

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Иркутский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра фармацевтической и токсикологической химии

Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский, А. Э. Митина

ХРОМАТОГРАФИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА И ЕЁ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕННОМ АНАЛИЗЕ

Учебное пособие

Иркутск
ИГМУ
2022

УДК 544.5(075.8)

ББК 24.4я73

И 44

Рекомендовано к изданию ЦКМС ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по образовательной программе высшего образования – программе специалитета по специальности Медицинская биохимия по дисциплине «Спектральные и хроматографические методы анализа» (протокол № 2 от 01.12.2022)

Авторы:

Е. А. Илларионова – д-р хим. наук, профессор, зав. каф. фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

И. П. Сыроватский – канд. фарм. наук, доцент каф. фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

А. Э. Митина – ассистент каф. фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

Рецензенты:

А. А. Скрипко – канд. фарм. наук, доцент, зав. каф. управления и экономики фармации ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

И. А. Мурашкина – канд. фарм. наук, доцент, каф. фармакогнозии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

Илларионова, Е. А.

И 44 Хроматография в тонком слое сорбента и её использование в качественном анализе : учебное пособие / Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский, А. Э. Митина ; ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, кафедра фармацевтической и токсикологической химии. – Иркутск : ИГМУ, 2022. – 53 с. – Текст : непосредственный.

Учебное пособие охватывает раздел токсикологической химии, касающийся хроматографических методов и их использования в качественном анализе. Рассмотрены основы тонкослойной хроматографии, представлен материал по использованию тонкослойной хроматографии в анализе. Даны сравнительные характеристики хроматографических методов анализа, их преимущества и недостатки. В конце учебного пособия приведены тестовые задания для самоконтроля знаний студентов, полученных при изучении материала.

Пособие предназначено для студентов, обучающихся по программе специалитета по специальности Медицинская биохимия, при изучении дисциплины «Спектральные и хроматографические методы анализа».

УДК 544.5(075.8)

ББК 24.4я73

© Илларионова Е. А., Сыроватский И. П., Митина А. Э., 2022
© ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ПРЕДИСЛОВИЕ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1. ИСТОРИЯ ХРОМАТОГРАФИИ.....	6
2. ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ.....	9
2.1. Тарелочная теория.....	12
2.2. Кинетическая теория	14
3. КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	14
4. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХРОМАТОГРАММ	18
5. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ.....	19
5.1. Сорбенты.....	20
5.2. Растворители.....	24
5.3. Техника хроматографирования	26
5.3.1. Нанесение образцов	26
5.3.2. Хроматографирование.....	27
5.3.3. Детекция пятен	29
6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ НА ХРОМАТОГРАММЕ.....	32
7. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕПОСРЕДСТВЕННО НА ХРОМАТОГРАММЕ	34
7.1. Количественная интерпретация хроматограммы с помощью специальной аппаратуры	35
7.2. Количественное определение веществ после их элюирования из слоя ...	36
8. ПРИМЕНЕНИЕ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	37
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ.....	41
ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ	47
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ	48
ЭТАЛОНЫ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ.....	50
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	52

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГХ – газовая хроматография

ГФ – государственная фармакопея

ГФ РФ – государственная фармакопея Российской Федерации

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭТТ – высота, эквивалентная теоретической тарелке

ЛП – лекарственный препарат

СОВС – стандартный образец вещества свидетеля

ТСХ – тонкослойная хроматография

УИРС – учебно-исследовательская работа

ЧТТ – число теоретических тарелок

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие охватывает раздел токсикологической химии, касающийся тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ее использования в анализе лекарственных средств и химико-токсикологическом анализе.

В учебном пособии изложены основы хроматографии: классификация хроматографических методов в соответствии с принципом процесса разделения, способы получения хроматограмм, теория хроматографии. В пособии приведены различные варианты хроматографии, выбор условий хроматографирования, используемая аппаратура и оценка получаемых результатов. Представлен материал по использованию тонкослойной хроматографии в качественном и количественном анализе. Сделаны акценты на преимуществах и недостатках тонкослойной хроматографии. В конце пособия приведены ситуационные задачи и тесты для самоконтроля знаний студентов, полученных при изучении материала.

ВВЕДЕНИЕ

Хроматография – физико-химический метод разделения и анализа смесей газов, паров, жидкостей или растворенных веществ сорбционными методами в динамических условиях. В основе метода лежит явление адсорбции ионов из растворенных веществ на поверхности твердых сорбентов. Сущность хроматографии заключается в том, что процесс разделения веществ происходит между двумя фазами, одна из которых движется относительно другой. При своем перемещении каждое хроматографируемое вещество постоянно перераспределяется между обеими фазами так, что только часть его движется вперед вместе с подвижной фазой.

С помощью хроматографии можно разделять и определять сложные смеси органических и неорганических веществ, достаточно быстро проводить очистку, идентификацию и концентрировать вещества при достаточной простоте технических приемов. Кроме того, метод высокоэффективен и чувствителен. Благодаря этим достоинствам метод широко применяется в научно-исследовательских и заводских лабораториях, находит применение в химико-токсикологическом анализе.

1. ИСТОРИЯ ХРОМАТОГРАФИИ

Ряд явлений, положенных в основу хроматографических методов, известен уже давно. Например, еще во времена Аристотеля морскую воду очищали с помощью некоторых видов почв. Также давно известно, что минеральные удобрения остаются в почве в течение длительного времени и лишь с трудом вымываются дождевой водой. Английские химики-почвенники Уэй и Томпсон изучали процесс удерживания в почве катионов из фильтрующихся сквозь нее растворов. В ходе исследований они открыли в 1850 году основные законы ионного обмена. Адамс и Холмс, конденсируя фенолсульфоновые кислоты с формальдегидом, получили искусственные

смолы. Путем конденсации полиаминов с формальдегидом были получены анионообменники. По мере того, как налаживалось получение анионо- и катионообменников, их все шире стали применять не только для ионного обмена, но и для хроматографического разделения. Таким образом, появилась **ионообменная хроматография**.

Русский ботаник Цвет М. С. изучал пигменты, полученные из хлоропластов. При фильтрации растворов пигментов в петролейном эфире через узкую стеклянную колонку, заполненную карбонатом кальция, он наблюдал разделение исходной смеси на окрашенные зоны в соответствии с эффективностью адсорбции пигментов на данном адсорбенте. Эти зоны перемещались в колонке с различными скоростями. Так была открыта **адсорбционная хроматография**.

Адсорбционная хроматография используется главным образом для разделения веществ липофильного характера. Хроматографическое разделение гидрофильных соединений, прежде всего аминокислот, стало возможным после открытия Мартином и Синджем распределительной хроматографии. Они сконструировали экстракционную колонку, состоящую из сорока сосудов. Столбик силикагеля, насыщенного водой, являлся неподвижной фазой. В качестве подвижной фазы использовался органический растворитель. Разделение аминокислот возможно лишь после их ацетилирования. Смесь ацетилированных аминокислот разделялась на фракции, на такие же «зоны», которые получал Цвет М. С. при адсорбционной хроматографии.

В 1944 году Консен, Гордон и Мартин применили в качестве носителя неподвижной фазы целлюлозу в виде фильтровальной бумаги и испытали несколько растворителей в качестве подвижных фаз. Так появилась **бумажная хроматография**. Опыты по разделению на бумаге проводились задолго до описанных работ. Однако только после разработки ясных теоретических представлений о механизме разделения метод был усовершенствован и получил широкое применение.

О том, что некоторые вещества способны адсорбировать газы, известно давно, а с 1936 года это явление стало использоваться в *газовой хроматографии*. В 1952 году Джеймс и Мартин предложили метод газожидкостной хроматографии, а в 1953 году чешский хроматографист Янак внес существенный вклад в разработку газотвердофазной хроматографии.

В 1956 году широкое распространение получила *тонкослойная хроматография*. В этом направлении много сделал Шталь. В его работах описывается хроматография на закрепленных слоях. Спустя всего четыре года стал применяться другой вариант этого метода-хроматография на незакрепленных слоях. Современной тонкослойной хроматографии предшествовали более ранние варианты, первый из которых разработали Измайлов и Шрайбер в 1938 году. Эти авторы проводили разделение на стеклянных пластинках, на которые они наносили слои алюминия толщиной 2 мм, смешанного с водой в виде пасты. Но авторы испытывали затруднения: при использовании толстых слоев на их поверхности возникали трещины, разделение веществ не отличалось высоким качеством и воспроизводимостью. Примерно через десять лет американские химики Мейнхард и Хелл совершенствовали методику Измайлова, используя для закрепления слоя сорбента крахмал. В 1950 году эту методику использовал Кирхнер с сотрудниками, которые вместо предметных стекол применяли узкие стеклянные пластинки. Благодаря простоте метода и скорости проведения эксперимента тонкослойная хроматография во многих областях вытеснила бумажную и ионообменную колоночную хроматографию.

На основе теории распределительной хроматографии Мартина и Синджа разработана *колоночная хроматография в жидкой фазе*. Этот метод развивался сравнительно медленно из-за высоких требований к аппаратуре. Только в последние годы *жидкостная хроматография* получила широкое распространение благодаря большим возможностям применения, как в аналитических, так и препаративных целях, причем скорость анализа и его

высокая чувствительность компенсируют высокую стоимость соответствующих приборов.

В 1959 году Порат и Флодин предложили новый тип хроматографии – *гельпроникающую хроматографию*: анализируемые растворы медленно фильтруются через колонки, заполненные частицами соответствующего геля. В процессе разделения происходит «просеивание» молекул, а разделение веществ совершается в соответствии с их молекулярными размерами. Поэтому данный метод имеет универсальный характер и применяется для различных целей. Один из вариантов этого метода используют для приближенного определения молекулярных масс разделенных веществ.

