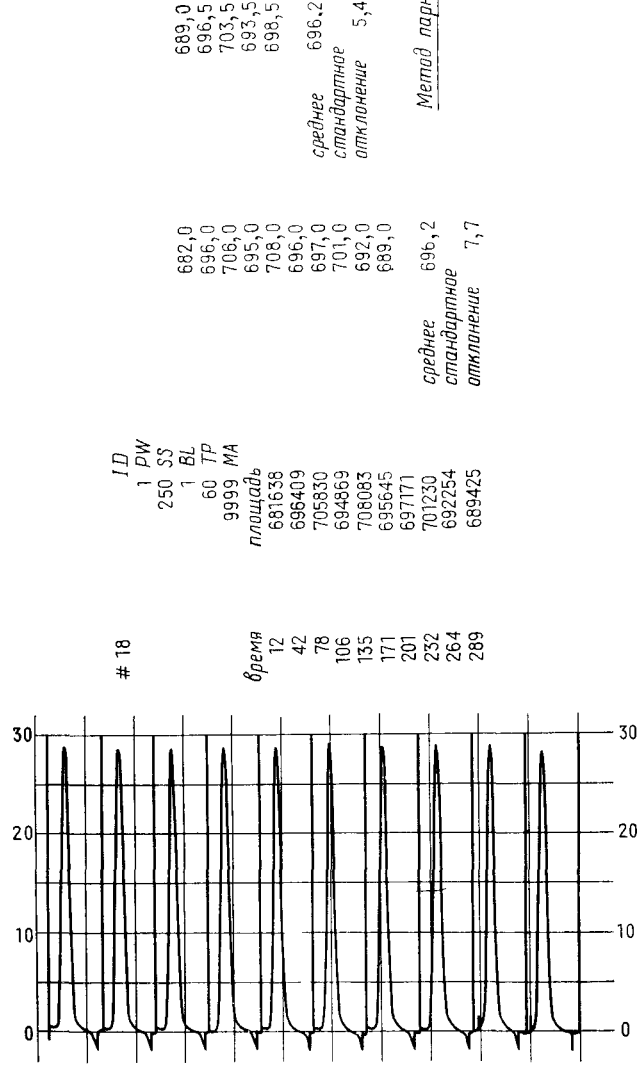


Рис. 8.16. Хромотограмма, диаграмма интегратора и настольной ЭВМ для определения стандартного отклонения при измерении флуоресценции по методу парных проб или без него.  
Воспроизводимость определяли для 10 пятен тиабензазола, каждое из которых содержало по 20 нг вещества. В ходе измерения использовались возбуждающее излучение с длиной волны 313 нм (ртутная лампа) и флуоресцентное излучение с длиной волны 355 нм (фильтр М 365).

### 8.5. Предварительная качественная оценка

Для идентификации веществ, детектированных по методу отражения или флуоресценции, результаты сканирования ТСХ-хроматограмм следует записывать в виде графиков. Это, конечно, осуществимо и для веществ, погло-

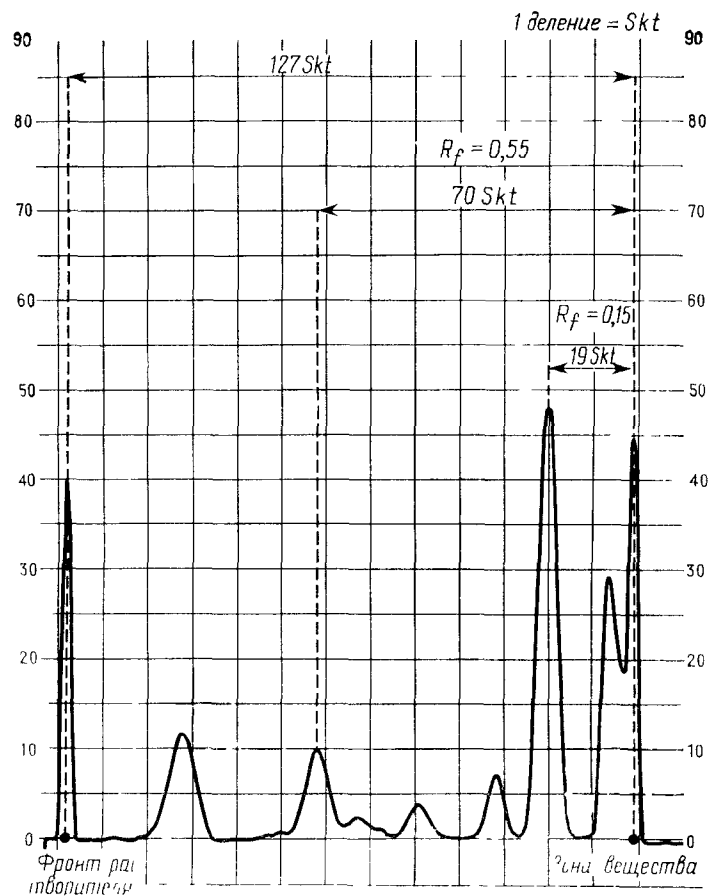


Рис. 8.17. Схема определения величин  $R_f$  непосредственно из хроматограммы.

щающих только в УФ-области. Величины  $R_f$  находят непосредственно из хроматограммы (рис. 8.17), определяя максимумы поглощения в методе отражения и максимумы возбуждения и испускания во флуоресцентных методах

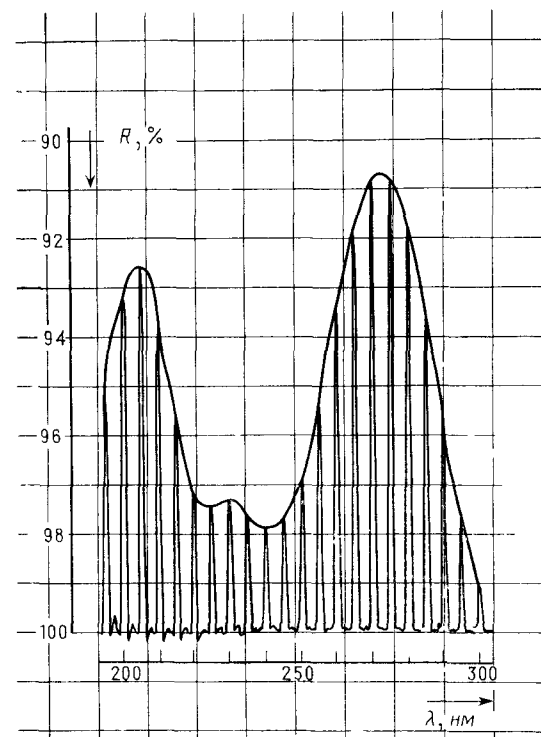


Рис. 8.18. Спектр поглощения при детектировании по методу отражения, отнесенный к фоновому сигналу, возникающему при сканировании пластинки без веществ; количество кофеина 80 нг;  $\lambda = 195-300$  нм.

(Рис. 8.18). Поскольку спектры веществ на хроматограммах и в растворах могут отличаться, после разделения на ТСХ-пластинке подчас необходимо проводить дополнительное исследование веществ как в растворе, так и в чистом виде.

### 8.6. Практические примеры

а) Количественное определение кофеина и фенацетина (рис. 8.19). Элюирование проводили смесью бензол — эфир — уксусная кислота (60 : 30 : 10). Длина пути разделения составляла 3 см, время разделения — приблизи-

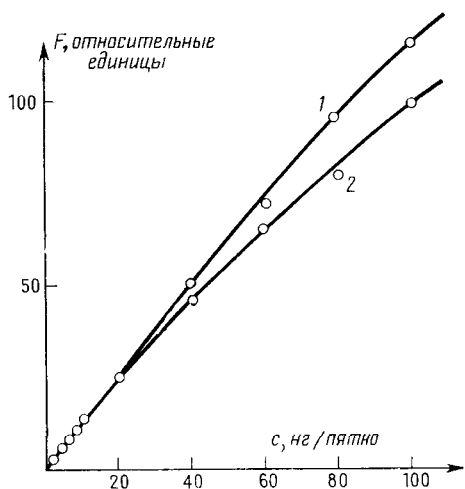


Рис. 8.19. Количественное определение кофеина и фенацетина; детектирование по методу отражения; для кофеина (1)  $\lambda = 275$  нм; для фенацетина (2)  $\lambda = 250$  нм.

тельно 5 мин. При детектировании измеряли интенсивность отраженного света. Для кофеина длина волны характеристического поглощения  $\lambda = 275$  нм, для фенацетина  $\lambda = 250$  нм.

б) Количественное определение содержания сорбиновой кислоты в вине (рис. 8.20). Разделение проводили в течение  $\sim 5$  мин на участке сорбента длиной 4 см, элюировали смесью толуол — этилацетат — хлороформ — муравьиная кислота в соотношении 25 : 13 : 10 : 2 [12]. При сканировании по методу отражения измеряли поглощение при  $\lambda = 262$  нм.

В ходе анализа белое или красное вино наносили на слой сорбента без специальной подготовки. При разделении не удавалось полностью отделить бензойную кислоту, что

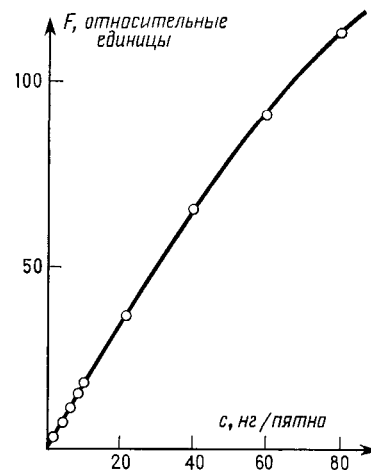


Рис. 8.20. Количественное определение сорбиновой кислоты; детектирование по методу отражения;  $\lambda = 262$  нм.

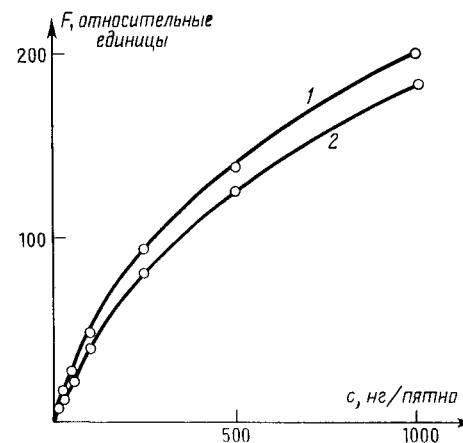


Рис. 8.21. Количественное определение глюкозы (1) и сахарозы (2); детектирование по методу одновременного отражения и пропускания;  $\lambda = 625$  нм.

не оказывало отрицательного влияния на результаты анализа, поскольку это соединение практически не поглощает при 262 нм.

в) Количественное определение сахарозы и глюкозы (рис. 8.21) проводили двукратным разделением в течение 40 мин. Длина пути однократного деления составляла 6 см. В качестве элюента использовали смесь дихлорэтана,

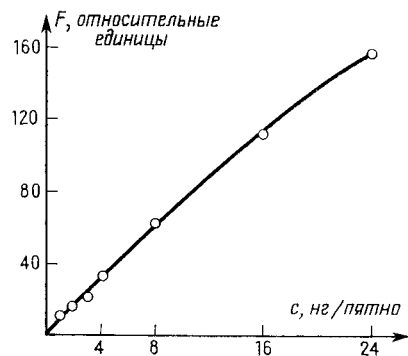


Рис. 8.22. Количественное определение сульфата хинина; детектирование по методу флуоресценции;  $\lambda_{\text{возб}} = 365$  нм (ртутная лампа);  $\lambda_{\text{исп}} = 460$  нм (фильтр FL43).

уксусной кислоты, метилового спирта и воды в соотношении 50 : 25 : 15 : 10 [3]. Для проявления пятен пластинку опускали в раствор, содержащий 2 мл анилина, 10 мл 85%-ной фосфорной кислоты, 2 г дифениламина и 10 мл метилового спирта. При проявлении путем опрыскивания окраска получается более неравномерной, в связи с чем увеличиваются фоновые помехи. В связи с небольшими размерами ВЭТСХ-пластинок для их окрашивания требуется относительно небольшое количество раствора. При сканировании измеряли интенсивность отражения или одновременно интенсивности отражения и пропускания при  $\lambda = 625$  нм.

г) Определение хинина в горькой минеральной воде (рис. 8.22) проводили приблизительно в течение 5 мин на участке длиной 4 см, используя в качестве элюента смесь бензол — диэтиловый эфир — дихлорметан — диэ-

тиламин в соотношении 20 : 20 : 20 : 8 [13]. Измерение флуоресценции осуществляли при длине волны возбуждающего излучения 365 нм (ртутная лампа), выделяя с помощью светофильтра FL43 длину волны флуоресцентного излучения, равную 460 нм. Пятна проявляли погружением пластинки в раствор, содержащий 95 мл диэтилового эфира и 5 мл концентрированной серной кислоты.

д) Определение тиабензазола в цитрусовых (рис. 8.23) проводили в течение приблизительно 5 мин на участке

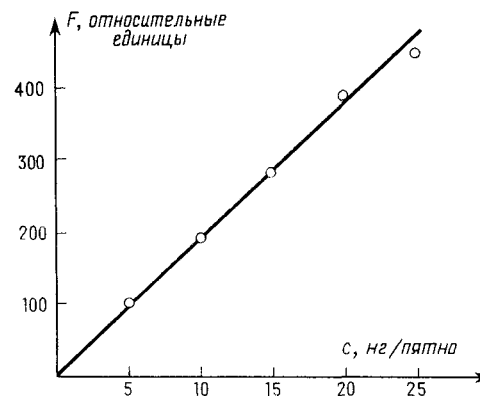


Рис. 8.23. Количественное определение тиабензазола; детектирование по методу флуоресценции;  $\lambda_{\text{возб}} = 313$  нм (ртутная лампа);  $\lambda_{\text{исп}} = 355$  нм (фильтр M365).

