

Исследование некоторых вариантов проточной тонкослойной хроматографии. Виноградова Р. Г., Воронцов А. М., Канев А. С., Рысьев О. А., Чечевичкин В. Н. — В кн.: Приборы для научных исследований и автоматизации эксперимента. Л., «Наука», 1982, с. 127—135.

Осуществлен метод проточной хроматографии с фотометрическим детектированием компонентов анализируемой смеси непосредственно на тонком слое. Описывается устройство для проведения рутинных анализов, которое может быть названо тонкослойным хроматографом. Показано, что хроматограммы, получаемые на установке, могут быть описаны в терминологии колоночной хроматографии. На примере разделения тестовой смеси азокрасителей на стандартных слоях показано сравнение двух вариантов проточной тонкослойной хроматографии: I — при нанесении пробы на сухой слой с последующим элюированием; II — при введении пробы в поток элюента на тонком слое. Отмечено, что вариант I не имеет преимуществ в смысле длительности анализа по сравнению с вариантом II, в то время как вариант II обладает в 6—10 раз лучшей воспроизводимостью результатов. Лит. — 11 назв., ил. — 5, табл. — 3.

*Р. Г. Виноградова, А. М. Воронцов, А. С. Канев,
А. О. Рысьев, В. Н. Чечевичкин*

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАРИАНТОВ ПРОТОЧНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) широко используется в аналитической практике наряду с колоночной жидкостной хроматографией (КЖХ). В работе [1] проводится сравнение обоих методов и, кроме того, ТСХ рекомендуется как надежный метод, с помощью которого можно предсказывать разделение на колонке. Однако обычная классическая ТСХ не обладает достаточно хорошей воспроизводимостью. В работе Кремер [2] критически рассмотрены возможности использования понятия числа теоретических тарелок для характеристики процесса разделения в ТСХ. В процессе хроматографирования в классической ТСХ пятна разных компонентов проходят различный путь по тонкому слою сорбента и, следовательно, число теоретических тарелок для ком-

понентов с разными величинами R_f , будет оценено по-разному. Кроме того, размытие хроматографических зон, на которое в условиях классической ТСХ сильно влияет движение фронта элюента, может происходить таким образом, что уширение хроматографической зоны (по которому определяется число теоретических тарелок) может стать нулевой и даже отрицательной величиной, а тогда понятие числа теоретических тарелок теряет смысл. С такой трудностью, например, сталкиваются при хроматографировании по методу клиновидных полос и сканировании полученных хроматограмм узкой щелью [3, 4].

Один из основных недостатков классической ТСХ заключается в том, что скорость движения непостоянна по длине тонкого слоя сорбента [5]. В результате разделяемые вещества сначала подвергаются действию наиболее быстро движущейся части потока подвижной фазы, скорость которой может быть намного больше оптимальной, и экспериментатор не может контролировать одну из наиболее важных переменных величин хроматографического процесса. Кроме того, при продвижении подвижной фазы через слой отношение количества подвижной фазы к стационарной не является постоянным, и вблизи фронта растворителя оно меньше, чем на некотором расстоянии от него. Поэтому вещества, находящиеся на различном расстоянии от фронта растворителя (имеющие разные величины R_f), будут находиться в неодинаковых условиях в процессе хроматографирования. Нами была проанализирована возможность реализации выдвинутого в работе [2] предложения о том, чтобы путь, пройденный пятном до регистрации, был одинаковым для каждого компонента анализируемой смеси. Это условие легко реализуется в проточной ТСХ, когда проба анализируемой смеси вводится в установившийся поток элюента в тонком слое сорбента. Исследовались два варианта разделения: I — проба наносилась на сухой слой, после чего проводилось элюирование; II — проба вводилась в слой сорбента с установившимся в нем потоком элюента. Оба варианта исследовались с целью выявления и устранения причин недостаточной воспроизводимости анализов в ТСХ.