1967 год отмечен появлением наиболее нового в настоящее время хроматографического метода: *аффинной хроматографии*. В этом году Порат, Аксен и Эрнбек смогли найти надежный способ фиксации аффинного лиганда (вещества, обладающего сродством к выделяемому соединению) на соответствующем твердом носителе. Они разработали метод ковалентного связывания пептидных и белковых соединений на агарозе, активированной бромцианом, а также впервые описали опыты по выделению веществ этим методом.

2. ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ

Сущность хроматографии заключается в том, что процесс разделения веществ происходит между двумя фазами, одна из которых движется относительно другой. При своем перемещении каждое хроматографируемое вещество постоянно перераспределяется между обеими фазами так, что только часть его движется вперед вместе с подвижной фазой. Отсюда следует, что скорость движения зоны этого вещества меньше, чем скорость движения подвижной фазы; при данной величине скорость движения подвижной фазы и скорость движения зоны этого вещества пропорциональны доле общего количества хроматографируемого вещества, находящейся в подвижной фазе. Эта доля зависит от константы распределения вещества в системе двух фаз.

Следовательно, в данной хроматографируемой системе зоны двух веществ с различными константами распределения должны перемещаться с различными скоростями.

Внедренный в хроматографическую систему растворенный компонент быстро распределяется между обеими фазами, и на какое-то время в системе устанавливается сорбционное равновесие. Однако движение подвижной фазы непрерывно нарушает его.

Предположим, что растворенное вещество, содержащееся в определенной концентрации в неподвижной фазе, переносится из области, где его концентрация находится в равновесии с концентрацией в неподвижной фазе, в ту область, где концентрация его в неподвижной фазе меньше. В результате в передней части зоны концентрация растворенного вещества в неподвижной фазе всегда выше равновесной концентрации, благодаря чему совершается переход растворенного вещества из подвижной фазы в неподвижную фазу. В задней части зоны создается обратное положение, поскольку смесь, первоначально находившаяся в равновесии с неподвижной фазой, замещается на смесь в неподвижной фазе с меньшей концентрацией растворенного вещества, в результате чего вещество переходит из неподвижной фазы в подвижную фазу, т. е. происходит десорбция. Следовательно, где-то в центре зоны не должно быть ни преимущественной адсорбции, ни преимущественной десорбции, т. е. здесь во все время перемещения зоны постоянно сохраняется состояние, близкое к равновесию.

Результаты разделения веществ зависят от всей совокупности параметров хроматографируемого процесса: от правильного выбора системы фаз, от режима проведения хроматографируемого процесса, размеров колонки, степени дисперсности разделяющей фазы и др. В настоящее время в выборе оптимальных условий применяется ЭВМ.

Хроматографический процесс характеризуется:

- объемом или временем удержания вещества в хроматографической колонке;

- шириной хроматографической полосы или пика элюирования;
- разрешением пиков;
- высотой теоретической тарелки.

В методе элюентной хроматографии одно из соединений удерживается неподвижной фазой дольше, чем другое, сначала из колонки выйдет то соединение, которое быстрее преодолело препятствие, а затем другое соединение, которое перемещается медленнее. Следовательно, вещества различаются временем удерживания в неподвижной фазе, а точнее по чистому времени удерживания t'_R . Общее время удерживания t_R складывается из времени удерживания неподвижной фазы t'_R и из времени удерживания подвижной фазы t_o (t_o - мертвое время):

$$t_R = t_o + t'_R. \quad (1)$$

Время удерживания зависит от скорости потока элюента, из этого следует такая характеристика, как объем удерживания, который равен произведению времени удерживания t_R на объемную скорость F :

$$V_R = t_R \cdot F. \quad (2)$$

Исправленный объем удерживания – это объем удерживания, из которого вычтен объем подвижной фазы V_m :

$$V_N = V_R - V_m. \quad (3)$$

Исправленный объем удерживания пропорционален объему неподвижной фазы V_S . Коэффициент пропорциональности равен термодинамическому коэффициенту разделения:

$$V_N = K \cdot V_S. \quad (4)$$

Перемещающаяся через разделительную колонку зона вещества размывается в результате диффузионных процессов. Мерой размывания хроматографической полосы является высота, эквивалентная теоретической

тарелке (ВЭТТ), которая определяется для одного компонента при заданной скорости элюента, постоянной температуре и постоянном соотношении фаз. ВЭТТ можно определить из записанной хроматограммы по уравнению

$$h = \frac{\ell}{16} \left(\frac{w}{t_R} \right)^2, \quad (5)$$

где ℓ – длина колонки; w – ширина пиков, которую получают как отрезок, отсекаемый на основании к пику (выражается в единицах времени или скорости в зависимости от того, чем характеризуется положение максимума). Иногда в качестве характеристики размытия зон хроматографируемых веществ используют β – ширину пика на высоте $\frac{C_{MAX}}{e}$, где C_{MAX} – концентрация вещества в максимуме; e – основание натурального логарифма.

Величина β связана с величиной w соотношением

$$\beta = \frac{1}{2} w. \quad (6)$$

Степень разделения двух веществ характеризуется разрешением R_S – это мера перекрывания между двумя соседними пиками, т. е. мера успеха данного разделения:

$$R_S = \alpha \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_1 + w_2}. \quad (7)$$

2.1. Тарелочная теория

Впервые общую теорию хроматографии, основанную на концепции теоретических тарелок, создали в начале 40-х годов Мартин и Синдж. Они предложили модель, описывающую хроматографический процесс движения зон разделяемых веществ в колонке и их размывания в процессе перемещения аналогично процессам, происходящим при противоположной экстракции.

Впоследствии тарелочная теория была дополнена и развита Глюкауфом, Ван-Димтером, Педдайгсом.

Тарелочная теория предусматривает ряд допущений и упрощений:

- хроматографическая колонка представляется условно разделенной на ряд слоев, названных теоретическими тарелками;
- каждый слой, т. е. теоретическая тарелка, содержит определенный объем стационарной подвижной фазы;
- объемы стационарной фазы одинаковы во всех слоях;
- объем подвижной фазы, переходящей из одной тарелки в другую, остается постоянным;
- в каждом слое устанавливается состояние равновесия между фазами и, следовательно, в пределах каждой тарелки концентрация вещества в подвижной и стационарной фазах остается постоянной.

Во время хроматографического процесса вещество осуществляет переход из подвижной фазы в стационарную фазу множество раз и движется с неподвижной фазой относительно стационарной. Чем больше число переходов вещества из подвижной фазы в стационарную и обратно, тем эффективнее хроматографический процесс разделения веществ. Эффективность хроматографической колонки (или пластинки) выражают числом теоретических тарелок ($ЧТТ$). Чем больше $ЧТТ$, тем выше эффективность хроматографической колонки (пластинки):

$$ЧТТ = \frac{\ell}{BЭТТ} , \quad (8)$$

где ℓ – длина хроматографической колонки, слоя адсорбента, хроматографической бумаги, в котором осуществляется хроматографический процесс; $BЭТТ$ – высота, эффективная теоретической тарелке, равная длине участка, на котором осуществляется разовый переход вещества из подвижной фазы в стационарную фазу и обратно (в мм). По $BЭТТ$ оценивают эффективность хроматографических колонок (пластинок) различной длины. Чем меньше $BЭТТ$, тем выше разделительная способность колонки.

Эффективность хроматографических колонок (пластинок) измеряется от нескольких десятков до нескольких тысяч «теоретических тарелок».

2.2. Кинетическая теория

Попытка учесть неидеальность процесса (ограниченность скорости перехода вещества между фазами, кинетику перехода скорости продольной и поперечной диффузии, влияния размера частиц стационарной фазы) была предпринята Ван-Димтером в теории, получившей название кинетической теории хроматографии.

В кинетической теории рассматривается отдельно каждый из механизмов, который может внести свой вклад в размывание зон. Выведено математическое выражение зависимости между высотой тарелки и переменными, значительно влияющими на механизм размывания зон. Эти отдельные частные соотношения объединяют для получения общего уравнения высоты тарелки:

$$H = H_d + H_\ell + H_f, \quad (9)$$

где H_d , H_ℓ , H_f – высота тарелки, обусловленная соответственно диффузией, медленным установлением равновесия, неравномерностью потока.

В действительности все эти механизмы действуют одновременно и влияние каждого из них невозможно изолировать. Отдельные механизмы размывания могут компенсировать друг друга хотя бы частично.

3. КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Термин «хроматография» охватывает многочисленные виды разделения, основанные на распределении веществ между подвижной фазой, которой может быть газ или жидкость, и неподвижной фазой, которой может быть твердое вещество или жидкость.

Существуют несколько классификаций хроматографических методов.

По агрегатному состоянию фаз:

- Жидкостная хроматография.

В данном методе подвижная фаза представляет собой жидкость, а неподвижной фазой может быть твердое вещество или другая жидкость, не смешивающаяся или частично смешивающаяся с первой. Соответственно различают следующие варианты жидкостной хроматографии:

- а) жидко-твердофазная;
- б) жидко-жидкостная;
- в) жидко-гелевая.

- Газовая хроматография.

Подвижной фазой является газ-носитель, а неподвижной фазой – твердое вещество или нелетучая жидкость. Газовая хроматография подразделяется на:

- а) газо-твердофазную;
- б) газо-жидкостную.

По механизму, лежащему в основе метода:

- Адсорбционная хроматография.

Представляет собой метод разделения, основанный на способности некоторых твердых веществ (адсорбентов) связывать (адсорбировать) на своей поверхности другие вещества - твердые, жидкие или газообразные. Адсорбция отдельных веществ определяется их природой и является характеристической (для каждого соединения) величиной при данных условиях эксперимента. Адсорбция может иметь химический или физический характер, однако между обоими типами в ряде случаев трудно провести четкую границу. Химическая адсорбция вызывается образованием лабильной химической связи между адсорбентом и хроматографируемым веществом. Физическая адсорбция определяется многими физико-химическими факторами, которые связаны с емкостью и типом сорбента. Количество адсорбируемого вещества увеличивается до определенной величины, пока поверхность адсорбента не насытится. Адсорбция протекает быстрее на гладкой поверхности, чем на шероховатой или пористой.