длиной 4 см. Элюентом служила смесь этилацетат — метилэтилкетон — муравьиная кислота — вода в соотношении 50 : 30 : 10 : 10 [10]. Интенсивность флуоресценции измеряли при длине волны возбуждающего излучения 313 нм (ртутная лампа) и длине волны испускания 355 нм, выделяемой фильтром M365 (рис. 8.23).

Тиабензазол, как известно, является исключительно чувствительным к свету [10, 14], однако при условиях эксперимента его фотохимического разложения не наблюдалось [10]. Формы пятен чистого вещества и пробы заметно отличались друг от друга, что приводило к искажению результатов при измерениях по методу отражения. При

измерениях по методу флуоресценции форма пятен не влияла на получаемые результаты [10].

е) Количественное определение афлатоксинов в экстракте земляного ореха (рис. 8.25) проводили методом двумерного разделения, поскольку в экстрактах содержится много флуоресцирующих примесей, которые можно

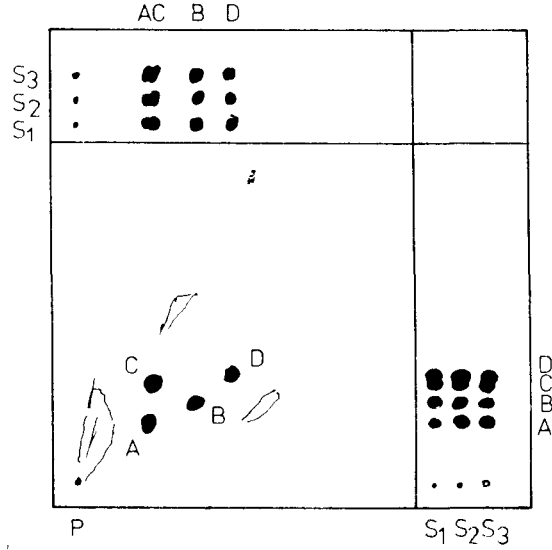


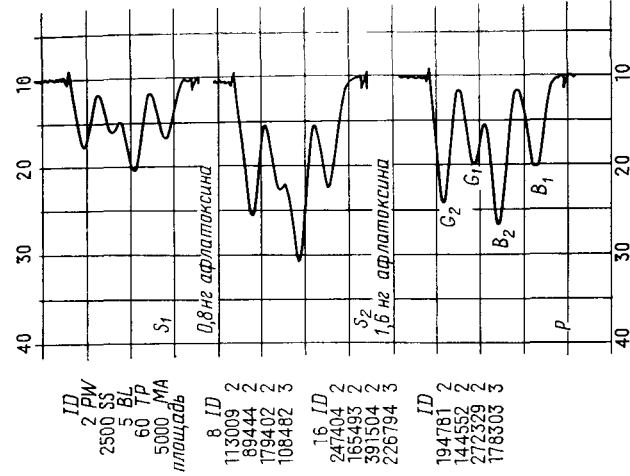
Рис. 8.24. Двумерная хроматограмма.

P — образец; S<sub>1</sub> — S<sub>3</sub> — стандартные смеси; A — D — компоненты.

отделить от афлатоксинов только двумерной хроматографией. Одномерное разделение афлатоксинов на ВЭТСХ-пластинке описано ранее [2].

В качестве элюента при разделении в первом направлении использовали смесь диэтилового эфира, метилового спирта и воды в соотношении 96 : 4,5 : 1,5, а при разделении во втором направлении — смесь хлороформа с ацетоном (90 : 10) [15]. В каждом направлении разделение проводили на участке длиной 8 см в течение 20 мин.

Детектирование осуществляли при длине волны возбуждающего излучения 365 нм (ртутная лампа) и длине



ID	λ <sub>ФЛ</sub>	λ <sub>ДСП</sub>
2500	35	5
5	BL	60
60	TP	5000
5000	МА	площадь
113009	2	8
89444	2	2
179402	2	2
106482	3	3
247404	2	16
165493	2	2
391504	2	2
226794	3	3
194781	2	ID
144552	2	2
272329	2	2
178303	3	3

#11	время
#10	27
33	33
38	38
46	46
#10	111
117	117
122	122
129	129
#10	315
322	322
328	328
336	336

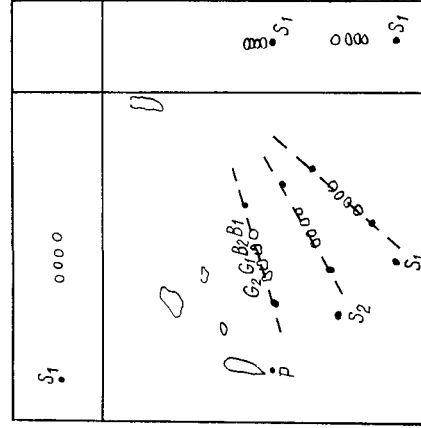


Рис. 8.25. Количественное определение афлатоксинов в экстрактах земляного ореха с помощью «анти-диагонального» метода. Детектирование по методу флуоресценции; λ<sub>возб</sub> = 365 нм (ртутная лампа); λ<sub>ДСП</sub> (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) = 450 нм (фильтр FL43). Воспроизведены акция ТС-хроматограммы, фрагмент диаграммы ленты интегратора и хроматограмма регистратора спектрофотометра.

волны флуоресцентного излучения для афлатоксина В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> 428 нм (выделена фильтром FL43) и для афлатоксинов G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub> 450 нм (выделена тем же фильтром).

В большинстве случаев пробы афлатоксинов определяли на одной пластинке со стандартами, разделенными в одном направлении (рис. 8.24). Однако в этом случае разность наклонов калибровочных графиков, соответствующих двумерному и одномерному разделению, достигала 15%, что обусловлено воздействием второго элюента при двумерном разделении на квантовый выход флуоресценции определяемого вещества. Чтобы предотвратить воздействие второго элюента, Белжаарс [15] предложил так называемый «антидиагональный» метод, основанный на элюировании определяемых и стандартных растворов идентичными растворителями на одних и тех же пластинках. Как показано на рис. 8.24, одну пробу и два стандарта наносят в левом углу пластинки не по диагонали. Для идентификации на участки сорбента, где проводят одномерное разделение, дополнительно наносят два стандарта. С помощью подобранного элюента примеси перемещают в верхнюю часть пластинки (рис. 8.24). Для количественной оценки участки позади и впереди фронта афлатоксинов при облучении УФ-светом следует отметить точками, которые помогают определить соответствующие участки сорбента на стадии сканирования фотометром. Количественные результаты представлены на рис. 8.25.

### 8.7. Требования к оборудованию для фотометрического детектирования ТС-хроматограмм

Выбор условий проведения ВЭТСХ-анализа направлен на получение оптимальных величин сигнала и воспроизводимости.

Оптимальная величина сигнала зависит от метода фотометрического детектирования, характеристик усилителя фотометра, уровня шума в электронной схеме фотометра и метода хроматографического разделения, включающего в случае необходимости операцию опрыскивания пятен разделенных веществ.

Оптимальная величина воспроизводимости зависит от метода фотометрического детектирования, точности функционирования механической системы сканирования, уровня электрических шумов в электронной схеме фотометра, воспроизводимости нанесения пробы и хроматографического разделения, включая в случае необходимости операцию проявления хроматограммы.

Исходя из этих условий, фотометр для сканирования ТС-хроматограмм должен удовлетворять ряду требований.

а) В его конструкции следует предусмотреть возможность быстрого настраивания на проведение нужного метода детектирования: в отраженном свете, в отраженном и проходящем свете (одновременно), флуоресценции.

б) Фотометр должен иметь монохроматор для того, чтобы оператор при решении очередной задачи мог выбрать соответствующую длину волны излучения и выделить участок спектра излучения веществ, находящихся на пластинке.

в) Механическая система фотометра должна быть точно отлажена для получения воспроизводимого сканирования проб.

г) Оптическая система должна быть тщательно отрегулирована, в электронных схемах с низким уровнем шума следует предусмотреть значительное усиление измеряемого сигнала.

д) Управление прибором должно быть простым и занимать мало времени.

Все виды количественного детектирования ТС-хроматограмм можно выполнять на спектрофотометре фирмы «Opton» КМ 3 (ФРГ), конструкция которого удовлетворяет всем перечисленным требованиям \* (рис. 8.26).

а) Простая система переключения позволяет переводить прибор в один из трех режимов сканирования без дополнительной настройки. Излучение вольфрамовой или дейтериевой лампы проходит через монохроматор и фокусируется апертурой на пятно пробы. Интенсивность отраженного света измеряют под углом 45° к плоскости пла-

\* Универсальные спектрофотометры для сканирования ТС-хроматограмм выпускает ряд фирм, в том числе «Camag» (Швейцария), «Shimadzu» (Япония), «Shoefel» (США), «Kont» (Англия). — *Прим. перев.*



стинки фотоумножителем. Для одновременного измерения интенсивности отражения и пропускания второй фотоумножитель укреплен со стороны подложки. Сигналы фотоумножителей, регистрирующих прошедший и отраженный свет, складываются. При измерениях интенсивности флуоресценции для возбуждения излучения в общем случае

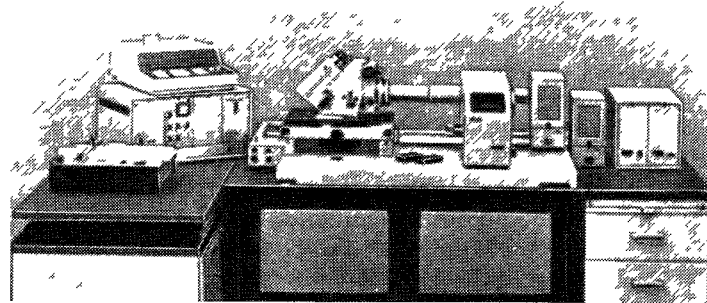


Рис 8.26 Внешний вид спектрофотометра фирмы «Opton» КМЗ для массовых измерений отражения, пропускания, одновременного измерения интенсивности отражения и пропускания, а также флуоресценции.

Справа наверху, источник питания лампы, на станине подставка для вольфрамовой, дейтериевой и ртутной ламп, монохроматор, промежуточные оптические устройства, оптическая головка со сканирующим устройством, индикаторная ячейка, интегратор и регистратор.

используют ртутную лампу, выделяя с помощью монохроматора линии ртути выше 254 нм. Между пятном и фотоумножителем установлены фильтры с широкой или узкой полосой пропускания, исключающие попадание в фотоумножитель возбуждающего излучения. В спектрофотометре, помимо этих основных блоков, предназначенных главным образом для проведения массовых анализов, имеется ряд приспособлений для изменения оптической

схемы в специальных случаях анализа. Для возбуждения флуоресценции можно также применять ксеноновую лампу. Схемы детектирования представлены в табл. 8.2.

б) В спектрофотометре фирмы «Opton» установлен кварцевый монохроматор в форме призмы с полосой пропускания при 185—2500 нм, предназначенный для измерений в УФ-области. Специальная водородная лампа с окошками из супрасила позволяет проводить измерения при длине волны ниже 200 нм без увеличения светового потока (как, например, в случае использования азотного источника) и без помех. Воспроизводимость спектра в отношении длины волны в видимой области излучения составляет менее 0,5 нм, а в УФ-области — менее 0,1 нм.

в) Столик для сканирования (рис. 8.27) хроматограмм с максимальным размером 20 × 20 см перемещается на подшипниках. Хроматограмму можно перемещать вручную в двух взаимно перпендикулярных направлениях ( $x$  и  $y$ ), а в продольном направлении ( $y$ ) — с помощью синхронного двигателя со скоростью 1—300 мм/мин. Воспроизводимость установки хроматограммы в обоих направлениях равна 0,1 мм, что особенно важно при количественном детектировании ВЭТС-хроматограмм. Столик для сканирования легко доступен со всех сторон, что облегчает установку любого участка хроматограммы в зоне определения. Последнее обстоятельство особенно важно при двумерном разделении. В направлении  $x$  и  $y$  столик имеет такие размеры, которые позволяют проводить быстрое и надежное детектирование двумерных хроматограмм.