Экспериментальная часть

Эксперименты проводились на установке, показанной на рис. 1, которую целесообразно назвать тонкослойным хроматографом, позволяющей вводить пробы анализируемой смеси как в поток элюента на тонком слое сорбента, так и на сухой слой. Внутрь стеклянной БН-камеры [6] на стеклянной пластине 1 помещался слой сорбента 2, к которому из специальной емкости 3 подавался элюент по бумажному фитилю 4, обернутому в фольгу 5. Тонкий слой был закрыт стеклянной крышкой 6. Введение пробы осуществлялось через отверстие 7 в стеклянной верхней пластине, которая для предотвращения испарения растворителя закрывалась покровным стеклом 8. Детектирование проводилось по поглощению света в видимой и УФ-области спектра. Разделительная камера закрывалась светонепроницаемым кожухом 9. Излучение радиoluminesцентного источника света 10, 11 проходило через узкую щель 12 размером 15×1.5 мм. Проходящий по тонкому слою элюент испарялся с отводящего фитиля 13 и выходил через штуцер 15 в атмосферу. Для обеспечения непрерывного потока элюента по тонкому слою фитиль обдувался воздухом от микрокомпрессора 16, 17. Расход воздуха был постоянным и составлял 0.5 л/мин. Световой поток, прошедший через тонкий слой сорбента, регистрировался при помощи фотоэлектронного умножителя 18 через световод 14. Питание ФЭУ осуществлялось через делитель напряжения 19 высоковольтным блоком 20. Пятна компонентов разделяемой смеси, проходя через зону детекции, вызывали изменение светового потока, которое регистрировалось при помощи усилителя постоянного тока 21 на самописце 22 в виде пиков на хроматограмме. В случае детектирования компонентов ана-

лизируемой смеси по поглощению света в ультрафиолетовой области спектра стеклянная разделительная БН-камера и световод заменялись кварцевыми. В описываемой установке были применены радиолюминесцентные источники [7] со световым потоком $3.2 \cdot 10^9$ и $1 \cdot 10^{10}$ квант/с и максимумом в спектре излучения соответственно 240 и 420 нм.

Хроматографическое разделение проводилось на готовых слоях «Kieselgel 60F 254» фирмы «E. Merck» (ФРГ), на слоях силикагеля «Silpearl»

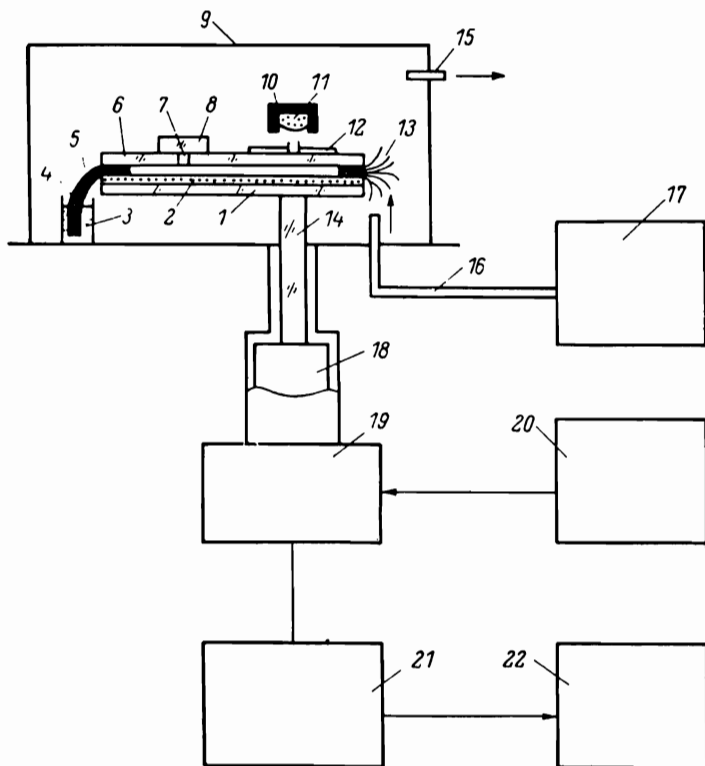


Рис. 1. Схема макета тонкослойного хроматографа.