- Ионообменная хроматография.

Представляет собой аналитический метод определения ионов, основанный на способности некоторых твердых или жидких веществ (ионообменников) обменивать ионы при контакте с растворами электролитов. Ионообменники бывают двух типов:

- анионообменники (аниониты) – представляют собой нерастворимые высокомолекулярные полизарядные вещества. В растворах электролитов они способны диссоциировать и обмениваться анионами с раствором электролитов.

- катионообменники (катиониты) – представляют собой нерастворимые высокомолекулярные вещества, способные к диссоциации и обмену катионами.

На процесс обмена ионов влияет величина электростатической силы, которая связывает ионы с полярными группами соответствующего ионита. Ионообменная хроматография пригодна для разделения органических и неорганических соединений, способных к диссоциации.

- **Распределительная хроматография.**

Этот метод основан на различиях в скорости миграции растворенных веществ в гетерофазной системе. В распределительной хроматографии компоненты смеси распределяются между двумя взаимно не смешивающимися фазами согласно величинам их коэффициентов распределения. Коэффициент распределения постоянен и не зависит от концентрации вещества, но зависит от природы определяемого вещества, природы растворителя и температуры. Распределительная хроматография используется для разделения веществ, лучше растворимых в неподвижной фазе.

- **Осадочная хроматография.**

Данный метод разделения основан на принципе последовательного осаждения труднорастворимых веществ. Исследуемый раствор пропускают через носитель, пропитанный раствором осадителя. При этом вещества осаждаются в виде труднорастворимых соединений, выпадающих в осадок в порядке возрастания их растворимостей.

По технике выполнения:

- **Колоночная хроматография.**

В данном методе разделение веществ происходит в специальных колонках.

- Плоскостная хроматография:

а) тонкослойная хроматография – разделение происходит в тонком слое сорбента;

б) бумажная хроматография – разделение проводится на специальной бумаге, которая является носителем неподвижной фазы, а система растворителей – подвижной фазой, которая перемещается по хроматограмме под действием капиллярных сил.

в) в тонкой пленке полимера или геля.

По способу подачи подвижной фазы:

- Элюентная хроматография (проявительная).

Через хроматографическую колонку непрерывно пропускают подвижную фазу – элюент, который обладает меньшей сорбируемостью, чем любое вещество разделяемой смеси. Затем в верхнюю часть колонки вводят смесь веществ, способных растворяться в подвижной фазе, после чего через колонку пропускают чистую подвижную фазу **А**. Под действием тока элюента перемещение разделяемых веществ происходит с различными скоростями в соответствии с их сорбируемостью. На определенном этапе элюирования происходит полное разделение веществ на отдельные зоны, разделенные участками чистого сорбента.

- Фронтальная хроматография.

Через хроматографическую колонку непрерывно пропускают раствор смеси веществ. Если разделяется трехкомпонентная смесь, то сначала из колонки элюируется чистый растворитель, далее появляется и непрерывно элюируется из колонки компонент **В**; он обладает самым малым сродством к подвижной фазе и поэтому слабее удерживается. Потом выходит смесь компонентов **ВС** (**С** обладает средним сродством). Затем, когда неподвижная фаза насыщается компонентом **Д**, обладающим наибольшим сродством к

носителю, из колонки выходит раствор, содержащий смесь всех трех компонентов **B****C****D**.

- Вытеснительная хроматография.

В хроматографическую колонку вводят раствор смеси веществ и непрерывно пропускают элюент **A**, содержащий вытеснитель **E** – вещество, обладающее большей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. Так в ряду $A < B < C < D < E$, по мере продвижения по колонке вещества **E**, оно вытесняет вещество **D**, которое в свою очередь вытесняет вещество **C** и т. д.

4. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХРОМАТОГРАММ

Хроматограммы в зависимости от способов получения подразделяются на *внутренние, в элюате и внешние*.

- В плоскостном варианте хроматографии внутренняя хроматограмма представляет собой соответствующие разделенным веществам смеси хроматографические зоны в виде пятен, расположенных на бумаге или в тонком слое сорбента в определенной последовательности. Вещества экстрагируются из хроматографических пятен подходящим растворителем после отделения хроматографических зон с тонкого слоя сорбента (бумаги).

М. С. Цвет получал хроматограмму в слое сорбента, которым была заполнена стеклянная трубка. Хроматограмма представляла собой последовательно расположенные цветные кольца сорбента, которые соответствуют различным веществам хроматографической смеси. Недостатком данного способа является то, что хроматографическая колонка и бумага могут применяться только один раз. Перед каждым анализом колонку заполняют сорбентом, используют новую пластинку или хроматографическую бумагу.

- Автором хроматограммы в элюате является японский ученый В. Кошара. В отличие от Цвета М. С. он после проявления зон на сорбенте продолжал подачу проявителя до тех пор, пока все разделяемые вещества не выходили поочередно из колонки.

- При аппаратном оформлении хроматографического процесса хроматограмма представляла собой зафиксированную одним из способов последовательность сигналов детекторов во времени, интенсивность которых зависит от количества компонентов в хроматографируемой смеси. Сигналы детектора записывались на движущейся ленте самописца в виде хроматографических пиков (внешняя хроматограмма).

5. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Среди современных хроматографических методов, в значительной степени способствовавших развитию анализа органических и биологических соединений и совершенствованию способов препаративного разделения, заметное место занимает тонкослойная хроматография. В процессе разделения указанным методом анализируемая смесь перемещается вместе с подвижной фазой по тонкому слою порошкообразного сорбента.

По направлению движения подвижной жидкой фазы плоскостная хроматография подразделяется на *восходящую, нисходящую и горизонтальную*. В ТСХ наиболее часто используют восходящий вариант. При этом может осуществляться прием одномерной и двумерной подачи элюента.

- Одномерная хроматография.

Во многих случаях при однократной подаче элюента по тонкослойной пластинке не происходит полного разделения хроматографических пятен. Эффективность разделения может быть улучшена при удлинении пути пробега хроматографических зон и элюента. Такое условие может быть осуществлено при многократной подаче элюента. В этом случае один и тот же элюент подается на пластинку несколько раз в одном и том же направлении. Каждый раз подвижная фаза пропускается через пластинку после ее высушивания, т. е. после удаления предварительно поданного элюента. В случае, если с одной и той же по составу подвижной фазой не происходит полного разделения хроматографических зон, можно произвести замену элюента. Такой прием

называется ступенчатой хроматографией, при которой через хроматографическую пластинку вначале пропускают одну подвижную фазу, а затем после ее удаления, помещают в камеру с другой. При этом повышается эффективность разделения смесей веществ.

- Двумерная хроматография.

В ТСХ с закрепленным слоем для повышения разделяющей способности пластинки применяется вариант двумерной хроматографии. Принцип аналогичен ступенчатому разделению смеси. Для этого хроматографическая пластинка после прохождения первого элюента подсушивается, а затем ее помещают в хроматографическую камеру так, чтобы направление второй подвижной фазы было перпендикулярно направлению первого элюента.

При хроматографировании в тонком слое применяют два основных типа пластинок: с закрепленным и незакрепленным (насыпным) слоями. Пластины с закрепленным слоем готовят, заливая их суспензией сорбента в воде или органическом растворителе. К суспензии обычно добавляют связующее вещество для закрепления слоя. Пластины с незакрепленным слоем готовят из сухого сорбента, разравнивая его по стеклянной пластинке до получения слоя одинаковой толщины.

5.1. Сорбенты

Вещества, применяемые в качестве сорбентов, должны удовлетворять нескольким основным требованиям. Они не должны растворяться в хроматографических растворителях, должны быть химически инертными по отношению к элюирующим системам и хроматографируемым соединениям и должны обладать высокой адсорбционной способностью.

Наибольшее распространение в качестве сорбента в ТСХ получили силикагель и окись алюминия. Они, за редким исключением, пригодны для разделения самых различных типов соединений, т. е. являются универсальными сорбентами. Они доступны, недороги, обладают замечательной разделительной

способностью. Кроме того, эти сорбенты удобны тем, что можно регулировать их активность, менять рН, зернение и т. д.

Силикагель (кремнезем). Его получают из солей кремневой кислоты. Внутренняя поверхность силикагеля энергетически неоднородна из-за наличия нескольких типов беспорядочно распределенных ОН-групп. Кроме ОН-групп, наиболее важную роль в адсорбционных процессах играют поверхностные силоксановые группы. Они могут образоваться в результате конденсации реакционноспособных ОН-групп в процессе активации силикагеля при повышенных (200–400 °С) температурах.

Размер пор представляет важную характеристику силикагеля как сорбента. Размеры пор меняются от 20 до 150 Å°, а удельная поверхность – от 300 до 600 м²/г. От размеров его частиц зависит скорость элюирования: на силикагеле с большими частицами она выше. Размер частиц силикагеля для ТСХ равен 2–40 мкм. Необходимо отметить, что с увеличением размеров частиц уменьшается четкость разделения.

В качестве связующего вещества при хроматографировании чаще всего добавляют от 5 до 15 % гипса. В этом случае удастся получить лучшее разделение. Однако благодаря очень маленькому размеру частиц силикагель и без связующего вещества образует хорошо прилипающие слои и может использоваться почти без ограничений для хроматографирования большинства соединений.

Оксид алюминия. Характеризуется высокой адсорбционной активностью и его легко обрабатывать. Выпускают три вида оксида алюминия: щелочной, нейтральный и кислый. При правильном применении и соответствующей степени активности оксида алюминия на нем можно успешно разделять большинство соединений.