г) Контур апертуры (щели) проецируется на хроматограмму. Площадь проекции (измеряемая площадь) не зависит от длины волны излучения. Длину апертуры можно ступенчато изменять от 3,5 до 14 мм. Теоретическая величина разрешения при сканировании изменяется от 0,01 до 2 мм. Ширину апертуры можно изменять от 3,5 до 6 мм. Новый спектрофотометр КМЗ снабжен быстродействующей электронной схемой на транзисторах с низким уровнем шума, и хотя сканирующий столик не защищен от воздействия внешних источников света, это не сказывается на его работе. Запас усиления превышает  $10^4$ . Чувствительность детектора настолько высока, что для измерения обычно используют один каскад усиления. В связи с этим изме-

Таблица 8.2

Аналитические возможности спектрофотометра фирмы «Orton»

Вид измерений	Область спектра, нм	Схема детектирования <sup>а</sup>	Принцип детектирования <sup>б</sup>
Количественные измерения ТС-хроматограмм и других проб, рассеивающих свет	185—800	Отражение М—Р	
С флуоресцентным индикатором или без него	325—800	Одновременное отражение и пропускание М—Р	
	185—2500 с исключением фоновой флуоресценции или флуоресценции пробы	Отражение Р—М	
Спектр отражения	185—800	Отражение М—Р	
Измерение поглощения в проходящем свете	185—800	Пропускание М—Р	
	185—2500	Спектрофотометр РМQ-3	

Продолжение табл. 8.2

Вид измерений	Область спектра, нм	Схема детектирования <sup>а</sup>	Принцип детектирования <sup>б</sup>
Измерение интенсивности флуоресценции	Возбуждение ртутной лампой при длине волны 254 нм до длины волны ксенонового источника; излучение проходит через экранирующие или монохроматические фильтры	Флуоресценция М—Р	
	Возбуждающее излучение ртутной лампы, начиная от 313 нм, прошедшее через монохроматор	Флуоресценция Р—М	

<sup>а</sup> М—Р (монохроматор — проба). Излучение источника первоначально рассеивается монохроматором и падает вертикально на пробу. При измерении интенсивности отражения и флуоресценции свет падает под углом 45°; при измерении интенсивности пропускания свет падает перпендикулярно плоскости пластинки. Р—М (проба — монохроматор). Схема облучения меняется на обратную, т. е. полихромное излучение (в случае необходимости можно использовать фильтры для выделения соответствующей области спектра) падает на пробу под углом 45°. Свет, отраженный в вертикальном направлении, проходит через монохроматор и направляется в детектор.

- <sup>б</sup>
- ⊗ вольфрамовая лампа
  - △ монохроматор с переменной длиной волны
  - ⊕ дейтериевая лампа
  - ⊞ монохроматический фильтр
  - ⊖ ртутная лампа
  - ⊞ экранирующий фильтр
  - ⊕ ксеноновая лампа
  - ⊕ фотоумножитель
  - ▭ проба
  - ⊕ фотоспротивление (ИК-детектор)
  - △ монохроматор

реемый сигнал может быть усилен в 20 раз. В отсутствие деления сигнала на аналоговом выходе разбаланс в 1 В вызывает отклонение стрелки на всю шкалу. Помимо реги-

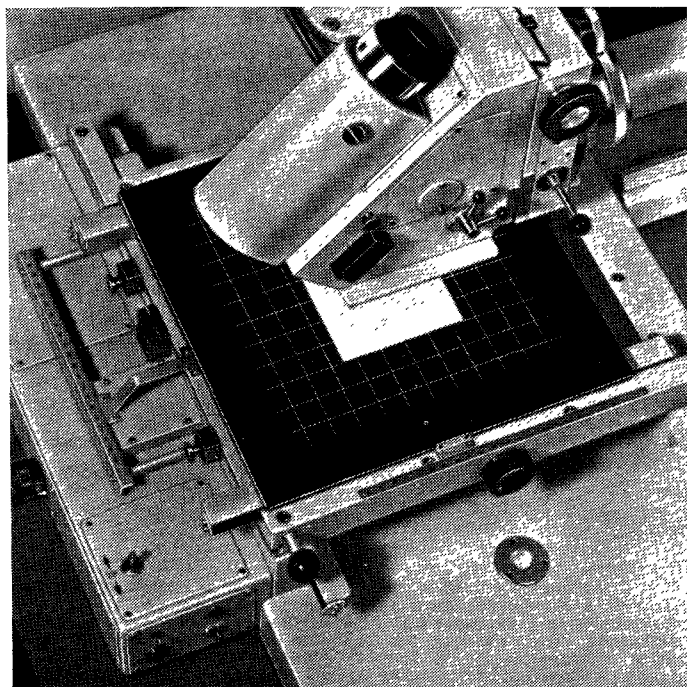


Рис. 8.27. Сканирующее устройство спектрофотометра фирмы «Orton» с ВЭТСХ-пластинкой.

стратора с диаграммой, детектор может быть непосредственно соединен с интегратором.

д) На индикаторном блоке удобно расположено несколько элементов управления (рис. 8.28). Перед проведением измерений автоматический блок усиления устанавливает нулевую линию на 100% шкалы или другой приемлемой величины. Точность контроля составляет 0,1%. Автоматическое усиление также облегчает выделение

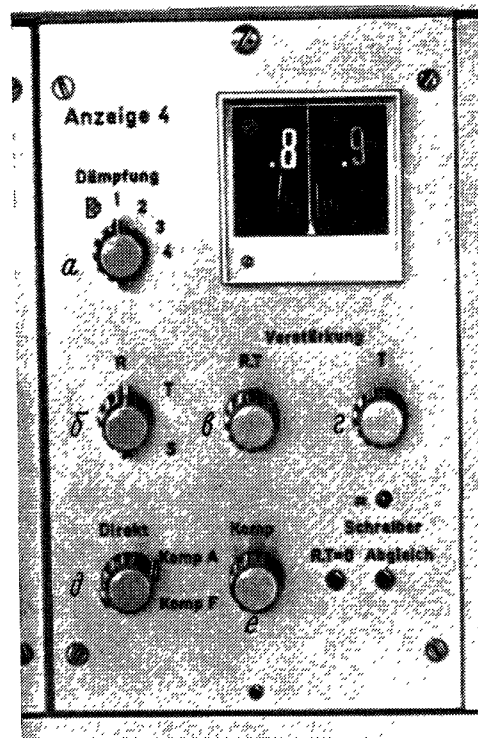


Рис. 8.28. Внешний вид индикаторной ячейки спектрофотометра фирмы «Orton» КМ 3. На крышке ячейки установлены следующие переключатели, считая слева сверху — вниз направо.

*a* — демпфирующий переключатель для гальванометра и аналогового выхода (нормальное положение 1 соответствует 0,7 с); гальванометр для тонкой регулировки траектории сканирования хроматограммы и установки соотношения  $f_R : f_T$  при одновременном измерении интенсивности отражения и пропускания; *b* — переключатель для перевода установки в режим измерения отражения, пропускания, одновременного измерения отражения и пропускания, измерения флуоресценции; *e* — переключатель потенциометра для установки относительной точки автоматического блока усиления (в общем случае 100%); *z* — переключатель потенциометра для регулирования соотношения  $f_R : f_T$ ; *e* — переключатель и потенциометр для преобразования данных.

спектра отражения (рис. 8.18). Количественные расчеты проводят по записи на ленте регистратора, по ширине пика на половине высоты или с помощью дискового интегратора. Чтобы ускорить, облегчить и сделать более наглядным

расчет площадей пиков, его следует выполнять на электронном интеграторе. Интегратор, связанный с установкой, характеризуется изменяемыми диапазонами интегрирования и поэтому обеспечивает отличную воспроизводимость даже при больших скоростях сканирования (для ВЭТСХ это обычно соответствует 30—120 мм/мин). Интегратор корректирует дрейф нулевой линии и наложение пиков. Работу интегратора можно программировать.

Измерения можно также выполнять с помощью модели ПМЧИ — предшественника электронного спектрофотометра КМ 3 [2]. Эта установка характеризуется такими же аналитическими возможностями, но при ее использовании управление всей системой становится менее удобным.

Автор благодарит мистера Шарфа за проведение экспериментов. Особую признательность хочется выразить доктору Таушу за подробное обсуждение вопросов, изложенных в этой главе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jork H., Z. anal. Chem., 236, 310 (1968).
2. Ripphahn J., Halpaap H., J. Chromatogr., 112, 81 (1975).
3. Jork H., GDCh-Kurs Saarbrücken, Okt. 1975.
4. Tausch W., Messtechnik, 2, 38 (1972).
5. Hezel U., Angew. Chem., 85, 334 (1973); Int. Edit., 12, 298 (1973).
6. Mazzola S., Hezel U., Bull. Chem. Farm., 113, 379 (1974).
7. Treiber L. et al., J. Chromatogr., 63, 211 (1973).
8. Jork H., J. Chromatogr., 82, 85 (1973).
9. Tausch W., Chimia, 23, 17 (1969).
10. Otteneder H., Hezel U., J. Chromatogr., 109, 181 (1975).
11. Bethke H., Santi W., Frei R. W., J. Chromatogr. Sci., 12, 392 (1974).
12. Rios V. M., Z. Lebensmittel-Unt. und Forsch., 147, 331 (1972).
13. Roder K., Eich E., Mutschler E., Pharm. Ztg., 115, 1430 (1970).
14. Ebel S., Herold G., Deut. Lebens.-Rundsch., 70, 133 (1974).
15. Beljaars P. R., Maastricht, частное сообщение.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ СОРБЕНТОВ В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ТСХ

Ж. Рипфан, Х. Халпаап

Ripphan J., Halpaap H., E. Merck, Darmstadt, BDR

ВЭТСХ-пластинки для нано-ТСХ, покрытые слоем силикагеля 60F-254, имеют размер пор, равный 60 Å. В обычных условиях хроматографического разделения на этих пластинках высота тарелки составляет 0,012 мм. Методики нанесения пробы и оценки результатов подобраны специально с учетом малых размеров хроматографической системы и более высокой эффективности пластинок фирмы «Мерск». Это позволяет количественно определить от 10 пг до 100 нг исследуемых веществ, поглощающих в видимой или УФ-областях спектра. Стандартные отклонения для отдельных значений концентраций изменяются в пределах 1—10% относит. Линии регрессии, соответствующие зависимости количества вещества от сигнала детектора, проходят через начало координат. Коэффициенты корреляции изменяются от 0,997 до 0,9999.

Установлено, что при коэффициенте разделения, превышающем 1,5, сканирование хроматограммы под прямым углом к направлению движения элюента характеризуется существенными преимуществами: повышенной чувствительностью детектирования при оптимальных длинах волн, меньшим временем измерения большего числа параметров и лучшей статистической обработкой результатов.

Исследования в области количественного детектирования веществ, разделенных на тонком слое сорбента, проводятся уже более 10 лет [1—3]. В результате были отработаны оптимальные методы нанесения проб, разделения и оптического сканирования. В настоящее время методом

денситометрии детектируют вещества со средней величиной поглощения (предел обнаружения до 100 нг). Предел обнаружения метода флуориметрии составляет 10 нг, а величина относительного стандартного отклонения приблизительно 2—10% [4—7]. Некоторое несовершенство методик компенсируют использованием специальных приемов. Например, изменение толщины слоя сорбента заметно влияет на результаты количественного анализа, особенно при измерениях по методу пропускания [4, 8, 9]. Если есть возможность проводить детектирование и по отражению, и по пропусканию, то предпочтение отдают методу измерения интенсивности отраженного света или методу, основанному на использовании одновременно обоих приемов [10—15]. Ошибки, связанные с изменением толщины слоя сорбента, можно также уменьшить проведением двухлучевого сканирования по двум траекториям лучей и сканирования вдоль одной траектории при двух чередующихся длинах волн.

Следует отметить, что изменения толщины слоя сорбента необходимо учитывать только в случае, когда длина пути разделения превышает несколько сантиметров. Уменьшение длины пути разделения приводит к улучшению результатов детектирования. Чтобы получить оптимальное разделение, изменяют длину пути разделения в соответствии с размерами частиц сорбента: меньшим размерам частиц соответствует меньшая длина пути разделения.

При использовании обычных высококачественных пластинок с закрепленным слоем силикагеля 60 на длине пути разделения  $\geq 100$  мм оптимальная высота тарелки достигает 0,040 мм. На ВЭТСХ-пластинках при анализе такого же количества вещества на длине пути разделения 40 мм оптимальная высота тарелки составляет 0,012 мм.

По сравнению с обычными ТСХ-пластинками уменьшение размеров ВЭТСХ-пластинок с закрепленным слоем не отражается на хроматографических характеристиках. Уменьшение длины пути разделения приводит к сокращению времени разделения на ВЭТСХ-пластинках. Уменьшение диаметра стартового пятна позволяет снизить предел обнаружения при детектировании. Разрешение на этих пластинках в 1,6 раза выше, а соответствующее число теоретических тарелок увеличивается в три раза.

Уменьшение размеров частиц сорбента приводит к возрастанию интенсивности отраженного света, поскольку измерение поглощения анализируемым веществом проводят в условиях, в которых закон Кубелки — Мунка [16] выполняется более строго, чем в классическом варианте ТСХ.

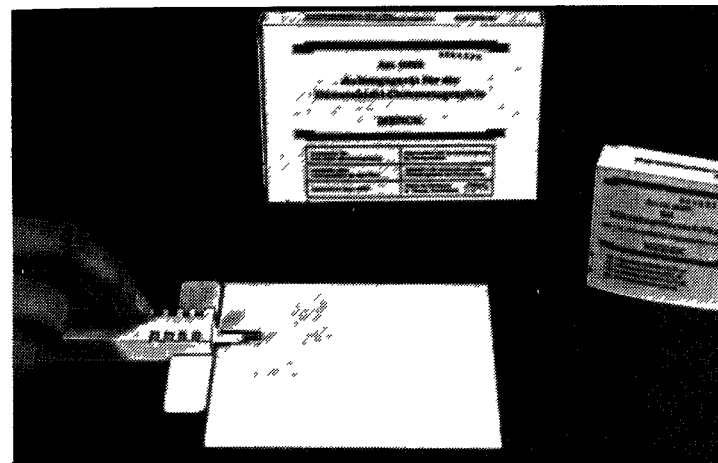


Рис. 9.1 Аппликатор для ТСХ.