фирмы «Kavalier» (ЧССР) и отечественного силикагеля КСК, приготовлявшихся нами с добавкой 5% гипса. В качестве подложки для тонких слоев служили стеклянные и кварцевые пластины размером $140 \times 40 \times 2$ мм. Для разделения были использованы модельная смесь 5 азокрасителей фирмы «Kavalier», растворенных в бензоле, а также смесь аминокислот отечественного производства, растворенных в воде. Ввод пробы осуществлялся микрошприцем «Hamilton» емкостью 5 мкл. Все используемые растворители соответствовали классификации «ХЧ» и дополнительной очистке не подвергались.

Обсуждение результатов

В описанной экспериментальной установке все пятна компонентов анализируемой смеси, двигаясь по тонкому слою сорбента, проходили одинаковое расстояние от места ввода пробы до зоны детекции. Это позволяет характеризовать анализируемые вещества по времени их удерживания (по аналогии с колоночной хроматографией) или же по средним скоростям движения компонентов анализируемой смеси. Параметры, характеризующие процесс разделения в КЖХ, хорошо разработаны [8, 9], и представляется целесообразным применить эти параметры в проточной

Таблица 1

Сравнение традиционных вариантов колоночной жидкостной (КЖХ), классической тонкослойной (ТСХ) и проточной тонкослойной (ПТСХ) хроматографии по некоторым характеристикам

Характеристика	КЖХ	ТСХ	ПТСХ
Использование сорбционного слоя	Многократное	Однократное	Многократное
Детектирование компонентов	В потоке элюента за сорбционным слоем	На сорбционном слое	В потоке элюента на сорбционном слое
Время элюирования компонентов	Разное	Одинаковое	Разное
Расстояние, пройденное анализируемыми компонентами вдоль сорбционного слоя	Одинаковое	Разное	Одинаковое
Скорость потока элюента	Постоянная	Разная	Постоянная
Давление элюента	Есть	Нет	Возможно
Автоматизация	Полная	Частичная	Возможна полная

Таблица 2

Оценка воспроизводимости результатов анализа в методах проточной ТСХ (I) и классической ТСХ (II) по коэффициентам изменчивости

Система сорбент—элюент	Краситель *	I			II		
		\bar{v} , мм/мин	$D(\bar{v})$	σ , %	\bar{v} , мм/мин	$D(\bar{v})$	σ , %
КСК + 5% гипса—бензол	1	1.27	0.0012	2.7	1.82	0.1480	21.1
	2	0.69	0.0000	0.0	0.95	0.0560	24.9
	3	0.54	0.0002	2.6	0.57	0.0010	5.5
	4	0.41	0.0001	2.4	0.42	0.0010	8.4
	5	0.30	0.0000	0.0	0.30	0.0012	11.5
«Silpearl» + 5% гипса—бензол	1	2.29	0.0010	1.4	3.87	0.2720	13.5
	2	1.21	0.0011	2.8	1.56	0.0710	17.1
	3	0.89	0.0000	0.0	1.04	0.0100	9.6
	4	0.60	0.0002	2.3	0.64	0.0190	21.5
	5	0.48	0.0000	0.0	0.48	0.0006	5.1

* Тестовая смесь красителей фирмы «Kavalier» (ЧССР): 1 — азобензол, 2 — диметилвый желтый, 3 — *n*-метоксиазобензол, 4 — *h*-аминоазобензол, 5 — судан III.

ТСХ. В табл. 1 приведено сравнение методов колоночной жидкостной, классической тонкослойной и проточной тонкослойной хроматографии по самым общим характеристикам.

Метод проточной тонкослойной хроматографии является видоизменением классической тонкослойной хроматографии. Сравним эти оба метода в одинаковых условиях. Такое сравнение представлено в табл. 2. Для оценки воспроизводимости нами использован коэффициент вариации (изменчивости):

$$\sigma = \frac{1}{\bar{v}} \sqrt{D(\bar{v})} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где \bar{v} — средняя величина скорости (мм/мин); $D(\bar{v})$ — дисперсия скорости (мм/мин)².