Оксид алюминия получают частичной гидратацией (прокаливанием при 200–600 °С) гидроксидов, получаемых, например, при обработке раствора алюмината натрия диоксидом углерода. Он пригоден для разделения не слишком полярных стереоизомеров или соединений с различными

функциональными группами, особенно способных образовывать внутримолекулярные водородные связи. Активность товарных образцов различна, ее определяют с помощью азокрасителей, применяя метод Брокмана и Шоддера или метод ТСХ (табл. 1).

Таблица 1

Красители, используемые для определения активности

Азокраситель	Активность окиси алюминия				Активность силикагеля			
	II	III	IV	V	II	III	IV	V
Азобензол	59	74	85	95	61	70	83	6
П-метоксибензол	16	49	69	89	28	43	67	9
Судановый желтый	1	25	57	78	18	30	53	64
Судановый красный	0	10	33	56	11	13	40	50
П-аминобензол	0	3	8	19	4	7	20	29
П-оксиазобензол					1	1	7	18

Определение активности оксида алюминия методом ТСХ:

Около 10 г оксида алюминия наносят на стеклянную пластинку и разравнивают. На пластинку наносят на расстоянии 3 см от края 0,02 мл раствора азокрасителя. Растворы азокрасителей готовят, растворяя в порциях по 50 мл сухого перегнанного тетрахлорметана соответственно 30 мг азобензола, 20 мг п-метоксиазобензола, 20 мг суданового желтого, 20 мг суданового красного III и 20 мг п-аминоазобензола. Пластинку элюируют в слегка наклонном положении в неглубокой камере, в которую добавляют тетрахлорметан. Величины R_f отдельных азокрасителей дают возможность судить об активности адсорбента.

Активность I установить нельзя, так как тонкий слой сорбента активной окиси алюминия быстро дезактивируется. Описанный метод предложен вместо более трудоемкой методики определения степени активности окиси алюминия по Брокману и Шоддеру.

Силикат магния. Синтетический силикат магния поступает в продажу под названием «флоризил» или «магнезол». По своим хроматографическим

свойствам этот дезактивированный сорбент занимает промежуточное положение между оксидом алюминия и силикагелем. Силикат магния выпускают в виде частиц размером от 2 до 44 мкм, его рН равен примерно 10.

Некоторые фирмы выпускают силикат магния, нейтрализованный кислотами. Обычный товарный сорбент не содержит ни связующего, ни флуоресцентного индикатора.

Силикат магния можно использовать для разделения сахаров, их ацетатов, стероидов, эфирных масел, липидов и гликозидов.

Целлюлоза. Целлюлоза относится к числу наиболее часто применяемых органических сорбентов. В ТСХ используется два типа целлюлозы: природную волокнистую и микрокристаллическую. Длина волокон природной целлюлозы составляет от 2 до 25 мкм, а средняя степень полимеризации колеблется между 400 и 500. Частицы микрокристаллической целлюлозы крупнее: от 20 до 40 мкм, а средняя степень полимеризации ниже: от 40 до 200. Благодаря применению очень коротких волокон целлюлозы в форме порошка в ТСХ не получается такое быстрое растекание хроматографируемых веществ вдоль волокон, которое имеет место на целлюлозе, используемой в виде хроматографической бумаги, и поэтому при одних и тех же концентрациях ТСХ дает более четкие пятна и позволяет получить лучшее разделение, чем бумажная хроматография. На чистой целлюлозе проводят, главным образом, количественный анализ или разделение фосфорных кислот, фосфатов и т. п. Большинство марок товарной целлюлозы выпускают без связующего вещества, поскольку адгезионные свойства ее слоев намного выше, чем у неорганических сорбентов. В некоторые марки добавляют флуоресцентный индикатор.

Готовые хроматографические пластинки. Помимо перечисленных выше сорбентов в ТСХ применяются готовые хроматографические пластинки, которые в настоящее время производятся в большом ассортименте во всем мире и находят все большее применение. Стекланные пластинки с тонкими слоями сорбентов (прежде всего с силикагелем, окисью алюминия и

целлюлозой) поставляют фирмы Merck, Scheicher and Schiill, Camag и др. Однако гораздо удобнее пользоваться готовыми слоями, нанесенными на алюминиевую фольгу или на гибкую фольгу из пластмассы. Преимущество фирменных пластинок бесспорно. Их не требуется предварительно готовить. Они тщательно упакованы, хранятся неограниченно долго, обладают механической прочностью, изготовлены из качественных материалов достаточной чистоты, обладающих высокой разделительной способностью. Благодаря своим прекрасным механическим свойствам готовые пластинки на фольге объединяют в себе все преимущества ТСХ с удобствами работы на хроматографической бумаге.

В Чехии предприятием Kavalier производятся гибкие пластинки с силикагелем с добавкой люминофора, называемые «Силуфол УФ 254». В качестве связующего вещества используется крахмал. «Силуфол» можно резать для получения пластинок любого размера. В Чехии также выпускаются готовые пластинки с окисью алюминия – «Алуфол». В нашей стране выпускаются готовые пластинки с силикагелем с добавкой люминофора и без него, называемые «Армсорб», «Сорбфил» и другие.

5.2. Растворители

В ТСХ растворитель или система растворителей осуществляет перенос хроматографируемых соединений. Для хорошего разделения соединений, особенно с резко различающейся полярностью, необходима подвижная фаза с возрастающей элюирующей способностью. На элюирующую способность влияют следующие три фактора: 1) взаимодействие между молекулами растворителя и хроматографируемого соединения, 2) взаимодействие между адсорбированными молекулами пробы и молекулами растворителя, 3) взаимодействие между адсорбированными молекулами растворителя и адсорбентами.

При подборе растворителей следует руководствоваться общим правилом: подобное растворяет подобное. Если анализируемые соединения значительно отличаются от растворителя по гидрофильным свойствам или полярности, то нельзя ожидать хороших результатов. Такие соединения или останутся на стартовой линии или будут перемещаться вместе с фронтом растворителя. Растворители обычно классифицируют по элюотропным рядам. Если элюирующая способность растворителя заранее не определена экспериментально, то следует руководствоваться следующим основным принципом, применимым также при определении полярности или гидрофильности растворенных веществ: алифатические углеводороды считаются крайними членами ряда, потому что они наиболее липофильны и неполярны, а замыкает такой ряд вода, поскольку она наиболее гидрофильна и является высокополярным растворителем.

Элюотропный ряд – ряд растворителей, расположенных в порядке увеличения эффективности вытеснения ими адсорбированных соединений с данного сорбента. Наиболее известен ряд Траппе, который выглядит следующим образом (в порядке увеличения элюирующей способности): петролейный эфир <циклогексан <тетрахлорметан <трихлорэтилен <толуол <бензол <дихлорметан <хлороформ <эфир <этилацетат <ацетон <н-пропанол <этанол <метанол.

Как показывает практика, разрешающая способность системы растворителей максимальна в области $R_f = 0,5$ и уменьшается как в сторону старта, так и в сторону фронта. В связи с этим для проведения хроматографического разделения данной смеси веществ следует пользоваться такой системой растворителей, в которой зоны отдельных компонентов располагались бы симметрично и вблизи линии с $R_f = 0,5$.

Самый простой способ получения системы с любой элюирующей способностью состоит в смешивании двух растворителей с разной полярностью. Однако не всякая система, в которой значение $R_f = 0,5$, обеспечивает хорошее разделение данной группы веществ. Поэтому иногда

бывает необходимо испробовать несколько систем растворителей различной природы с приблизительно одинаковой элюирующей способностью и остановиться на той, в которой разделение компонентов смеси будет оптимальным.

Правильный подбор сорбента играет также не маловажную роль в полном разделении смеси веществ. При выборе сорбента отправным моментом является количество и характер функциональных групп в молекулах определяемых веществ. Как правило, интенсивность взаимодействия вещества с сорбентом возрастает с увеличением количества функциональных групп и их адсорбционной активности.

Изучением адсорбционной активности отдельных функциональных групп занимались Брокманн и Волперс, которые расположили их в следующий ряд по мере увеличения «полярности»: $\text{Cl} < \text{H} < \text{OCH}_3 < \text{NO}_2 < \text{N}(\text{CH}_3)_2 < \text{COOCH}_3 < \text{NH}_2 < \text{OH} < \text{CONH}_2 < \text{COOH}$. Этот ряд имеет лишь информативный характер, поскольку порядок в нем зависит и от характера сорбента, и от системы растворителей.

5.3. Техника хроматографирования

5.3.1. Нанесение образцов

В большинстве случаев пробы наносят в виде растворов в подходящем низкокипящем (50–100 °C) растворителе, который должен быть относительно неполярным, чтобы хроматографируемые соединения имели в нем низкие значения R_f . Растворы проб наносят в виде пятен на хроматографические пластинки с помощью микрошприцев или микропипеток различных типов, начиная от калибровочных пипеток до самозаполняющихся пипеток известной емкости (рис. 1). Концентрация пробы в растворе составляет 0,1–1 %. Объем нанесенной пробы подбирают в зависимости от чувствительности обнаружения. Рекомендуется наносить как можно меньшее количество пробы,

так как четкость разделения при этом увеличивается, а форма нанесенных пятен приближается к идеально круглой.