На ВЭТСХ-пластинках пятна анализируемых веществ имеют меньшую площадь; следовательно, помехи, возникающие за счет неоднородной толщины слоя, снижаются, благодаря чему отношение сигнал/шум увеличивается. Такие характеристики, как высота тарелки, разрешение или число разделений, в значительной степени зависят от величины пробы. Известно, что, чем меньше проба, тем лучше разрешение.

Нанесение проб объемом до 100 нл проводят с помощью простого устройства, состоящего из микрокапилляра из стекла или металла или того и другого одновременно.

В ходе экспериментов авторы пришли к заключению, что пробы объемом до 5 мкл лучше всего наносить имеющимся в продаже шприцем на 1 мкл, соединенным с микро-

метром (рис. 9.2). В настоящее время методы быстрого и экономичного автоматического нанесения малых проб для массовых анализов еще только разрабатываются.

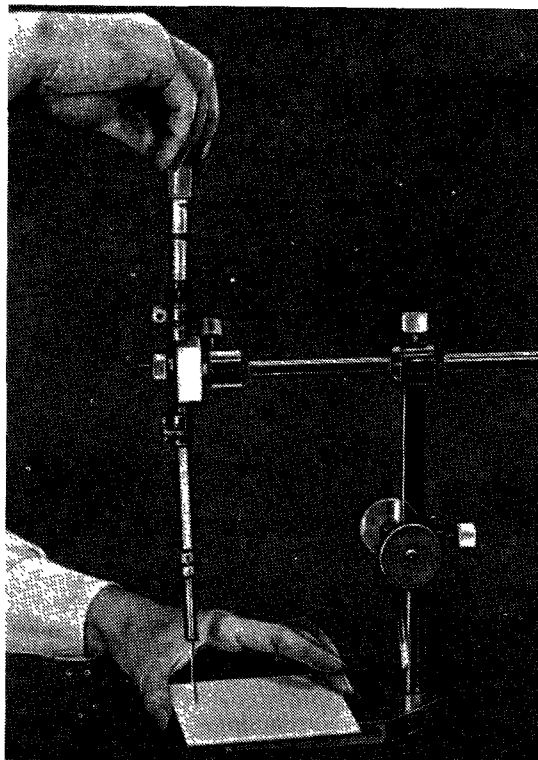


Рис. 9.2. Устройство для нанесения на ТСХ-пластинку нанолитровых проб.

В одной из таких разработок за основу взят имеющийся в продаже автоматический пробоотборник, используемый в газовой хроматографии. Диаметр стартового пятна  $b_0$  при нанесении проб малого объема не превышает 1 мм, а диаметры пятен после разделения не превышают 1—3 мм в зависимости от длины пути.

Для оценки качества слоя вначале необходимо оптимизировать продолжительную и не дающую точных результатов методику определения высоты тарелки и других представляющих практический интерес параметров. Выход-

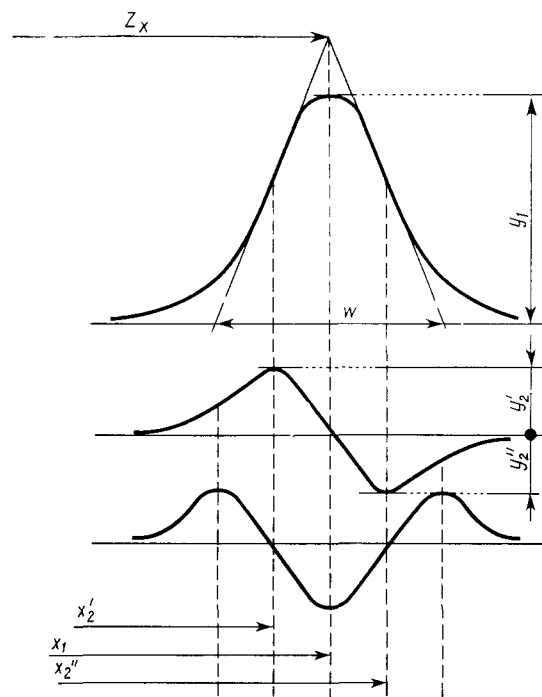


Рис. 9.3. Графики первой и второй производных изменения сигнала детектора.

ной сигнал аналогового преобразователя спектрофотометра (в данном случае РМQ II фирмы «Opton») поступает в управляющую процессом детектирования ЭВМ (IBM/7). ЭВМ записывает сигнал фотометра непосредственно или через специальный преобразователь и корректирует его применительно к дальнейшим расчетам с использованием функции Кубелки — Мунка.

### 9.1. Исходный сигнал, первая и вторая производные

Как показано на рис. 9.3, график, характеризующий первую производную, пересекает ось абсцисс в точке  $x_1$ , соответствующей максимуму пика. Линия, соответствующая второй производной, пересекает ось абсцисс в точках  $x'_2$  и  $x''_2$ , находящихся под точками перегиба;  $y'_2$  и  $y''_2$  связаны с наклоном касательных, проведенных к точкам перегиба. Первую и вторую производные для каждой точки кривой сигнала детектора рассчитывают в соответствующем приближении. Точки, в которых графики для вторых производных пересекают ось абсцисс, находятся под точками перегиба на каждой из двух сторон пика. Величина первой производной и высота сигнала связаны с положением касательных к точкам перегиба. Положение максимума пика во времени, т. е. длину пути  $Z_x$  пятна  $x$ , определяют по точке, в которой первая производная пересекает ось абсцисс.

Нулевую линию определяют в соответствии с обычными хроматографическими критериями. Ширину пика представляют как разность координат двух точек пересечения нулевой линии и касательных к точкам перегиба. Число теоретических тарелок, высота тарелки и разрешение двух соседних веществ рассчитываются по хроматограмме для каждого вещества, исходя из ширины пика  $w$  и длины пути разделения  $Z_x$ , и выдаются ЭВМ на перфоленте.

ЭВМ менее чем за 2 мин выдает высоту тарелки практически для любого числа пятен на хроматограмме. Приближенное стандартное отклонение высоты тарелки для десяти проб, нанесенных на одну пластинку в виде линий, составляет менее  $\pm 1,5\%$ . Такое же определение, выполненное вручную, занимает несколько часов, а получаемое при этом стандартное отклонение превышает  $\pm 10\%$  измеряемых величин.

Описанный выше метод позволяет определить разделительную способность через высоту тарелки и другие параметры, такие, как разрешение  $R$ , величины  $R_f$ , величины  $k$ , коэффициенты скорости. Полученные параметры используются для оценки разделения веществ и для контроля качества пластинок с закрепленным слоем в целом.

### 9.2. Количественные методы

В настоящем разделе описаны методы измерения интенсивности поглощения и отражения в видимой и УФ-областях спектра, а также способы оптимизации этих методов и их недостатки.

#### Выбор оптимальной длины волны

Обычно в элюционных хроматографических методах, например ГХ и КЖХ, количественное детектирование разделенных веществ производят в порядке уменьшения величин  $k$ .

Когда пятна двух следующих друг за другом веществ находятся на ТС-хроматограмме в непосредственной близости или перекрываются, а сами вещества характеризуются близкими максимумами поглощения или флуоресценции, целесообразно, чтобы направление сканирования совпадало с продольной осью хроматограммы. Однако при достаточно большом разрешении разделяемых веществ, т. е. при  $R > 1,5$ , хроматограммы лучше сканировать под прямым углом к направлению перемещения элюата.

Проиллюстрируем подбор оптимальной длины волны для сканирования при разделении на ВЭТСХ-пластинке смеси 7 липофильных красителей (в количестве по 10 нг каждого), используя в качестве элюента бензол. На рис. 9.5 представлены хроматограммы красителей: 1 — цереса фиолетового BRN; 2 — цереса черного G; 4 — интенсивно желтого 3G; 5 — органаола голубого VIF; 6 — цереса красного G; 7 — цереса коричневого BRN, полученные сканированием при длине волны 420 нм (нижняя кривая), 500 нм (средняя кривая) и 580 нм (верхняя кривая).

Во многих случаях максимумы поглощения разных веществ могут не совпадать. При сканировании в направлении продольной оси хроматограммы всегда приходится выбирать интервал длин волн, подходящий для количественной оценки одновременно всех разделенных веществ. Это обусловлено тем, что на имеющемся оборудовании в ходе измерений нельзя изменять длину волны излучения. Сканирование в направлении, перпендикулярном продольной оси хроматограммы, позволяет подобрать оптимальную

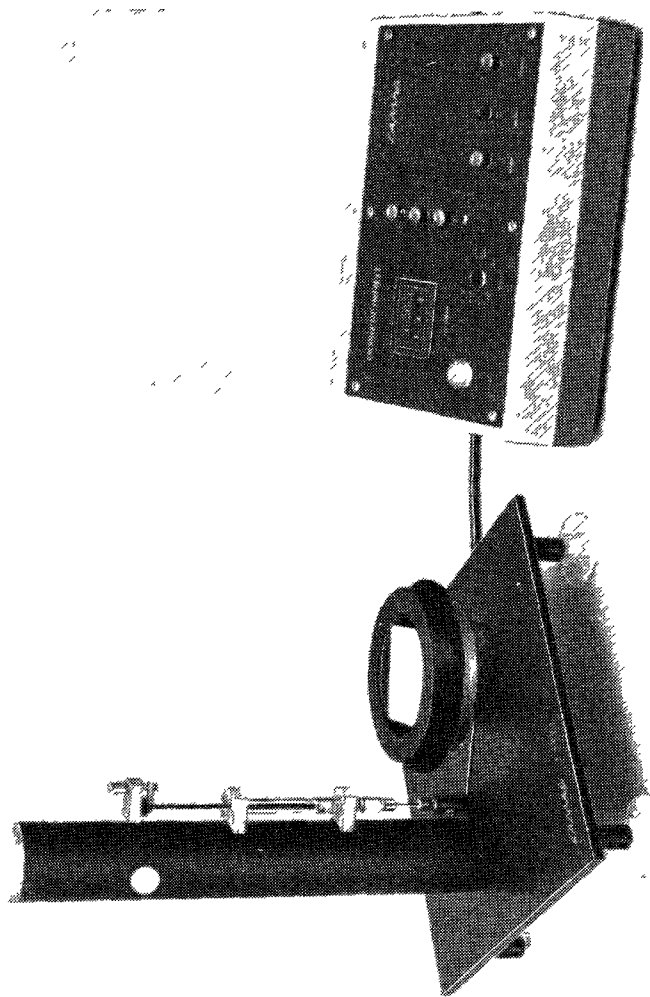


Рис. 9.4. Внешний вид установки для ВЭГХ-анализа фирмы «Самар».



длину волны для каждого вещества и таким образом добиться максимальной чувствительности\*.

Второе преимущество этого способа сканирования — возможность точного определения интенсивности света, отраженного участком поверхности слоя сорбента, не содержащего вещества, в непосредственной близости от пятна и сбоку от траектории движения разделяемой пробы.

При этом условии нулевой сигнал поддерживается постоянным, что важно для точного определения нулевой линии. Описываемый метод сравним только с методом двухлучевого сканирования в направлении движения элюата. Однако в последнем отсутствует возможность оптимизации длины волны излучения, что ведет к повышению предела обнаружения.

Третье преимущество способа сканирования в направлении, перпендикулярном продольной оси хроматограммы, состоит в высокой скорости измерений. Как показано на рис. 9.6, с помощью одного устройства можно определить компоненты 35 проб на пластинке шириной 10 см. При сканировании 70 проб голубых красителей на пластинке шириной 20 см в указанном направлении ширина полосы, в пределах которой происходит разделение пробы, не превышала 2,5 мм. Детектирование проводили при 420 нм со скоростью 30 мм/мин при размерах апертуры  $1,8 \times 0,7$  мм.

В качестве второго примера можно привести хроматограмму (запись на диаграммной ленте электронного интегратора) и соответствующие линии регрессии, построенные с учетом и без учета разброса значений сигнала, используемого при статистической обработке результатов (рис. 9.7). Сканирование зон гидрокортизона с содержанием вещества 20 и 50 нг проводили на ТСХ-пластинках при длине волны 242 нм, размерах апертуры  $2,0 \times 0,7$  мм со скоростью 30 мм/мин. В качестве интегратора исполь-

---

\* Представляются перспективными метод зигзагообразного сканирования с двумя переменными длинами волн (см., например, *Hamamoto H., Kurita T., Suzuki J., Hira R., Nakano K., Makabe H., Shibata K., J. Chromatogr., 116, № 1, 1976, 21*) и метод сканирования, положенный в основу установки фирмы «Kont» — *Прим. перев.*

зовали автоматический лабораторный минигратор фирмы «Spectra-Physics».