Средняя скорость движения пятна определялась как частное от деления постоянной длины рабочей части слоя на время, прошедшее от момента ввода пробы до прохождения максимума пика через зону детекции. Статистические

параметры определялись в серии из семи повторных анализов, проведенных на одной и той же пластине (после проявления и смыва пятен на выходной фитиль пластинки высушивались, регенерировались и проводилось повторное разделение). Как видно из табл. 2, результаты хроматографирования воспроизводятся в варианте проточной ТСХ в 6—10 раз лучше, чем в варианте классической ТСХ.

В табл. 3 представлены результаты хроматографирования методами проточной и классической ТСХ на различных системах сорбент—элюент. Анализ данных табл. 3, а также табл. 2 показывает, что метод классической ТСХ не дает преимуществ в скорости проведения анализа (определяющейся средней скоростью движения последнего компонента смеси) по сравнению с методом проточной ТСХ.

Таблица 3

Средние скорости движения компонентов анализируемой смеси азокрасителей при хроматографировании методом классической ТСХ (I) и проточной ТСХ (II) в бензоле и толуоле

Сорбент	Краситель *	\bar{v} , мм/мин			
		I		II	
		бензол	толуол	бензол	толуол
КСК + 5% гипса	1	1.82	1.70	1.27	0.99
	2	0.95	0.87	0.69	0.66
	3	0.57	0.46	0.54	0.38
	4	0.42	0.32	0.41	0.28
	5	0.30	0.21	0.30	0.20
«Kieselgel 60F254»	1	2.40	2.18	2.00	0.92
	2	1.72	0.71	1.33	0.42
	3	0.90	0.33	0.67	0.24
	4	0.50	0.22	0.45	0.18
	5	0.30	0.10	0.31	0.11
«Silpearl» + 5% гипса	1	3.87	2.50	2.29	2.00
	2	1.56	0.92	1.21	0.88
	3	1.04	0.53	0.89	0.51
	4	0.65	0.33	0.60	0.30
	5	0.48	0.22	0.48	0.22

* См. примечание к табл. 2.

На рис. 2 приведены типичные для обоих вариантов разделения хроматограммы. Участок кривой в начале записи сигнала детектора (рис. 2, а, в) соответствует прохождению фронта растворителя. Влияние фронта на процесс разделения в ТСХ подтверждается тем, что времена выхода «быстрых» компонентов анализируемой смеси в обоих вариантах анализа сильно отличаются. Количественное определение этих компонентов в условиях классической ТСХ тоже представляет определенные трудности. Метод проточной ТСХ не имеет этих недостатков. Были также исследованы возможности применения в методе проточной ТСХ детектирования непосредственно на слое в процессе разделения по поглощению света в УФ-области спектра. На рис. 3 представлена хроматограмма разделения смеси аминокислот.

Предел обнаружения составил для красителя судан II 10 нг/пятно, а для триптофана 50 нг/пятно.

Самостоятельный интерес представляет вопрос о форме пиков, соответствующих зарегистрированным хроматографическим зонам. Для одного из характерных пиков — компонента анализируемой смеси азокрасителей «диметиловый желтый» (см. рис. 2, 2) — нами была проведена оценка определения степени близости реализуемого в данных экспериментальных условиях распределения элементарных актов сорбции—десорбции к нор-

мальному распределению. По известной методике [10, 11] при разбиении интервала t , соответствующего 99.8% площади пика, на 11 участков было получено вполне удовлетворительное согласие с нормальным распределением. В частности, критерий Колмогорова ($\lambda \leq \lambda_{1-p}$) выполняется для уровня значимости $p_2=0.99$ ($\lambda=0.42$, $\lambda_{0.01}=0.44$), критерий Пирсона ($\chi^2 < \chi_{1-p}$) выполняется для уровня значимости $p=0.70$ ($\chi^2=2.13$;