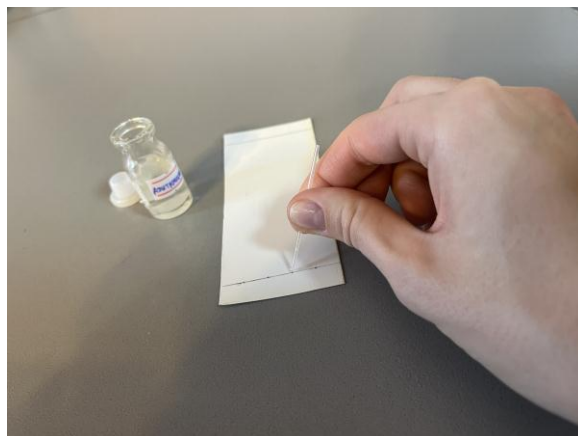
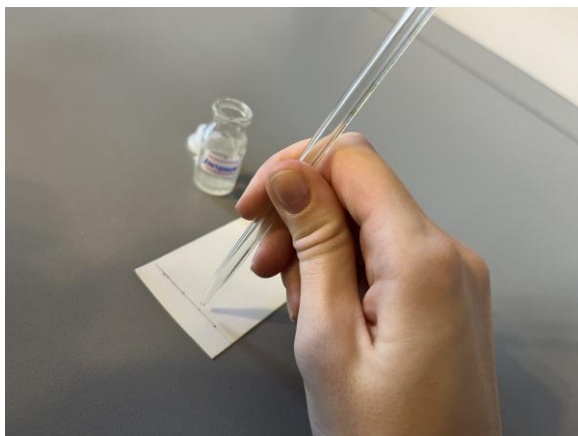


Рисунок 1. Нанесение пробы анализируемого соединения на хроматографическую пластинку

Пробу наносят на расстоянии 1,5–2 см от нижнего края хроматографической пластинки.

Расстояние между нанесенными пробами зависит от числа проб, но обычно составляет от 1,5 до 2 см. При нанесении пробы следует осторожно коснуться поверхности слоя кончиком пипетки и дать раствору впитаться в слой. В случае закрепленных слоев диаметр стартового пятна должен быть равным 3–4 мм, а у насыпных слоев – 6–8 мм. Нужно избегать слишком широких стартовых пятен, поскольку в этом случае пятна на хроматограмме получаются слишком большими и сливаются с близкими по R_f соседними пятнами. Достаточно хорошее разделение достигается при нанесении растворов веществ в виде узких поперечных полосок. Стартовые полоски должны быть длиной от 1 до 4 см и, как можно, более узкими.

5.3.2. Хроматографирование

Процесс хроматографирования можно проводить в любом сосуде подходящих размеров, снабженном герметической крышкой. Применяются различные аквариумы, кюветы, чашки Петри различных размеров, эксикаторы, склянки для сыпучих веществ и т. д (рис. 2). Камера должна герметично

закрывать: необходимо исключить возможность испарения растворителей, поскольку это ведет к нарушению процесса хроматографирования.



Рисунок 2. Хроматографические камеры

В неплотно закрытых камерах существует опасность изменения многокомпонентных систем. Большинство авторов рекомендует работать с камерами, насыщенными парами системы растворителей, т. е. начинать элюирование после того, как весь объем камеры насытится парами растворителей. Скорейшему достижению равновесного состояния способствует размещение фильтровальной бумаги по трем сторонам камеры от крышки до дна. Растворитель поднимается по бумаге кверху, и пары быстро насыщают весь объем (рис. 3). Применение насыщенной парами растворителя камеры предупреждает образование нежелательного «краевого» эффекта, при котором одно и то же вещество в середине хроматограммы имеет более низкие значения R_f , чем по краям пластинки.

Хроматограммы чаще всего элюируют по восходящему варианту. Для закрепленных слоев используют высокие узкие камеры, насыпные слои

элюируют в плоских камерах. В качестве последних годятся чашки Петри. Готовые слои на гибкой фольге даже сравнительно больших размеров можно также элюировать в узких камерах.

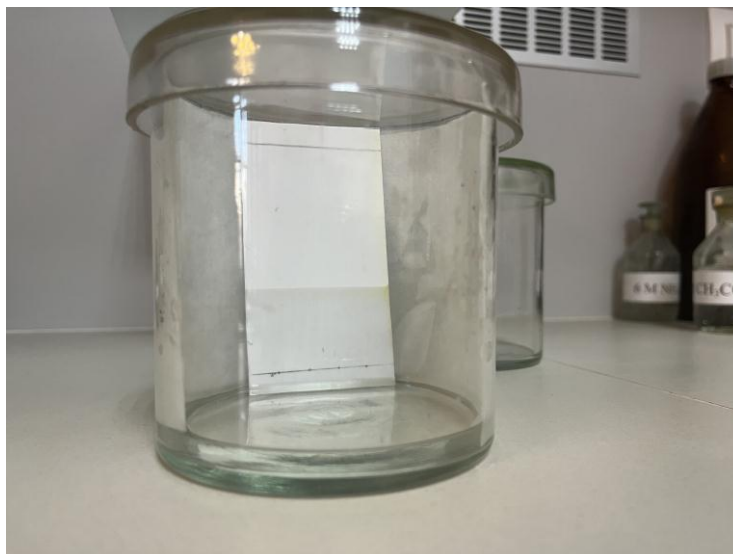


Рисунок 3. Процесс хроматографирования на пластинке в хроматографической камере

При погружении пластинки в элюент необходимо следить за тем, чтобы пятно на линии старта находилось выше уровня элюента в камере, иначе хроматографируемая проба будет им размыта. Вовремя хроматографического процесса необходимо следить за тем, чтобы фронт растворителя не дошел до верхнего края пластинки во избежание вымывания пятен. После окончания хроматографического процесса пластинку вынимают из камеры, отмечают линию фронта растворителя и сушат в сушильном шкафу или на воздухе.

При работе с многокомпонентными системами растворителей каждое новое хроматографирование связано с определенным изменением состава системы. Поэтому не рекомендуется хроматографировать серию хроматограмм в одной и той же порции растворителей. Всегда лучше использовать свежую порцию растворителя, приготовленного заранее в достаточном количестве.

5.3.3. Детекция пятен

Окрашенные вещества не требуют специального обнаружения, однако подавляющее большинство веществ бесцветно и поэтому их надо каким-то

образом обнаруживать после элюирования. Чаще всего детекцию пятен на хроматограмме осуществляют обработкой ее растворами соответствующих реактивов, для чего ими опрыскивают пластинку из пульверизатора. Обнаружение всегда проводят в вытяжном шкафу с хорошей тягой воздуха. Необходимо помнить, что при использовании многих обнаружителей пятна сразу после обнаружения (контуры пятен) следует отметить на хроматограмме.

Методы обнаружения можно разделить на несколько групп:

а) физические методы применяются для обнаружения соединений, флуоресцирующих при облучении светом определенной длины волны (254 или 366 нм) и не флуоресцирующих соединений, разделенных на слоях адсорбента, содержащих флуоресцентные индикаторы. В последнем случае при УФ-облучении флуоресцирует вся неподвижная фаза за исключением зон соединений, подавляющих флуоресценцию, эти соединения обнаруживаются в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне (рис.4).



Рисунок 4. Просматривание хроматографической пластинки с использованием прибора ультрафиолетового облучения (УФО-254)

б) химические методы применяются чаще всего. При обнаружении указанным методом хроматограмму после окончания разделения обрабатывают газами (аммиаком, йодом, бромом) или опрыскивают различными неспецифическими или специфическими обнаруживающими реагентами. Обнаружение с помощью химических реагентов очень эффективно, поскольку они часто образуют окрашенные производные сразу при опрыскивании. В отличие от бумажной хроматографии тонкослойные хроматограммы можно обнаруживать в очень жестких условиях, например, используя минеральные кислоты.

В детекции пятен органических веществ в фармацевтическом анализе часто используют:

1) раствор йода или пары йода, кристаллы которого находятся в эксикаторе (рис 5);

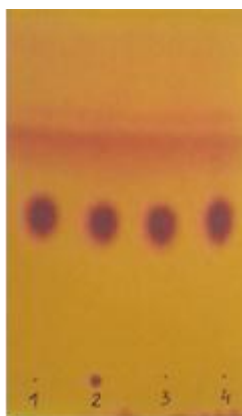


Рисунок 5. Хроматографическая пластинка после обработки парами йода

2) 1 % подкисленный раствор калия перманганата – на светло-фиолетовом фоне появляются коричневые пятна;

3) концентрированная серная кислота – появляются темно-серые пятна;

4) 10 % раствор сульфата меди с добавлением 2 % раствора аммиака для проявления диуретиков, жаропонижающих;

5) раствор Драгендорфа – раствор $KBrI_4$ – дает ярко-оранжевое соединение с аминами, алкалоидами, соединениями стероидной структуры;

6) раствор нингидрина – для детекции пятен аминокислот;

7) растворы аммиака, сероводорода, йодида калия, гексоцианоферрата калия, дитизона, 8-оксихинолина – для детекции пятен, соответствующих неорганическим веществам.

6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ НА ХРОМАТОГРАММЕ

Идентификацию веществ на хроматограмме осуществляют:

- по характеру окраски пятен;
- по параметрам удерживания;
- с помощью свидетелей (метчиков).

Одним из основных параметров удерживания веществ на хроматографической пластинке служит величина R_f . Величина R_f характеризует способность вещества перемещаться в тонком слое сорбента и представляет собой отношение расстояния, пройденного растворенным веществом, к расстоянию, пройденному растворителем. Величина R_f изменяется в пределах от 0 до 1. Вещества на старте имеют $R_f = 0$, вещества в середине хроматограммы имеют $R_f = 0,5$, а вещества на фронте растворителя – $R_f = 1,0$.

Величина R_f в ТСХ является характерной величиной для каждого вещества на определенном сорбенте в конкретных условиях эксперимента и зависит от:

- активности и качества сорбента;
- толщины слоя сорбента;
- качества и природы растворителя;
- способа работы.

При идентификации вещества посредством сравнения величин R_f определяемого вещества с R_f стандартного вещества достижение воспроизводимости разделения и, тем самым, воспроизводимости значений R_f приобретает большое значение.