Гидрокортизон определяли вместе с эстрогенами, причем их зоны находились рядом. Гидрокортизону соответствовала оптимальная длина волны 242 нм, эстрогену — 225

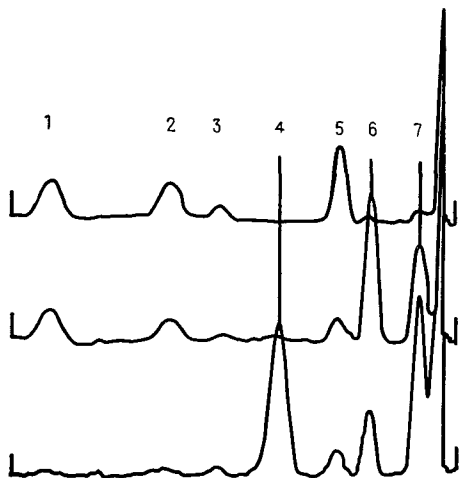


Рис. 9.5. Хроматограммы, полученные при сканировании ВЭТСХ-пластинок, с разделенными на них смесями красителей при трех длинах волн.

и 280 нм. При сканировании в направлении, перпендикулярном оси хроматограммы, предел обнаружения составлял  $8 \times 10^{-10}$  г (0,8 нг), а в направлении вдоль оси хроматограммы —  $1,3 \times 10^{-10}$  г, т. е. был приблизительно в шесть раз меньше. На диаграмме легко заметить соответствующую разницу. Причина понижения предела обнаружения связана с понижением фоновых шумов (рис. 9.8).

Предел обнаружения рассчитывают по уравнению, предложенному Кайзером [19]:

$$I - U \geq 3 \cdot \sqrt{2 \cdot s_0},$$

где  $I$  — величина сигнала;  $U$  — величина сигнала, получаемая при измерении в том же самом месте чистого слоя

сорбента;  $I - U$  — предел обнаружения;  $s_0$  — стандартное отклонение холостых определений в измеряемой точке

Аминокислоты обычно нельзя детектировать фотометрическим методом. Поэтому до или после разделения с помощью соответствующих химических реакций их превращают в поглощающие или флуоресцирующие вещества.

Под действием нингидрина аминокислоты переходят в производные, поглощающие излучение видимой области спектра. Соединения, флуоресцирующие в УФ-области,

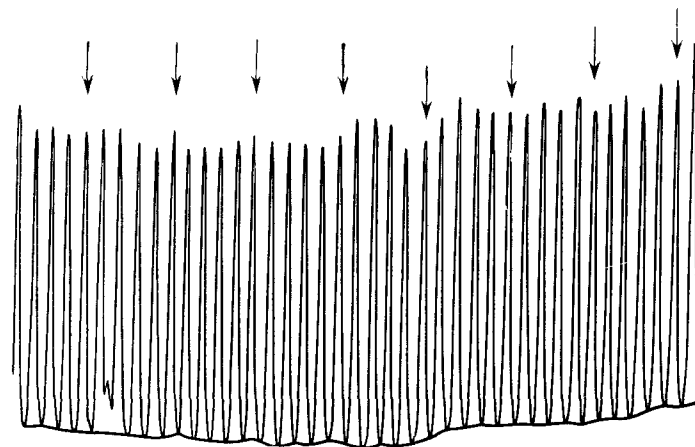


Рис. 9.6. Хроматограмма 35 проб, нанесенных на участок сорбента длиной 10 см.

получают с помощью флуэсцина — смеси *o*-фталевого альдегида и моноглицоля в буферном растворе [17, 18]. Оба продукта имеют приблизительно одинаковые пределы обнаружения, равные 0,1 нг. Для получения удовлетворительной воспроизводимости результатов детектирования содержание вещества в зоне должно быть не менее 1 нг.

Фенилаланин можно детектировать после нанесения непосредственно на пластинку разбавленной сыворотки или плазмы капилляром емкостью 200 нл. Вместе с сывороткой несколько раз вводят фенилаланин в патологических пределах, соответствующих содержанию этой аминокислоты.

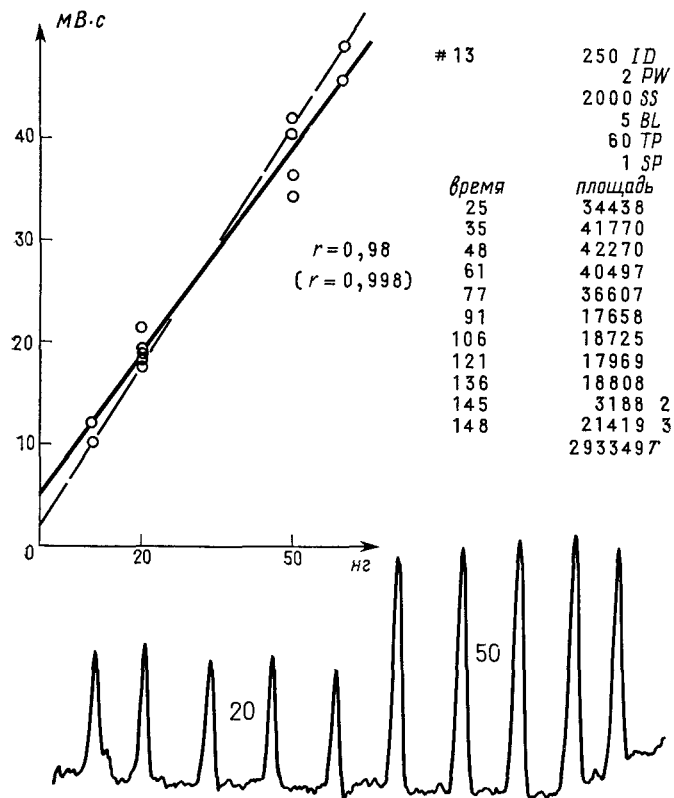


Рис. 9.7. Калибровочный график, хроматограмма и фрагмент диаграммной ленты ЭВМ, полученные при сканировании зон гидрокортизона, содержащих по 20 и 50 нг вещества, в направлении, перпендикулярном продольной оси хроматограммы.

кислоты при заболеваниях фенилкетонурией. При таком высоком содержании фенилаланина легче использовать ВЭТСХ-пластинки (рис. 9.9).

Для того чтобы установить, не нарушится ли линейность калибровочного графика зависимости величины сигнала от концентрации при увеличении количества пробы, анализировали последовательно 20 пг — 10 нг родамина В, который после облучения сильно флуоресцирует. Было

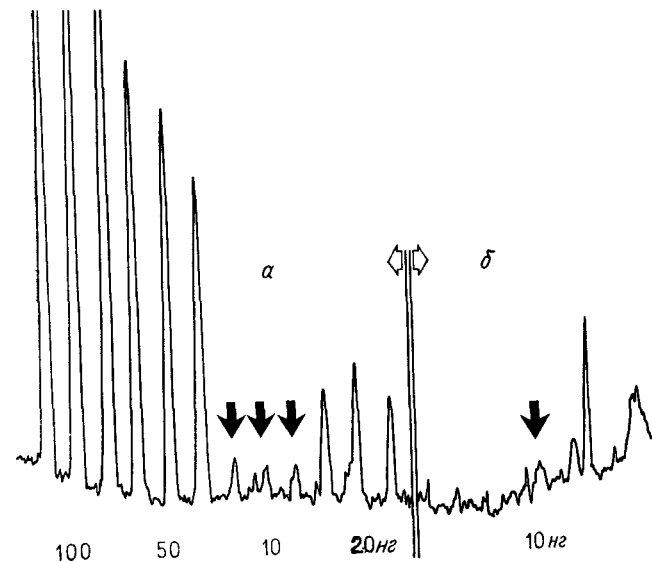


Рис. 9.8. Хроматограммы, полученные в результате детектирования зон гидрокортизона, содержащих по 10 нг вещества.  $\alpha$  — в направлении, перпендикулярном продольной оси хроматограммы;  $\beta$  — в направлении, параллельном этой оси.

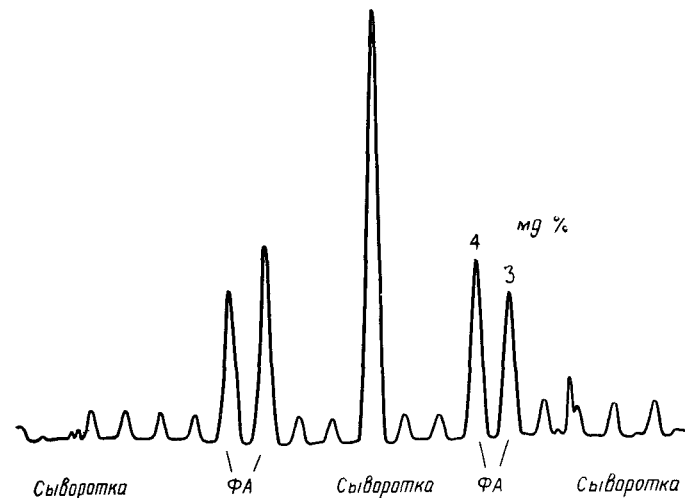


Рис. 9.9. Хроматограмма определения фенилаланина в крови.

Количественная оценка графика с использованием родамина В

Количество родамина В	Стандартное отклонение, %		n'	r'	a'	b'	n	r	a	b
	сканирование вдоль оси хроматограммы	сканирование в направлении, перпендикулярном продольной оси хроматограммы								
10 нг	±3,9	±2,9	14	0,9999	4,383	+0,07	6	0,997	4,386	+0,07
5	±2,6	±2,7								
2	±10,2	±10,1	14	0,9998	4,502	+0,29	6	0,998	4,507	+0,27
100 нг		±5,0	16	0,9988	4,183	-0,91	6	0,985	4,027	-0,18
50		±15,8								

Обозначения. r — коэффициент линейной корреляции; a — градиент линии регрессии; b — точка пересечения линии регрессии с осью координат (при r = 1,000 получается теоретическая калибровочная линия, не встречающаяся на практике); n' — число отдельных измерений одной и той же величины; n — число параллельных измерений. При 2 нг и 20 нг объем пробы составил 20 нл, и поэтому приближенное относительное стандартное отклонение относительно велико.

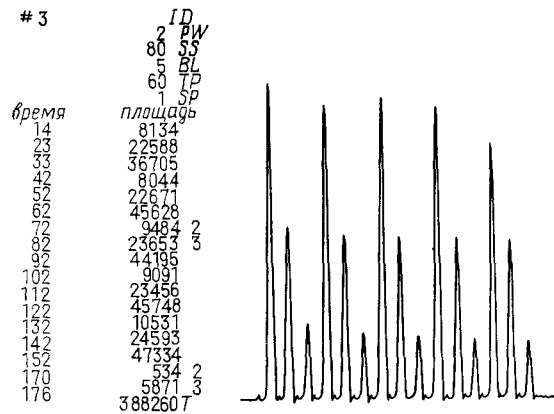


Рис. 9.10. Фрагмент диаграммной ленты ЭВМ и соответствующая хроматограмма, полученная при сканировании зон родамина В.

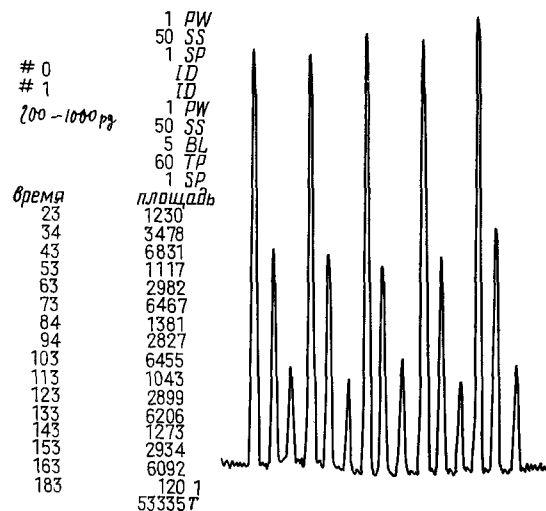


Рис. 9.11. Фрагмент диаграммной ленты ЭВМ и соответствующая хроматограмма, полученная при сканировании зон родамина В.

обнаружено, что 6% полученных значений соответствовали отклонению от линейности; их можно достоверно отнести к неточностям, возникающим при нанесении проб. В соответствии с рекомендациями применения статистических методов эти значения исключались. Результаты,

# 6	ID
Ср. пале 3,5/07	1 PW
	30 SS
2с - мес Р8	5 BL
	60 TP
	1 SP
время	площадь
8	19
27	1443
38	445
44	111 2
47	265 3
53	44 2
57	1503 2
59	196 3
67	685
72	434
76	142
86	1512 2
92	31 2
95	859 3
106	336 2
112	66 2
117	1464 3
127	619
133	56 2
137	276 3
147	1385 2
151	48 2
153	123 2
157	795 3
167	325
182	176
	133587

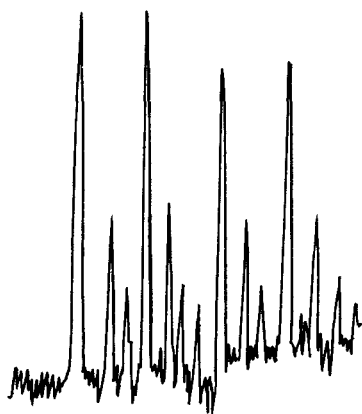


Рис. 9.12. Фрагмент диаграммной ленты ЭВМ и соответствующая хроматограмма, полученная при сканировании зон родамина В.

представленные на рис. 9.10—9.12, основаны на калибровочной линии, проходящей через начало координат и представляющей линейную зависимость с коэффициентом регрессии, равным 0,9997 (рис. 9.13).