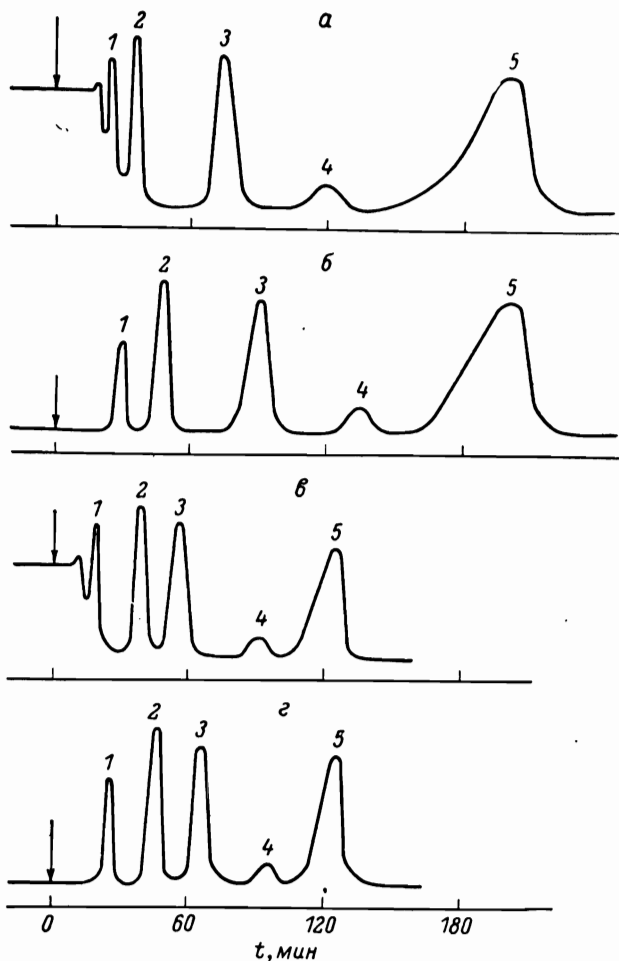


Рис. 2. Хроматографическое разделение тестовой смеси пяти азокрасителей на слоях «Kieselgel 60F254» (а, б) и силикагеле «Silpearl» +5% гипса (в, г).

Элюент — бензол. Объем пробы 0.6 мкл. Длина рабочего слоя 6 см. Разделение при введении пробы на сухой слой с последующим элюированием и при введении пробы в поток растворителя на тонком слое (б, г). Детектирование фотометрическое ($\lambda_{\max}=420$ нм). 1 — азобензол; 2 — диметилловый желтый; 3 — *n*-метоксиазобензол; 4 — *n*-аминоазобензол; 5 — судан III.

$\chi^2_{0.30}=2.19$). Отклонения от нормального распределения — асимметрия ($A=0.289$) и эксцесс ($E=1$) — не более чем в 3 и 5 раз соответственно превосходят свои среднеквадратичные отклонения ($\sqrt{D(A)}=0.11$; $\sqrt{D(E)}=0.22$).

Приведенные статистические характеристики, на наш взгляд, подтверждают возможность использования применительно к результатам разделения на тонкослойном хроматографе разработанных для КЖХ методов оценки результатов. Метод проточной ТСХ с введением пробы анализируемых веществ в поток элюента был применен для исследования влияния добавок полярного компонента в бинарном элюенте ацетон—бензол. Проба анализируемой смеси вводилась непосредственно в проток элюента

на слое. При этом на тонком слое сорбента устанавливалось определенное соотношение концентраций полярного и неполярного компонентов растворителя в отличие от обычной ТСХ, где концентрация компонентов раство-

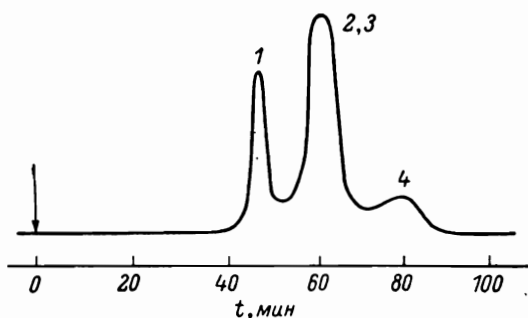


Рис. 3. Хроматографическое разделение смеси аминокислот на слое силикагеля «Silpearl» + 5% гипса.

Элюент — этанол—вода (70 : 30). Объем пробы 1 мкл. Длина рабочего слоя 6 см. Разделение при введении пробы в проток элюента на тонком слое. Детектирование по поглощению УФ-излучения ($\lambda_{\max} = 240$ нм). 1 — *n*-аминосалициловая кислота; 2 — тирозин; 3 — триптофан; 4 — гистидин.