Как следует из результатов исследований многих авторов, на воспроизводимость этой величины влияет целый ряд факторов. К ним

относятся, прежде всего, система растворителей, форма и степень насыщения парами растворителя хроматографической камеры, активность хроматографических слоев, относительная влажность, длина пробега фронта растворителя, значение pH сорбента или системы растворителей. На значение R_f также сказывается чистота растворителей, составляющих систему, толщина слоя, зернение сорбента, консистенция пасты при изготовлении пластинок, количество нанесенного образца и удаленность стартовой линии от нижнего края, глубина погружения нижнего края слоя и направления проявления. В ТСХ R_f мало зависит от температуры.

Величина R_f является постоянной при строгом соблюдении условий эксперимента и поэтому может служить качественной характеристикой идентификации вещества. Однако добиться строгого воспроизведения условий хроматографического процесса затруднительно. Поэтому часто для целей идентификации применяют «свидетели».

«Свидетель» – это раствор индивидуального вещества, наличие которого предполагают в анализируемой смеси. «Свидетель» и анализируемую пробу наносят на пластинку в разные точки линии старта и хроматографируют в одних условиях. Совпадение величин R_f пятен в анализируемой смеси и пятен метчиков свидетельствует об идентичности соединений (рис. 6).

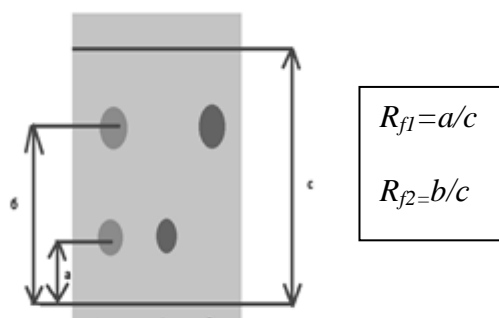


Рисунок 6. Хроматограмма:

точка 1 – нанесена смесь двух веществ;

точки 2 и 3 – нанесены растворы свидетелей входящих в смесь.

Величина R_f лекарственных веществ рассчитывается как отношение расстояния, пройденного веществом (a , b), к расстоянию, пройденному растворителем (c).

Об эффективности разделения смеси веществ можно судить по величине *фактора разделения*:

$$R_s = \frac{R_f(B)}{R_f(A)} \cdot \quad (10)$$

Чем больше значение величины R_s , тем эффективнее разделение компонентов смеси.

7. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕПОСРЕДСТВЕННО НА ХРОМАТОГРАММЕ

Можно использовать определение, основанное на зависимости площади пятна от количества вещества на хроматограмме, существует несколько видов такой зависимости. Иногда бывает достаточно выразить графически ход зависимости между площадью пятна и количеством вещества. Чаще используется математическое выражение зависимости между логарифмом площади пятна и логарифмом количества вещества, между корнем квадратным из площади пятна и логарифмом количества вещества или между площадью и логарифмом количества вещества. Зависимость между площадью пятна и логарифмом количества вещества определяется толщиной слоя. Это соотношение соблюдается лучше при работе с тонкими слоями. На хроматограмму наносят возрастающее количество вещества и измеряют величину пятна с помощью планиметра или перерисовывают пятно на полупрозрачную миллиметровую бумагу. Нибом доказывает, что, по всей вероятности, не существует единой теоретической зависимости между площадью пятна и количеством вещества: характер связи между этими параметрами меняется при переходе от вещества к веществу и зависит от их химических свойств, толщины слоя, метода обнаружения и, в определенной степени, от абсолютного количества вещества в пятне, т. е. изменяется с изменением концентрации. Однако при соблюдении стандартных условий

зависимость между величиной пятна и количеством вещества можно часто с успехом использовать.

7.1. Количественная интерпретация хроматограммы с помощью специальной аппаратуры

Широкое распространение получил фотоденситометрический метод, применяемый в тех случаях, когда вещества дают при обнаружении достаточно интенсивное окрашивание. Необходимым условием при этом является воспроизводимость метода обнаружения. До нанесения веществ исходную хроматографическую пластинку промеряют денситометром, только после этого наносят образец, проводят проявление и обнаружение. Полученные значения с учетом поправки на пустой слой наносят на график против количества вещества. Основными факторами, определяющими точность денситометрирования, являются толщина слоя, время проявления, положение измеряемого пятна в денситометре и содержание воды в сорбенте. Рекомендуется работать в области низких концентраций разделяемых веществ, где соблюдается линейный характер зависимости между измеряемыми величинами и количеством вещества. Денситометрирование можно использовать и для определения величин R_f анализируемых веществ.

Нередко применяют флуориметрические методы, при которых измеряют флуоресценцию некоторых веществ. Флуориметры имеют источник УФ-излучение, которое через фильтр попадает на хроматографический слой. Вторичное излучение, которое производят отдельные вещества, проходит через другой фильтр и попадает в регистрирующее устройство, снабженное фотоэлементом. Можно работать и с фотометрами, если слой снять со стекла пластинки, или сфотографировать его, или использовать хроматограммы на гибкой фольге. Измерения производят по поглощению или пропусканию, причем предпочтение отдают первой методике. При измерениях УФ-спектрометрией часто мешают примеси, экстрагируемые из сорбента, от

которых бывает очень трудно избавиться; контрольные эксперименты дают слишком высокие и невоспроизводимые значения. Положение удастся улучшить фильтрованием растворов через синтетические мембранные фильтры.

7.2. Количественное определение веществ после их элюирования из слоя

Как и в случае анализа непосредственно на хроматограмме, описываемая методика предполагает предварительное построение калибровочного графика, т. е. на слой наносят раствор стандартного вещества в возрастающей концентрации, а на график наносят измеренные величины. Если в распоряжении имеется раствор стандартного вещества известной концентрации, то можно не строить калибровочный график, а каждый раз сравнивать раствор измеряемого вещества со стандартным раствором. На хроматограмму наносят как раствор стандартного вещества, так и раствор определяемого вещества, осуществляют обычное количественное определение и из полученных данных простым расчетом определяют количество исследуемого вещества. Эта методика удобна тем, что на результаты измерения не оказывают влияния возможные изменения количества и свойств сорбента, а также условий эксперимента. При каждом количественном определении следует проводить контрольный опыт. С хроматограммы отбирают часть свободного слоя сорбента того же размера и с той же величиной R_f , что и пятно, из которого было элюировано вещество. Значения, полученные при обсчете этого образца, вычитают из значений, полученных при измерении вещества. Количественные определения чаще всего проводят с помощью методов спектрофотометрии и колориметрии.

Некоторые авторы отдают предпочтение определению веществ после их элюирования из слоя, поскольку этот метод позволяет проводить различные операции с выделенным веществом, повышающие воспроизводимость

количественного анализа (взаимодействие с химическими реагентами, гомогенизация, удаление мешающих определению примесей). Удобно работать со слоями на гибкой фольге. Вещества с вырезанных пятен можно экстрагировать в аппарате Сокслета. Хроматография на фольге облегчает также проведение элюирования неустойчивых соединений в инертной атмосфере.

Описано также несколько способов определения веществ после их вымывания из сорбента с использованием техники микроэлементного анализа. Это относится к азотосодержащим и галогенсодержащим веществам.

8. ПРИМЕНЕНИЕ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Тонкослойная хроматография обладает высокой чувствительностью и позволяет разделять близкие по химической структуре сложные органические вещества, что не всегда удастся сделать с помощью хроматографии на бумаге, газовой или газо-жидкостной. ТСХ применяется в основном для разделения, идентификации и количественного определения веществ в чистом виде и в смесях. Нередко она используется в сочетании с другими современными инструментальными методами, например, спектрофотометрией, ИК-спектроскопией, масс-спектроскопией, газовой хроматографией, люминесценцией, полярографией, радиохимией, рентгеновской эмиссионной спектрометрией и др., что повышает эффективность анализа.

ТСХ используется для изучения поведения веществ в зависимости от химической структуры. Филлипсон и Шеллард определяли соотношение между стереохимией некоторых индольных и оксииндольных алкалоидов и их поведением на хроматограммах в тонких слоях силикагеля и окиси алюминия. Установлено, что мета-замещение в индольном кольце в положении 2 дает более низкое значение hR_f ($hR_f = 100 \cdot R_f$), чем наблюдается у алкалоидов неароматического строения с той же стереохимией. Цис- изомеры (резерпин) имеют значение hR_f несколько более высокие, чем алкалоиды с транс-

изомерией (тетрафилин и аймалицин). Алкалоиды с одинаковой стереохимией имеют одинаковое значение hR_f .

Одной из актуальных задач аналитической химии является разделение и идентификация ингредиентов сложных смесей, составляющих значительную часть конечных и промежуточных продуктов синтеза большинства технологических процессов. Выбор сорбентов и систем растворителей основывается на возможности использования специфического взаимодействия между сорбентом и разделяющими веществами, а также между последними и растворителями с целью их лучшего разделения. Разделение проводят на готовых пластинках «Силуфол» размером 10×15 см и на пластинках с незакрепленным слоем окиси алюминия размером 9×12 см, которые готовят методом насыпания по общепринятой методике. Толщина слоя сорбента равняется, как правило, 2 мм. При подборе систем растворителей, наряду с хорошей разделительной способностью, стараются подобрать и применять в работе малотоксичные растворители.

Немаловажное значение имеет использование метода хроматографии в тонком слое сорбента для оценки чистоты веществ. На устойчивость химических соединений оказывает влияние целый ряд факторов: химическая структура вещества, его физическое состояние, освещенность, влажность, наличие продуктов разложения, способ получения, микробное загрязнение и др. Под влиянием одного или ряда факторов в веществах появляются промежуточные продукты синтеза, продукты разложения или взаимодействия, зачастую дающие одинаковый аналитический эффект с реактивами, которые используются для идентификации соединений. Поэтому для их обнаружения часто применяют метод ТСХ.

Метод тонкослойной хроматографии используется и для количественного определения веществ. Количественный анализ смеси веществ с помощью хроматографии в тонком слое во многих случаях дает надежные результаты, сравнимые с результатами анализа многими методами.