Как видно из табл. 9.1, результаты, полученные при сканировании как вдоль, так и поперек хроматограммы, характеризуются одинаковой воспроизводимостью и точ-

ностью, однако во втором случае предел обнаружения значительно ниже. К тому же при сканировании в направлении, перпендикулярном продольной оси хроматограммы, время детектирования значительно меньше, поскольку в этом случае апертуру настраивают только один раз вместо четырнадцати, как это необходимо для других слу-

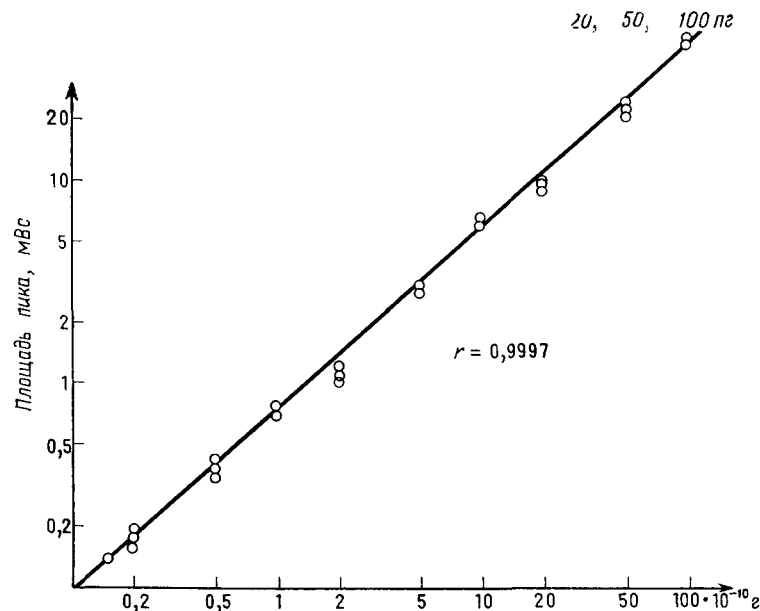


Рис. 9.13. Калибровочный график, построенный после сканирования ТС-хроматограмм (рис. 9.10—9.12) родамина В.

чаев. Как показали эксперименты, предел обнаружения родамина В составлял  $6 \cdot 10^{-13}$  г.

Афлатоксины  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $G_1$  и  $G_2$  разделяли на ВЭТСХ-пластинке двукратно смесью хлороформ — ацетон (90 : 10). Для построения калибровочной кривой использовали пробы с содержанием вещества 200, 500 и 1000 пг. На пластинке шириной 10 см размещали 24 пробы, что позволяло проводить восьмикратное определение каждой пробы. Весь цикл операций: нанесение проб, разделение, измерение

и количественная оценка — занимал около одного часа. Три из 24 полос представлены на рис. 9.14. Предел обнаружения афлатоксинов был равен 10 нг. Линия регрессии проходила через начало координат; коэффициент корреляции во всех случаях превышал 0,9987. Таким образом,

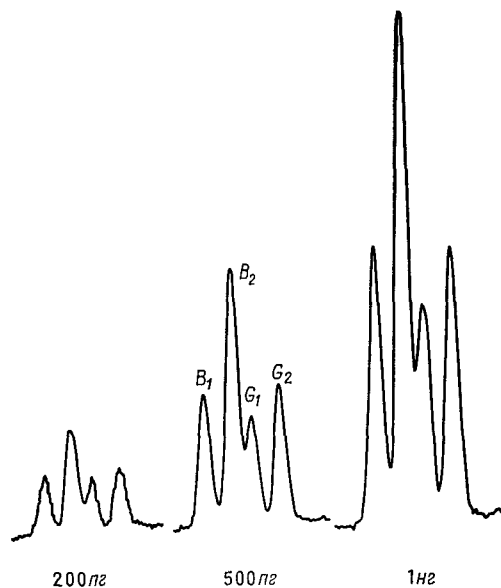


Рис. 9.14 Хроматограммы смесей афлатоксинов (исследовано 24 образца).

Получены при длине волны возбуждающего излучения 366 нм, детектируемого излучения 460 нм, размерах апертуры  $3,5 \times 0,7$  мм и скорости сканирования 30 мм/мин.

Разделение проводили на ВЭТСХ-пластинках в *N*-камере с насыщенной атмосферой смесью хлороформ — ацетон (90 : 10 по объему) дважды на пути разделения длиной 70 мм.

в исследованных пределах существовала линейная зависимость между интенсивностью флуоресценции и количеством вещества в зоне.

Данные, приведенные в табл. 9.2 и рис. 9.14, относятся к определению афлатоксинов. Из них следует, что анализ нанogramмовых количеств веществ на ВЭТСХ-пластинках можно осуществить с высокой точностью. На примере смесей кра-

Таблица 9.2

Результаты сканирования хроматограммы с афлатоксинами

Афлатоксин	Приближенное относительное стандартное отклонение, %			$n'$	$r'$	$a'$	$b'$	$n$	$r$	$a$	$b$
	количество вещества, нг										
	1000	500	200								
$B_1$	$\pm 2,5$	$\pm 3,0$	$\pm 12,5$	22	0,9987	1,74	+0,04	6	0,997	1,78	-0,27
$B_2$	$\pm 1,5$	$\pm 3,2$	$\pm 3,5$	24	0,9995	3,27	+0,65	6	0,998	3,39	+0,13
$G_1$	$\pm 3,6$	$\pm 4,1$	$\pm 9,1$	24	0,9998	1,286	+0,27	6	0,998	1,28	+0,38
$G_2$	$\pm 2,4$	$\pm 4,5$	$\pm 7,0$	23	0,9998	1,795	-0,29	6	0,992	1,756	+0,13

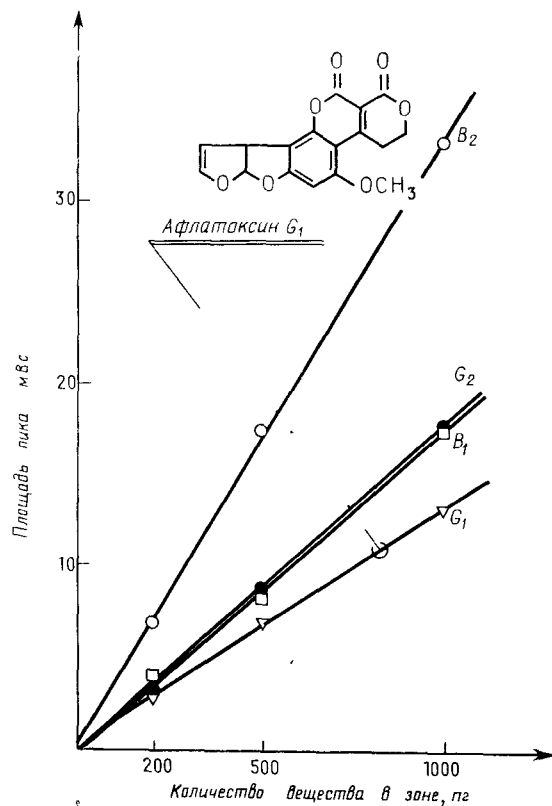


Рис. 9.15. Калибровочный график для детектирования смесей афлатоксинов и структура афлатоксина  $G_1$ .

сителей, содержащих микрограммовые количества вещества, этого проиллюстрировать нельзя.

Стандартные отклонения для отдельных проб объемом 100 нл, содержащих 1000 пг вещества, заключены между  $\pm 1,5$  и  $\pm 3,6\%$ . Для проб объемом 20 нл с содержанием вещества 200 пг стандартные отклонения изменяются от  $\pm 3,5$  до  $\pm 12,5\%$ .

Можно ожидать, что проведение 24 измерений по 8 измерений каждой зоны с одинаковым содержанием вещества

позволяет получить более высокий коэффициент корреляции, чем в случае измерения 6 соседних полос с двукратным определением аналогичных зон. Характер калибровочного графика, проходящего через начало координат, практически сохраняется. Для достижения соответствующей точности достаточно построить калибровочный график по двум определениям для каждой концентрации, проведенным с необходимой точностью. Для аналитических определений на ВЭТСХ-пластинки можно наносить от 18 до 20 проб.

Наши дальнейшие исследования будут направлены на упрощение методик анализа, например с помощью предварительной препаративной очистки непосредственно на ВЭТСХ-пластинках, и на увеличение чувствительности детектирования, возможно, с помощью химических реакций на пластинке.

Вероятно, что в недалеком будущем пределы обнаружения некоторых классов соединений будут снижены до фемтограммовых количеств ( $10^{-14}$ ), как это было постепенно достигнуто в анализе веществ с радиоактивными метками.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Соотношения между  $R_f$ ,  $R_{fкр}$  и  $k$

$R_{fкр}$	$R_f$	$k$	$R_{fкр}$	$R_f$	$k$
0,1	0,01	99	0,60	0,36	1,8
0,14	0,02	49	0,62	0,38	1,6
0,17	0,03	32,3	0,63	0,40	1,5
0,20	0,04	24	0,65	0,42	1,38
0,22	0,05	19	0,66	0,44	1,27
0,25	0,06	15,7	0,68	0,46	1,17
0,26	0,07	13,3	0,69	0,48	1,08
0,28	0,08	11,5	0,71	0,50	1
0,30	0,09	10,1	0,72	0,52	0,92
0,32	0,1	9	0,73	0,54	0,85
0,35	0,12	7,3	0,75	0,56	0,79
0,37	0,14	6,1	0,76	0,58	0,72
0,40	0,16	5,3	0,77	0,60	0,67
0,42	0,18	4,6	0,81	0,65	0,54
0,45	0,20	4	0,84	0,70	0,43
0,47	0,22	3,6	0,87	0,75	0,33
0,49	0,24	3,2	0,89	0,80	0,25
0,51	0,26	2,9	0,92	0,85	0,18
0,53	0,28	2,6	0,95	0,90	0,11
0,55	0,30	2,3	0,97	0,95	0,05
0,57	0,32	2,1	1	1	0
0,58	0,34	1,9			

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Активность слоя 84, 114, 128, 158  
 Анализ следов 83  
 Атмосфера в камере 80, 85, 153
- Величина  $R_f$  18  
 взаимосвязь в линейной и круговой ТСХ 33, 77  
 зависимость от длины пути разделения 30, 124  
 исправленная, истинная 21, 25, 154  
 определение 17  
 при эксцентрическом дозировании 33
- Влажность, влияние на хроматографические параметры 80, 129, 160
- Воспроизводимость 151, 193  
 величины  $R_f$  84  
 —  $R_{fкр}$  33, 84
- Время разделения 87, 115, 143  
 зависимость от длины пути разделения 126  
 — коэффициент скорости 126
- Время удерживания 18, 40  
 Высота тарелки  
 зависимость от длины пути разделения 39, 124
- зависимость от разрешения 123  
 — — эффективности разделения 40  
 истинная 39, 40  
 теоретическая 39  
 эффективная 39, 40
- ВЭТСХ  
 круговая 61  
 непрерывная 171  
 преимущества 143  
 сочетание с ГХ 94  
 — — другими системами 99  
 — — КЖХ 94
- Гашение флуоресценции 187
- Градиент  
 условий 38  
 элюента 72, 87  
 — влияние на разделение 74, 79
- Детектирование  
 опрыскиванием 85  
 предел обнаружения 152  
 спектрофотометрическое 86
- Динамическая область 82



- Диффузия**  
 зависимость от длины пути  
 разделения 50  
 поперечная 59  
 продольная 59  
 трехмерная диффузионная  
 модель 58
- Длина пути разделения** 25, 42  
 в круговой ТСХ 35  
 влияние на площадь зоны 37  
 — — высоту тарелки 39,  
 119  
 — — число разделений 39
- Зона**  
 диаметр 176  
 элюирование 175
- Измерение**  
 флуоресценции 191  
 фотометрическое 208  
 — по отражению 188  
 — — отражению и пропу-  
 сканию 181, 185  
 — — пропусканию 183
- Камеры для ТСХ**  
 F-камера 95  
 L-камера 32  
 N-камера 32  
 U-камера 90  
 камера Vario KS 129, 156
- Колоночная жидкостная хро-  
 матография** 79, 152
- Коэффициент**  
 емкости 18, 20  
 скорости 115, 124
- Нанесения проб методы**  
 в виде полос 69, 82  
 на смоченный сорбент 96  
 объем дозирования 102
- определение величины  $Q_D$   
 44, 105  
 соотношение с толщиной  
 слоя 145  
 сравнение 42  
 эксцентрическое 114, 141
- Область разделения** 77  
**Объем подвижной фазы** 23  
 определение 25  
 при постоянном потоке 25  
**Объем пробы, зависимость от  
 толщины слоя** 102, 145  
**Отношение фаз** 27
- Парных проб метод** 182  
**Пластинки**  
 насыщение в газовой фазе 85  
 отмывка 84  
 подготовка 84
- Поток**  
 непрерывный 21  
 сопротивление 23, 127  
 функция 21, 22, 28  
 экспериментальное иссле-  
 дование 21
- Разделение**  
 емкость 82  
 предварительное 68
- Размывание** 47
- Разрешение** 41, 53, 76
- Растворитель**  
 выбор 128  
 хроматографические и физи-  
 ческие параметры 125,  
 146, 147  
 фронт 24
- Селективность** 41, 60, 76, 155
- Сорбент**  
 влияние на размывание 121  
 общий объем 145