рителя за фронтом по мере его продвижения по слою постоянно изменятся. На рис. 4 и 5 представлены зависимости величин средней скорости движения компонентов анализируемой смеси азокрасителей от процент-

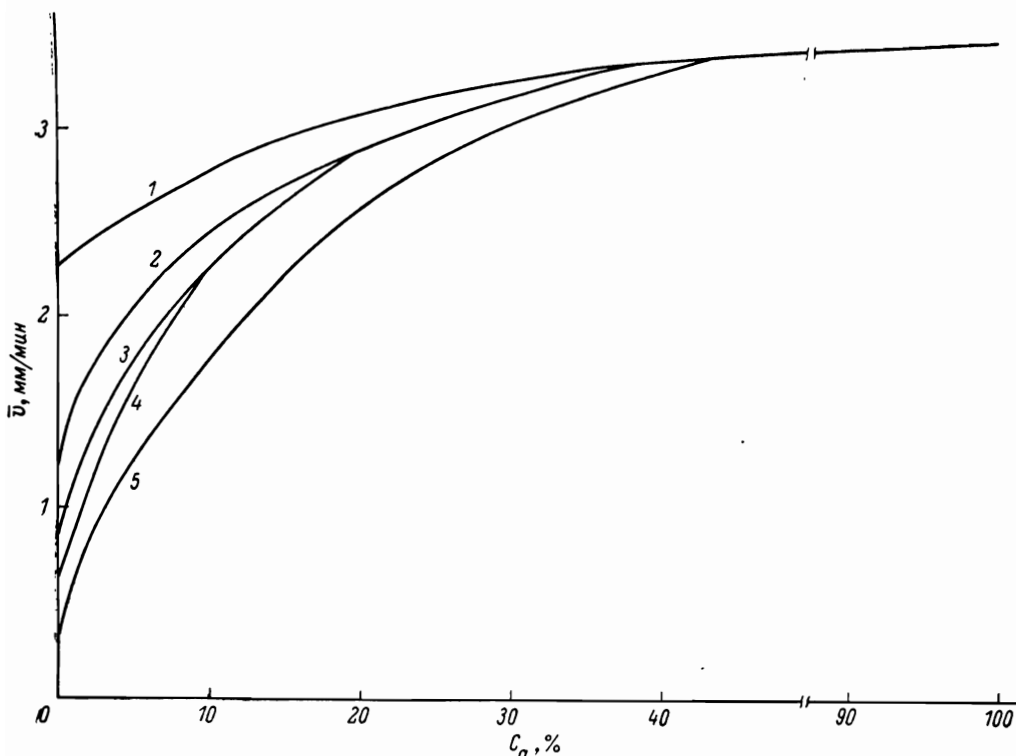


Рис. 4. Зависимость средней скорости движения компонентов модельной смеси пяти азокрасителей (1—5) от концентрации ацетона в бинарном элюенте ацетон—бензол на слое силикагеля «Silpearl» + 5% гипса.

ного содержания ацетона (C_a) в бинарном растворителе ацетон—бензол для различных слоев. По этим кривым можно выбрать соотношение компонентов бинарного растворителя для проведения анализа в заданное

время или для получения заданного разрешения. При необходимости можно подобрать растворитель такого состава, чтобы отделить заданное количество компонентов при минимальном времени анализа. Так, например, при необходимости отделить с минимальной затратой времени компоненты 1, 2 и 5 на слое «Kieselgel 60F254» оптимальным содержанием ацетона в бензоле является 15–20%, а при необходимости выделения компонентов 1 и 5 на слое «Silpearl» + 5% гипса оптимальное содержание ацетона — около 30%. Время анализа, определяемое скоростью миграции самого медленного компонента (2.1 и 3.0 мм/мин соответственно), во