Методы количественного определения подразделяются на непрямые и прямые. В первую группу входят все методы, предусматривающие экстракцию соединений перед их количественным определением. Эти методы предпочтительны в тех случаях, когда можно провести контрольный опыт с холостой пробой, а также определить погрешность элюирования. В таблице 2 указаны различные количественные методы исследования экстрактов и интервалы чувствительности отдельных методов.

Непрямой метод количественного обнаружения более употребим. Этот способ, хотя и занимает больше времени, не требует применения слишком сложного оборудования. Выбор аналитической методики зависит от типа и количества разделяемых веществ.

Таблица 2

Чувствительность методов анализа

Определяемые количества соединений	1–100 мг	10–100 мкг	10–100 нг
Методы определения	Гравиметрия, титриметрия, поляриметрия	Спектроскопия (УФ, ИК, ЯМР), ГЖХ, Масс-спектрометрия, рефрактометрия, полярография, изотопные методы	Флуоресценция, фосфоресценция, биологические методы

Прямое количественное обнаружение на хроматограмме можно проводить, измеряя площадь пятна или определяя интенсивность ее окраски, но такое определение сопряжено со значительными экспериментальными погрешностями и поэтому пригодно только для ориентировочных измерений. Более точные методы определения содержания соединений непосредственно в тонком слое сорбента требуют применения специальных приборов. Все методы этой группы основаны на принципах фотометрии. Используемые методы количественного определения непосредственно на хроматограмме вещества в микро- или нанограммовых количествах следующие:

- фотометрия (пропускания или поглощения);
- сравнение размеров пятен или зон;

– измерение параметров люминесценции или радиоактивности.

Для проведения разделения в тонком слое сорбента используют обычные методики. Основное внимание обращают на чистоту хроматографических материалов и на качество нанесения образца на хроматограмму.

Преимуществом прямого метода является то, что при таком способе измерения малы потери, малы затраты времени, возможны определения меньших количеств вещества. Но в то же время данный метод требует использования специальной аппаратуры.

Широкое распространение получил фотоденситометрический метод, применимый в тех случаях, когда вещества дают при обнаружении достаточно интенсивное окрашивание.

Нередко применяют флуориметрические методы, при которых измеряют флуоресценцию некоторых веществ.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. РАЗДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВА В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА МОЖНО ОТНЕСТИ К СЛЕДУЮЩЕМУ ТИПУ ХРОМАТОГРАФИИ
 - 1) распределительная
 - 2) осадочная
 - 3) адсорбционная
 - 4) ионообменная

2. В ОСНОВЕ РАЗДЕЛЕНИЯ ВЕЩЕСТВ В АДСОРБЦИОННОМ ВАРИАНТЕ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ЛЕЖИТ ПРОЦЕСС
 - 1) ионного обмена
 - 2) кристаллизации
 - 3) фильтрации
 - 4) сорбции-десорбции
 - 5) осаждения

3. ИДЕНТИФИКАЦИЮ ВЕЩЕСТВ В МЕТОДЕ ТСХ ПРОВОДЯТ
 - 1) по высоте пика на хроматограмме
 - 2) по числу теоретических тарелок
 - 3) по времени удерживания
 - 4) по величине R_f

4. ЭЛЮОТРОПНЫЙ РЯД
 - 1) это ряд растворителей, резко отличающийся по полярности
 - 2) это ряд растворителей, расположенных в порядке увеличения
 - 3) эффективности вытеснения ими адсорбированных соединений с данного сорбента
 - 4) это ряд растворителей, расположенных в порядке увеличения их элюирующей способности

5. ХРОМАТОГРАФИЯ ЭТО
 - 1) химический метод, основанный на постепенном прибавлении реактива к определяемому веществу
 - 2) физико-химический метод, основанный на явлении адсорбции, т. е. способности веществ поглощать свет определенной длины волны
 - 3) физико-химический метод разделения и анализа смесей газов, жидкостей или растворенных веществ сорбционными методами в динамических условиях

6. ОСНОВОПОЛОЖНИКОМ ХРОМАТОГРАФИИ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) Джеймс и Мартин
 - 2) Цвет М. С.

3) Аристотель

7. СВИДЕТЕЛЕМ В ТСХ МОЖЕТ БЫТЬ

- 1) раствор индивидуального вещества, наличие которого предполагают в анализируемой смеси
- 2) раствор смеси веществ, наличие которых предполагают в анализируемой смеси
- 3) раствор индивидуального вещества, близкого к определяемому веществу по оптическим свойствам

8. ДОБАВКИ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ИСПОЛЬЗУЮТ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА

- 1) для увеличения скорости хроматографического процесса
- 2) для изменения активности сорбента
- 3) для обнаружения флуоресцирующих веществ
- 4) для обнаружения веществ поглощающих УФ-спектр

9. ДЛЯ ЛУЧШЕГО РАЗДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ АЛИЗИРУЕМОЙ СМЕСИ В ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) повторное хроматографирование
- 2) трехмерное хроматографирование
- 3) четырехмерное хроматографирование
- 4) двухмерное хроматографирование

Выберите несколько правильных ответов.

10. НА ЗНАЧЕНИЕ R_f ВЛИЯЮТ СВОЙСТВА ХРОМАТОГРАФИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

- 1) химическое строение веществ
- 2) физические свойства веществ
- 3) молекулярная масса веществ
- 4) степень сродства к подвижной и неподвижной фазам

11. МЕТОД ТСХ ИМЕЕТ ПРЕИМУЩЕСТВА ПЕРЕД МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

- 1) в большей скорости хроматографирования
- 2) в более высокой чувствительности
- 3) в возможности препаративного разделения веществ
- 4) в лучшей воспроизводимости метода

12. ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ ПРИМЕНЯЮТ МЕТОДЫ

- 1) газовая хроматография
- 2) гравиметрии
- 3) титриметрии

- 4) тонкослойной хроматографии
13. ВЕЩЕСТВА НА ХРОМАТОГРАММЕ ОБНАРУЖИВАЮТ
- 1) по темной флуоресценции пятна в УФ-свете
 - 2) по запаху
 - 3) после охлаждения
 - 4) после обработки в иодной камере
14. МЕТОДЫ АНАЛИЗА, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ ИДЕНТИФИЦИРОВАТЬ ВЕЩЕСТВО НА ХРОМАТОГРАММЕ:
- 1) гравиметрический
 - 2) титриметрический
 - 3) физико-химический
 - 4) химический
15. ПО СПОСОБУ ПОДАЧИ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ РАЗЛИЧАЮТ СЛЕДУЮЩИЕ ВИДЫ ХРОМАТОГРАФИИ
- 1) вытеснительная
 - 2) осадочная
 - 3) гель-хроматография
 - 4) элюентная
 - 5) фронтальная
 - 6) двумерная
 - 7) колоночная
16. ПО ТЕХНИКЕ ВЫПОЛНЕНИЯ РАЗЛИЧАЮТ СЛЕДУЮЩИЕ ВИДЫ ХРОМАТОГРАФИИ
- 1) плоскостная
 - 2) газо-жидкостная
 - 3) колоночная
 - 4) ступенчатая
 - 5) элюентная
17. ХРОМАТОГРАФИЮ МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ
- 1) для очистки
 - 2) для разделения сложных смесей
 - 3) для определения примесей в веществе
 - 4) для изучения стабильности веществ
18. ТРЕБОВАНИЯ К СОРБЕНТАМ ДЛЯ ТСХ
- 1) высокая адсорбционная способность
 - 2) хорошая растворимость
 - 3) химическая инертность
 - 4) высокая реакционная способность
 - 5) не растворяться в хроматографических растворителях

б) чувствительность

19. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭЛЮИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

- 1) взаимодействие между адсорбированными молекулами растворителя и адсорбентами
- 2) взаимодействие между молекулами растворителя и хроматографируемого соединения
- 3) взаимодействие между адсорбированными молекулами пробы и молекулами растворителя

20. ИДЕНТИФИКАЦИЮ ВЕЩЕСТВ НА ХРОМАТОГРАММЕ ОСУЩЕСТВЛЯЮТ

- 1) по характеру окраски пятен
- 2) по параметрам удерживания
- 3) с помощью свидетелей
- 4) по поглощению света анализируемым веществом

21. ВЕЛИЧИНА R_f В ТСХ ЗАВИСИТ ОТ

- 1) активность сорбента
- 2) оптические свойства разделяемых веществ
- 3) природа растворителя
- 4) размеры хроматографической пластинки
- 5) способ работы

22. ЗНАЧЕНИЯ, КОТОРОЕ МОЖЕТ ПРИНИМАТЬ ВЕЛИЧИНА R_f

- 1) 1,2
- 2) -0,8
- 3) 1,0
- 4) 0,5
- 5) 0,02

23. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КЛАССИФИЦИРУЮТСЯ

- 1) по составу подвижных фаз
- 2) по способу подачи подвижной фазы
- 3) по механизму, лежащему в основе метода
- 4) по агрегатному состоянию фаз
- 5) по технике выполнения
- 6) по времени анализа

24. ПО НАПРАВЛЕНИЮ ДВИЖЕНИЯ ПОДВИЖНОЙ ЖИДКОЙ ФАЗЫ ПЛОСКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПОДРАЗДЕЛЯЕТСЯ НА

- 1) нисходящую
- 2) фронтальную
- 3) двумерную

- 4) восходящую
- 5) элюентную
- 6) горизонтальную

25. АЗОКРАСИТЕЛИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ОКИСИ АЛЮМИНИЯ МЕТОДОМ ТСХ

- 1) метиленовый синий
- 2) азобензол
- 3) судановый красный
- 4) п-аминобензол
- 5) толуол
- 6) п-оксиазобензол

26. РАСПОЛОЖИТЕ ГРУППЫ ПО МЕРЕ УВЕЛИЧЕНИЯ ПОЛЯРНОСТИ

- 1) $-N(CH_3)_2$
- 2) $-OCH_3$
- 3) $-OH$
- 4) $-COOH$
- 5) $-Cl$
- 6) $-NO_2$

27. СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ ПЯТЕН НА ХРОМАТОГРАММЕ

- 1) опрыскивание хроматограммы после окончания разделения реагентами
- 2) облучение светом определенной длины волны
- 3) визуально
- 4) нагревание в вытяжном шкафу

Установите соответствие.