- предварительное насыще-  
 ние 160  
 стационарная фаза 158  
 толщина слоя 50, 117
- Сравнение линейной и круговой  
 ТСХ** 75, 140
- Температура, влияние на хро-  
 матографические параметры** 48
- Уравнение ТСХ** 44
- Фокусировка исходных пятен**  
 59, 95
- тепловая 109  
 химическая 111
- Число разделений** 47, 75  
 определение 35  
 расчет в линейной ТСХ 48  
 — — круговой ТСХ 53
- Число тарелок**  
 истинных 40, 75  
 эффективных 117
- Ширина стартового пика** 47
- Эффективность разделения** 126,  
 140

	2.4. Определение числа разделений в круговой ТСХ	53
	2.5. Замечания	58
Глава 3. ПРЕИМУЩЕСТВА, ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И НЕДОСТАТКИ КРУГОВОГО МЕТОДА РАЗДЕЛЕНИЯ. Ж. БЛОМ		
	3.1. Краткий исторический обзор	61
	3.2. Условия проведения разделения круговым методом	62
	3.3. Рабочая методика в круговой хроматографии	63
	3.3.1. Подвод элюента снизу	64
	3.3.2. Нанесение пробы	66
	3.3.3. Предварительное разделение	68
	3.3.4. Разделение кольцевых зон	69
	3.3.5. Подвод элюента сверху	70
	3.3.6. Градиентное элюирование	72
	3.4. Сравнение линейного и кругового методов ТСХ	75
	3.4.1. Число тарелок, число разделений, число разделений/время = производительность разделения	75
	3.4.2. Разрешение, селективность, использование области разделения	76
	3.4.3. Соотношение между $R_f$ и $R_{f\text{кр}}$	77
	3.4.4. Влияние градиента	79
	3.4.5. Уменьшение давления паров	80
	3.4.6. Эффект движения элюента вокруг зоны	82
	3.5. Емкость разделения, динамическая область, анализ следов	82
	3.5.1. Динамическая область	82
	3.5.2. Анализ следов	83
	3.6. Воспроизводимость величин $R_f$ и $R_{f\text{кр}}$ , влияние качества пластинки	84
	3.7. Влияние паров растворителей	85
	3.7.1. Детектирование, количественная оценка	85
	3.7.2. Применение градиента состава элюента	87
	3.7.3. Длительность разделения	87
	3.7.4. Требования к материалам	88
	3.7.5. Площадь, необходимая для проведения анализа, возможности ручных операций, разное	88
Глава 4. U-КАМЕРА. Р. Е. КАЙЗЕР		
	4.1. Преимущества использования U-камер в ТСХ	93
	4.2. Недостатки обычной U-камеры в ТСХ	95
	4.3. Заключение	96
Глава 5. МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ПРОБЫ В ВЭТСХ-СИСТЕМУ. Р. Е. КАЙЗЕР		
	5.1. Предварительная оптимизация нанесения пробы	102
	5.2. Объем дозирования	102
СОДЕРЖАНИЕ		
Предисловие редактора перевода		5
Предисловие и введение		9
Список литературы		15
Глава 1. УПРОЩЕННАЯ ТЕОРИЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ. Р. Е. КАЙЗЕР		
1.1. Опытные данные и их интерпретация		17
1.1.1. Величины $R_f$ и $k$		17
1.1.2. Истинные значения $R_f$		21
1.1.3. Роль потока подвижной фазы в ВЭТСХ		22
1.1.4. Величина $R_f$ как функция длины пути разделения в ВЭТСХ		30
1.1.5. Связь между величинами $R_f$ , полученными круговым методом, и истинными величинами $R_f$ , определенными линейным методом		32
1.2. Характеристики разделения ВЭТСХ		35
1.2.1. Число разделений		35
1.2.2. Определение числа разделений		35
1.2.3. Высота тарелки и число разделений в ТСХ		38
1.2.4. Разрешение, селективность, разделительная способность		41
Список литературы		46
Глава 2. ЧИСЛО РАЗДЕЛЕНИЙ В ЛИНЕЙНОЙ И КРУГОВОЙ ТСХ. Ж. БЛОМ		
2.1. Ширина стартового пика $b_0$		47
2.2. Расчет числа разделений в линейной ТСХ		48
2.3. Пространственно-диффузионная модель		50

5.3. Дозирование нанолитровых объемов . . . . .	105
5.4. Нанесение пробы на смоченный слой . . . . .	108
<b>Глава 6. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗДЕЛЕНИЯ. Х. ХАЛПААП, Ж. РИПФАН . . . . .</b>	<b>113</b>
6.1. Введение . . . . .	113
6.2. Методы получения ВЭТСХ-пластинок с закрепленным слоем . . . . .	114
6.3. Характеристики ВЭТСХ-пластинок . . . . .	121
6.4. Хроматографические характеристики . . . . .	128
6.4.1. Влияние на хроматографическое разделение типа камеры, активности сорбента и растворителя . . . . .	128
6.4.2. Влияние температуры . . . . .	135
6.4.3. Различия между линейной и круговой хроматографией . . . . .	140
6.5. Преимущества ВЭТСХ <sup>1</sup> . . . . .	143
Список литературы . . . . .	150
<b>Глава 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ ТСХ-РАЗДЕЛЕНИЯ. Д. ИОНХЕН . . . . .</b>	<b>151</b>
7.1. Экспериментальная часть . . . . .	156
7.2. Модифицирование стационарной фазы веществами, не входящими в состав элюента . . . . .	158
7.3. Влияние предварительного насыщения слоя сорбента компонентами элюента . . . . .	160
7.4. Значение предварительной адсорбции растворителя сухим сорбентом (величины $V_p$ ) для разделения . . . . .	164
7.5. Использование данных ТСХ в ВЭЖХ. Сравнение кондиционирования из газовой и жидкой фаз . . . . .	167
Список литературы . . . . .	171
<b>Глава 8. ВОЗМОЖНОСТИ И ПРАКТИКА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ. ЮТ. Б. ХЕЗЕЛ . . . . .</b>	<b>173</b>
8.1. Введение <sup>1</sup> . . . . .	173
8.2. Методы нанесения пробы . . . . .	178
8.3. Фотометрические методы [4—6] количественного детектирования в ВЭТСХ [2] . . . . .	181
8.3.1. Измерения по методу пропускания и отражения . . . . .	181
8.3.2. Выравнивание нулевой линии путем одновременного измерения интенсивности отражения и пропускания [7, 8] . . . . .	185

8.3.3. Методы измерения интенсивности поглощения УФ-излучения и гашения флуоресценции . . . . .	187
8.3.4. Методы измерения интенсивности флуоресценции . . . . .	191
8.4. Воспроизводимость . . . . .	193
8.5. Предварительная качественная оценка . . . . .	200
8.6. Практические примеры . . . . .	202
8.7. Требования к оборудованию для фотометрического детектирования ТС-хроматограмм . . . . .	208
Список литературы . . . . .	216
<b>Глава 9. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ СОРБЕНТОВ В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ТСХ. Ж. РИПФАН, Х. ХАЛПААП . . . . .</b>	<b>217</b>
9.1. Исходный сигнал, первая и вторая производные . . . . .	222
9.2. Количественные методы . . . . .	223
Приложение . . . . .	238
Предметный указатель . . . . .	239

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер. д. 2.

16 244

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ  
ХРОМАТОГРАФИЯ

научн. редактор Б. М. Комарова  
мл. научн. редактор И. И. Землячева  
Художник Е. К. Самойлов  
Художественный редактор Г. В. Шотина  
Технический редактор Н. И. Манохина  
Корректор В. И. Киселева

ИБ № 1298

Сдано в набор 24.01.79.  
Подписано к печати 27.06.79.  
Формат 84×108<sup>1/32</sup>  
Бумага типографская № 1  
Гарнитура обыкновенная. Печать высокая.  
Объем 4,13 бум. л. Усл. печ. л., 13,86  
в т. ч. 0,84 п. л. цветн. вклеек  
Уч.-изд. л. 12,25, Изд. № 3/9818  
Тираж 5000 экз. Зак. № 069. Цена 1 р. 80 к.

Издательство «Мир»

Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Ордена Трудового Красного Знамени  
Московская типография № 7  
«Искра революции» Союзполиграфпрома  
Государственного Комитета СССР  
по делам издательств, полиграфии  
и книжной торговли.  
Москва 103001, Трехпрудный пер., 9.

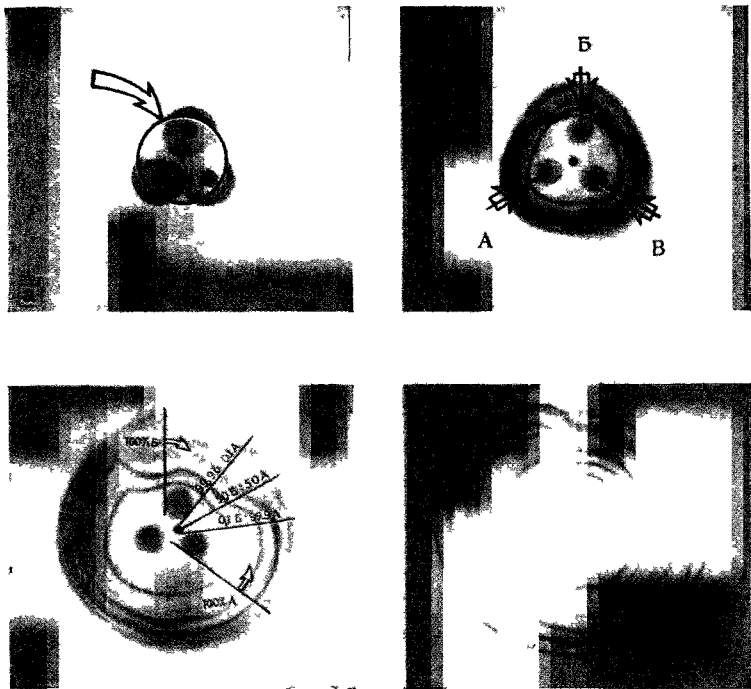


Рис. П.1. Принципиальная схема одновременного кругового разделения тремя элюентами (трехмерного) в увеличенной U-камере Института хроматографии.

*a* — нанесение пробы в виде круга, *б* — схема подачи трех элюентов с постоянной и одинаковой объемной скоростью, *в* — состав элюента в зависимости от направления движения на пластинке, *д* — готовая хроматограмма для количественной и качественной оценки.

Б



В

Рис. П.2. ВЭТС-хроматограмма смеси красителей, полученная одновременным разделением тремя элюентами.

А — толуол, В — смесь толуола и диизопропилового эфира в соотношении 50 : 50 (по объему), В — хлороформ (данные Института хроматографии)

Б



А

В

Рис. П.3. Хроматограмма смеси красителей, аналогичная предыдущей, полученная при разделении следующими элюентами.

А — толуол, В — смесь толуола — диизопропилового эфира 50 : 50 (по объему), В — смесь толуола — диизопропилового эфира 90 : 10 (по объему) и все смеси указанных выше элюентов (данные Института хроматографии).



Рис. П.4. Круговая хроматограмма, полученная на ВЭТСХ-пластинках, одновременным применением трех элюентов, в данном случае толуола, подаваемого в три точки пластинки (данные Института хроматографии).

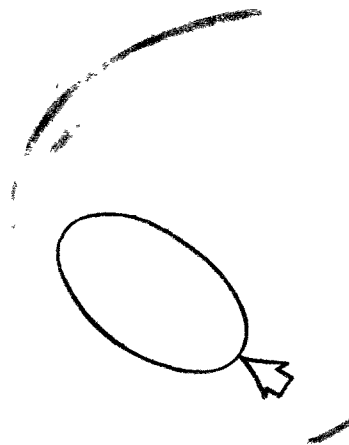


Рис. П.5. Хроматограмма, полученная при разделении смеси красителей.

Резкое изменение величины  $R_f$  (обведено овалом) происходит при добавлении в хлороформ 1% этилового спирта (данные Института хроматографии).

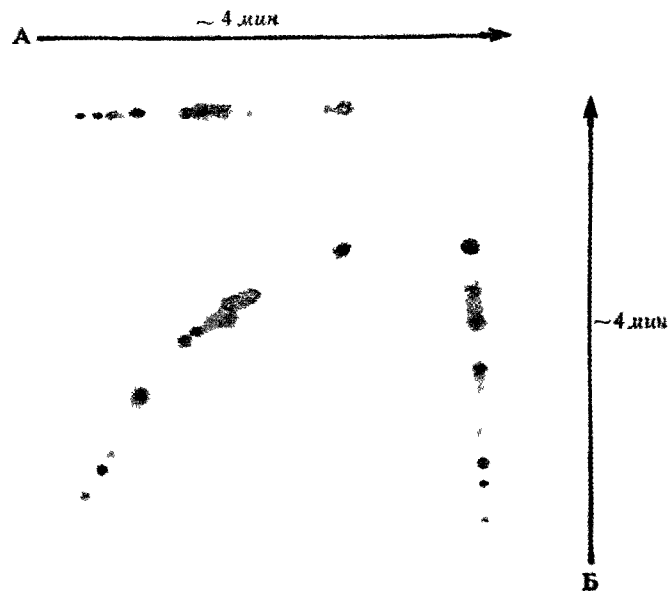


Рис. П.6. Хроматограмма, показывающая возможности двумерного разделения.

Время анализа  $2 \times 4$  мин, размеры пластинки  $50 \times 50$  мм, элюенты: А — толуол, В — хлороформ (данные Института хроматографии).