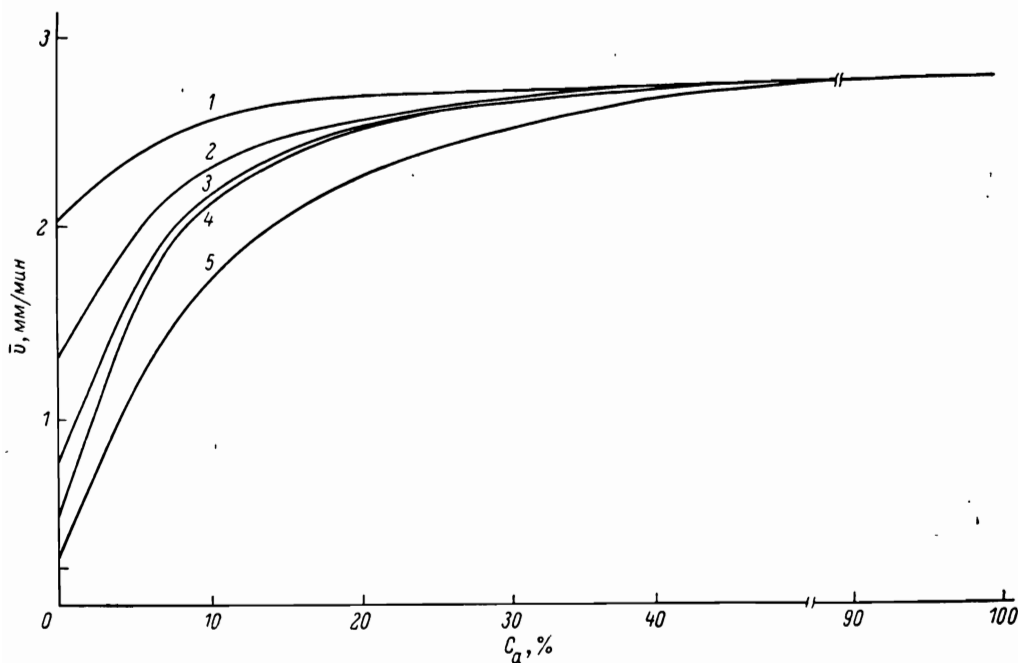


Рис. 5. Зависимость средней скорости движения компонентов модельной смеси пяти азокрасителей (1–5) от концентрации ацетона в бинарном элюенте ацетон–бензол на слое «Kieselgel 60F254».

втором случае будет примерно в полтора раза короче при прочих равных условиях.

Следует отметить, что весьма незначительная добавка (менее 5%) ацетона к бензолу вызывает довольно сильное увеличение скорости движения компонентов анализируемой смеси по тонкому слою сорбента при практически одинаковом разрешении. Дальнейшее увеличение содержания полярного компонента в бинарном элюенте уже не приводит к столь заметному увеличению средней скорости движения анализируемых веществ по слою, и разрешение при этом уменьшается.

Полученный эффект резкого увеличения средней скорости движения анализируемых веществ по тонкому слою сорбента при малом содержании полярного компонента в бинарном элюенте может быть объяснен как возрастающей конкуренцией в адсорбционном процессе между полярными молекулами разделяемых веществ на таком полярном адсорбенте, как силикагель, так и различной поляризацией молекул разделяемых веществ в присутствии полярного растворителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Netting A. G., J. Chromatogr., 1970, v. 53, N 3, p. 507.
2. Cremer E., Chromatographia, 1970, v. 3, N 11, p. 534.
3. Кобрина В. Н., Егоров Е. М., Егорова Т. Г., Журн. аналитич. химии, 1978, т. 33, № 4, с. 74.

4. *Шталь Э.* Хроматография в тонких слоях. М., 1965.
5. *Перри С., Амос Р., Брюер П.* Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М., 1974.
6. *Шталь Э.*, патент ФРГ № 1498678, 1962.
7. *Михальченко Г. А.*, ПТЭ, 1965, № 1, с. 161.
8. *Киркланд Д.* Современное состояние жидкостной хроматографии. М., 1974.
9. *Eisenbeiss F.* Modern liquid chromatography. — NONТАКТЕ, Darmstadt, 1976, N 1, p. 19; N 2, p. 17.
10. *Пустыльник Е. И.* Статистические методы анализа и обработки наблюдений. М., 1968.
11. *Налимов В. В.* Применение математической статистики при анализе вещества. М., 1960.