28. УСТАНОВИТЕ СООТВЕТСТВИЕ МЕЖДУ КЛАССИФИКАЦИОННОЙ ГРУППОЙ И МЕТОДОМ

классификационная группа

метод

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| 1) ионообменная хроматография | а) тонкослойная хроматография |
| 2) распределительная хроматография | б) колоночная хроматография |
| 3) адсорбционная хроматография | в) бумажная хроматография |
| 4) осадочная хроматография | |

29. УСТАНОВИТЕ СООТВЕТСТВИЕ МЕЖДУ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ И МЕХАНИЗМОМ, ЛЕЖАЩИМ В ОСНОВЕ

механизм, лежащий в основе

метод хроматографии

- | | |
|--|----------------------|
| 1) различия в скорости распределения веществ между двумя несмешивающимися фазами | а) адсорбционная |
| | б) распределительная |
| | в) осадочная |
| | г) ионообменная |

- 2) последовательное осаждение труднорастворимых веществ
- 3) обмен ионами при контакте с растворами электролитов
- 4) способность некоторых твердых веществ связывать на своей поверхности другие вещества – твердые, жидкие или газообразные

30. УСТАНОВИТЕ СООТВЕТСТВИЕ МЕЖДУ ПРИЕМОМ ПОДАЧИ ЭЛЮЕНТА И ТИПОМ ХРОМАТОГРАФИИ

прием подачи элюента

- 1) элюент подают по тонкослойной пластинке в одном направлении
- 2) элюенты подают по тонкослойной пластинке в перпендикулярном направлении
- 3) по тонкослойной пластинке подают различные элюенты в одном направлении

тип хроматографии

- а) двумерная хроматография.
- б) ступенчатая хроматография.
- в) одномерная хроматография

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

1 – 3	16 – 1, 3, 5
2 – 4	17 – 1, 2, 3, 4
3 – 4	18 – 1, 3, 5
4 – 2	19 – 1, 2, 3
5 – 3	20 – 1, 2, 3
6 – 2	21 – 1, 3, 5
7 – 1	22 – 3, 4, 5
8 – 4	23 – 2, 3, 4, 5
9 – 4	24 – 1, 4, 6
10 – 1, 2, 3, 4	25 – 2, 3, 4, 6
11 – 1, 2, 3	26 – 5, 2, 6, 1, 3, 4
12 – 1, 4	27 – 1, 2, 3, 4
13 – 1, 4	28 – 1 б, 2 в, 3 а, 4 б
14 – 3, 4	29 – 1 б, 2 в, 3 г, 4 а
15 – 1, 4, 5	30 – 1 в, 2 а, 3 б

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1. Идентификация папаверина гидрохлорида в трех лекарственных формах была выполнена методом ТСХ на пластинках Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ в системе растворителей толуол-этилацетат-диэтиламин (7:2:1). На хроматограммах были обнаружены зоны папаверина с $R_f = 0,57$ (ЛФ 1), $R_f = 0,55$ (ЛФ 2), $R_f = 0,54$ (ЛФ 3). Представьте рисунок хроматограммы. Как можно обнаружить зоны папаверина гидрохлорида на хроматограмме? Как идентифицировать папаверина гидрохлорид методом ТСХ?

Задача 2. Анализ лекарственной формы, состава:

Атропина сульфата 0,005 г

Платифиллина гидротартрата 0,005 г

Сахара 0,3 г

был выполнен методом ТСХ на пластинках Силуфол в системе растворителей хлороформ-этанол-раствор аммиака 25 % (9:1:0,5). При опрыскивании хроматограммы раствором йода обнаруживались зоны атропина сульфата с $R_f = 0,26$ и платифиллина гидротартрата с $R_f = 0,67$ на уровне стандартных образцов веществ-свидетелей (СОВС). Представьте рисунок хроматограммы. Как рассчитать величину R_f лекарственных веществ? Какое заключение о идентификации входящих веществ можно сделать?

Задача 3. В субстанции ципрофлоксацина гидрохлорида примесь определяли методом ТСХ на пластинках, покрытых слоем силикагеля GF₂₅₄, в системе растворителей метиленхлорид-метанол-25 % раствор аммиака-ацетонитрил (4:4:2:1). Одновременно хроматографировали раствор ципрофлоксацина и стандартный раствор примеси. Зоны веществ обнаруживали в УФ-свете при длине волны 254 нм. Дополнительное пятно на хроматограмме испытуемого раствора с величиной R_f , соответствующей величине R_f пятна на хроматограмме стандартного раствора примеси, не превышало его по размеру и интенсивности окраски. В соответствии с НД примеси должно быть не более 2 %. Представьте рисунок хроматограммы. Как

рассчитать величину R_f примеси? Какое заключение о качестве лекарственного препарата можно сделать?

ЭТАЛОНЫ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ

Задача 1

Для идентификации папаверина гидрохлорида методом ТСХ необходимо одновременно хроматографировать раствор СОВС папаверина гидрохлорида. Как видно из рисунка 7, пятна на хроматограммах лекарственных форм (1-3) находятся на уровне пятна на хроматограмме СОВС (4) папаверина гидрохлорида. Кроме того, размер пятен и интенсивность окрашивания соответствуют пятну СОВС папаверина гидрохлорида. Следовательно, лекарственные формы содержат папаверина гидрохлорид. Зоны папаверина на хроматограммах можно обнаружить в УФ-свете, а также опрыскиванием хроматограммы раствором йода. Они обнаруживаются в виде темных и бурых пятен соответственно.

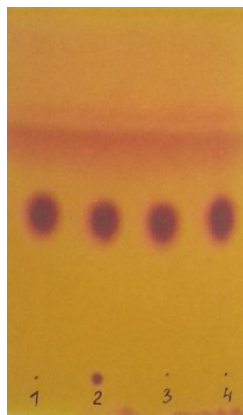


Рисунок 7 – Хроматограмма ЛП папаверина гидрохлорида

1 – ЛФ1; 2 – ЛФ2; 3 – ЛФ3; 4 – СОВС папаверина гидрохлорида

Задача 2

Как видно из рисунка 8, пятна на хроматограмме лекарственного препарата по размеру, окрашиванию и величине R_f соответствуют пятнам на хроматограммах СОВС атропина сульфата и платифиллина тартрата. Следовательно, можно сделать положительное заключение о наличии в лекарственной форме этих веществ. В его составе методом ТСХ обнаружены атропина сульфат и платифиллина гидротартрат. Величина R_f лекарственных

веществ рассчитывается как отношение расстояния, пройденного веществом (a, b), к расстоянию, пройденному растворителем (c).

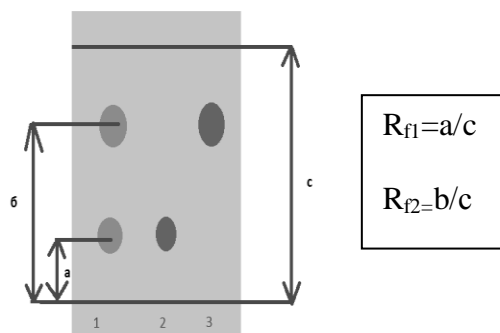


Рисунок 8 – Хроматограмма ЛФ

1 – ЛФ, 2 – СОВС атропина сульфата, 3 – СОВС платифиллина гидротартрата

Задача 3

Как видно из рисунка 9, дополнительное пятно на хроматограмме испытуемого раствора с величиной R_f , соответствующей величине R_f пятна на хроматограмме стандартного раствора примеси, не превышает его по совокупности размеров и интенсивности окраски. Следовательно, ципрофлоксацина гидрохлорид содержит примеси меньше чем СОВС примеси. Величина R_f примеси рассчитывается как отношение расстояния (a), пройденного веществом, к расстоянию (b), пройденному растворителем.

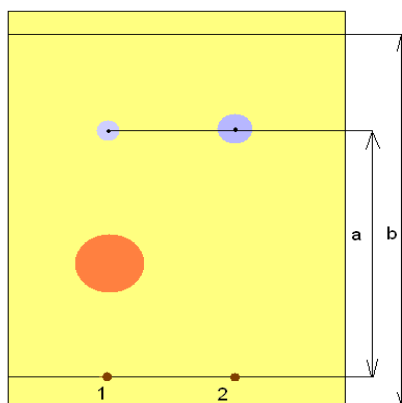


Рисунок 9 – Хроматограмма ципрофлоксацина гидрохлорида

1 – раствор ципрофлоксацина гидрохлорида, 2 – стандартный раствор примеси

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Плетенева, Т. В. Токсикологическая химия: учебник / Т. В. Плетенева. – 3-е изд., испр. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 513 с. URL: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN978-5-9704-2635-7>. – Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. – URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426357.html> (дата обращения: 02.02.2022). – Режим доступа : по подписке.
2. Вергейчик Т. Х. Токсикологическая химия : учебник / под ред. Е. Н. Вергейчик. – Москва : МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с. – Текст : непосредственный.
3. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология : учебник / ред. Р. У. Хабриев. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с. – Текст : непосредственный.

Дополнительная

1. Калетина, Н. И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебник для вузов / Н.И. Калетиной. – Москва : ГЭОТАР-МЕД, 2008. – 1015 с. – Текст : непосредственный.

Учебное издание

**Илларионова Елена Анатольевна
Сыроватский Игорь Петрович
Митина Анастасия Эдуардовна**

**ХРОМАТОГРАФИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА И
ЕЁ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕННОМ АНАЛИЗЕ**

Учебное пособие