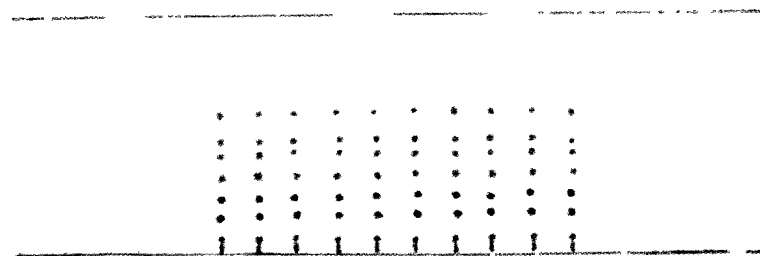


Рис. П.7. Линейная хроматограмма.

Липофильные красители наносили в количестве  $30 \text{ нл} = 30 \text{ нг}$  шприцем фирмы «Hamilton» емкостью 1 мкл, соединенным с микрометром,  $Z_f = 30$  мм. Пластинку размером  $10 \times 10$  см можно использовать дважды: длина пути перемещения  $30\text{--}40$  мм позволяет проводить оптимизацию разделения во времени (данные Халшапа).





Рис. П.8. Хроматограмма пробы красителей, иллюстрирующая способность к наполнению ВЭТСХ-пластинок размерами  $10 \times 10$  см; элюент—толуол, относительная влажность 40% (данные Института хроматографии).



Рис. П.9. Линейная хроматограмма.

Пробу (1 мкл = 1 мкг) каждого из липофильных красителей наносили в виде линии длиной 80 мм шприцем фирмы «Hamilton» емкостью 1 мкл, сорбционным с автоматическим аппликатором. Разделительная мощность и точность определения величин  $R_f$  соответствует ВЭТ-слоям в качестве пробы использовали краситель, в качестве элюента — толуол, относительная влажность 40% (по данным Халпапа).



Рис. П.10. Использование круговых хроматограмм позволяет улучшить неблагоприятные условия в начале разделения.

Пробы наносили в виде пятен. Хроматограмма наглядно демонстрирует пониженную разделительную мощность вследствие перегрузки сорбента и как это можно преодолеть в круговом методе (данные Института хроматографии).

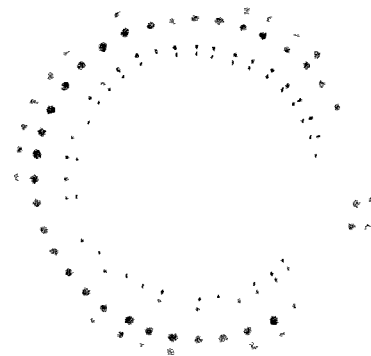


Рис. П.11. Круговая хроматограмма.

Пробы липофильных красителей наносили эксцентрически в количестве 20 нл (20 нг) шприцем (емкость 1 мкл) фирмы «Hamilton», соединенным с микрометром;  $Z_{f0} = 15$  мм,  $Z_f = 20$  мм. Подобные системы являются примером идеального использования площади разделения. на пластинке размерами  $10 \times 10$  см в соответствующей камере для круговой ВЭТСХ одновременно разделяют 40 проб (данные Хадпапа)

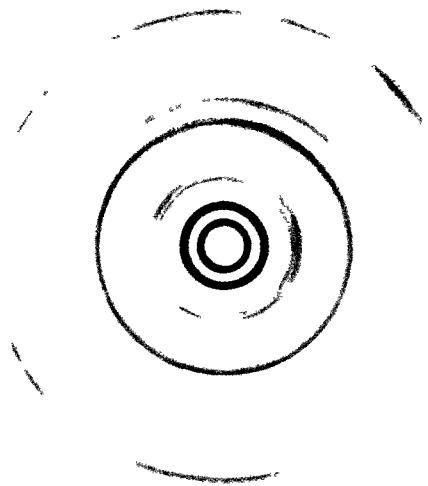


Рис. П.12. Круговая хроматограмма, полученная на ВЭТСХ-пластинке для нано-ТСХ с закрепленным слоем силикагеля 60F-254.

Липофильные красители элюировали смесью гексан — хлороформ — аммиачная вода в соотношении 70 : 30 на пути разделения  $Z_f = 30$  мм (данные Халпаапа)

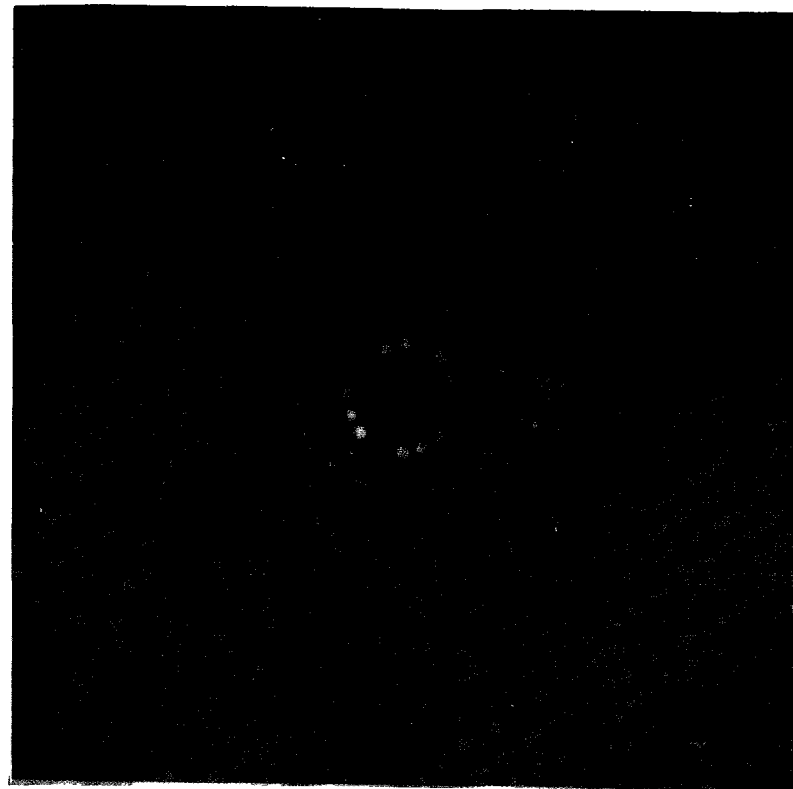


Рис. П.13. Круговая хроматограмма дансильных аминокислот.

Материал ТСХ-пластинки такой же как и в предыдущем примере. Элюент — смесь диоксан — вода в соотношении 97 : 3, длина пути разделения  $Z_f = 30$  мм, детектирование проводили при 366 нм (данные Халпаапа)

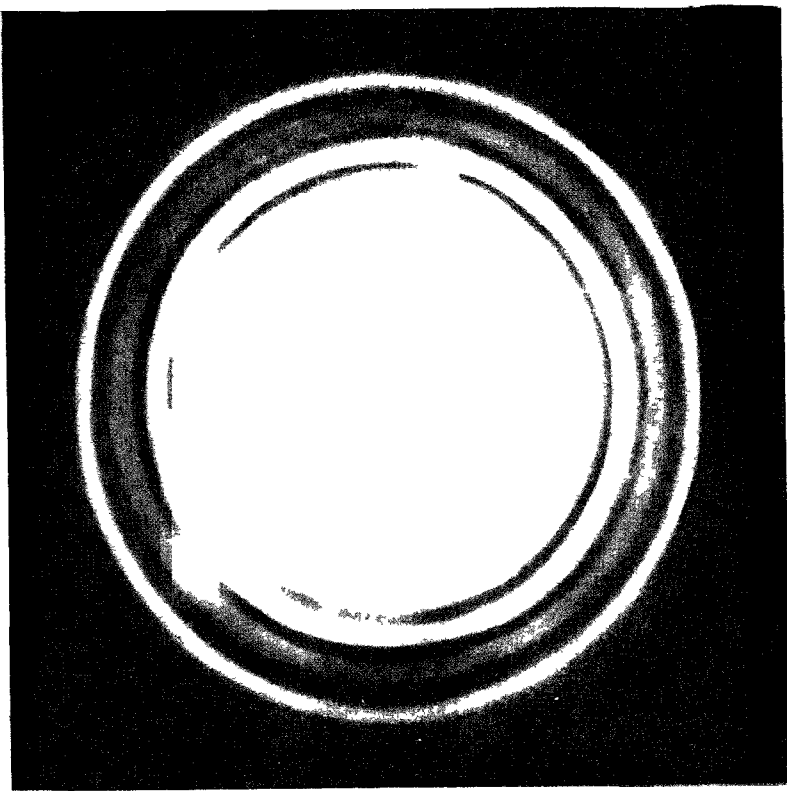


Рис П 14. Хроматограмма смеси холестерилстеарата, хлормадинацата холестерина, эпитестостерона, препадинола и кортико-стерона

Каждое из веществ взято в количестве  $10^{-6}$  г. Элюент — смесь хлороформ — метиловый спирт в соотношении  $9:1$  длина пути разделения  $Z_f = 20$  мм. Хроматограмму обдувают смесью хлорной кислоты и метилового спирта в соотношении  $9:1$ . Хроматограмму погружали в этот раствор, высушивали при  $120^\circ \text{C}$  и сканировали при  $366$  нм (данные Халишапа, фирма «Merck»)

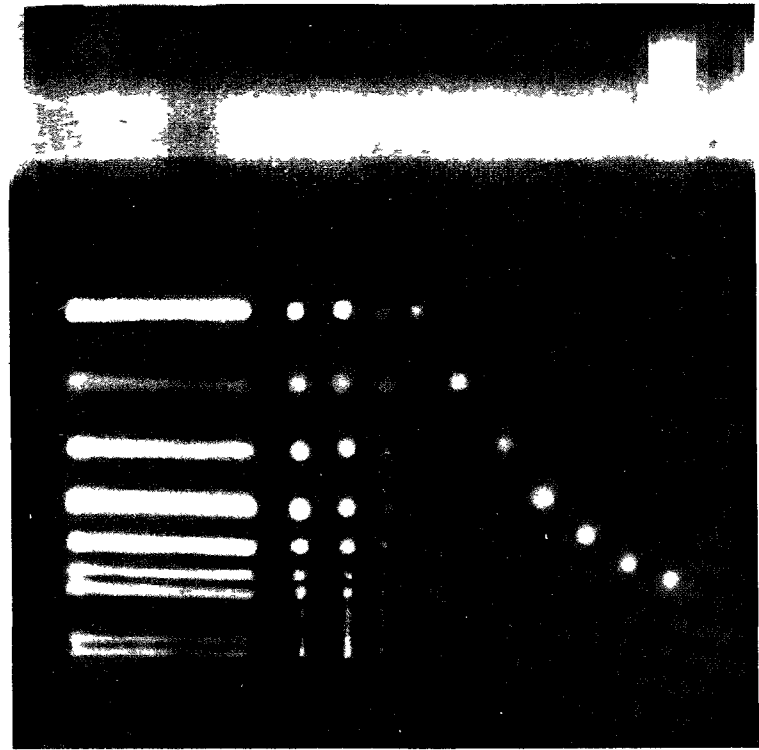


Рис П 15. Хроматограмма, аналогичная предыдущей. Пробы на носили в количестве 500, 50, 30, 10 нг (данные Халишапа, фирма «Merck»).

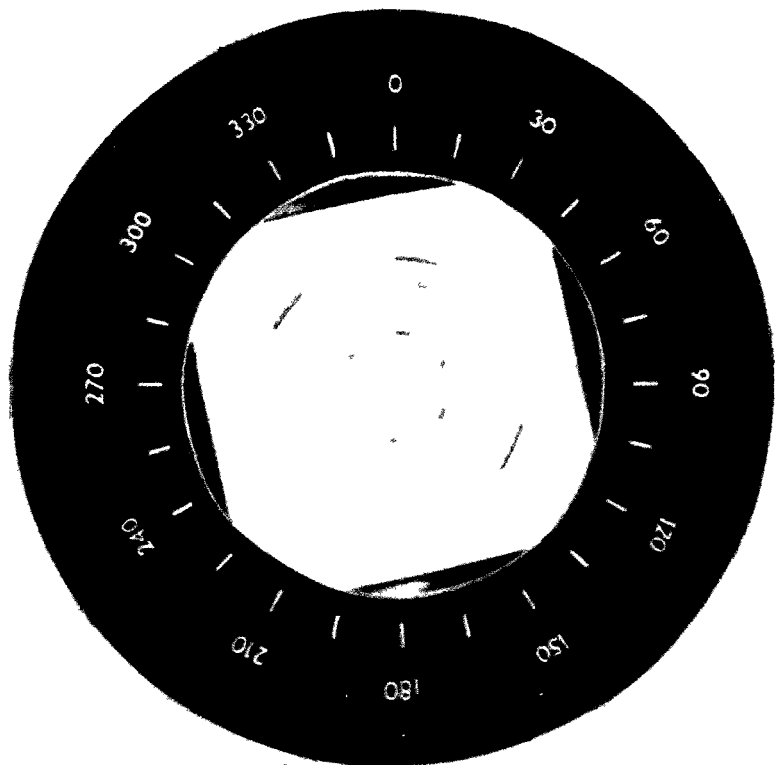


Рис. П.16. ВЭТСХ-пластинки размером  $50 \times 50$  мм в держателе U-камеры фирмы «Самар» для точного качественного ( $\pm 1\%$  при  $0,5R_f$ ) и количественного ( $\pm 2\%$  и лучше — воспроизводимость при  $10^{-9}$  г) анализа (данные Института хроматографии).