

543.544
К-38

С. А. Кибардин, К. А. Макаров

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА
ИЗДАТЕЛЬСТВО «ХИМИЯ»
1978

БИБЛИОТЕКА
ТЕХНИЧЕСКОЙ
ХИМИИ
М. 12

543.544
К-38

Кибардин С. А., Макаров К. А.

Тонкослойная хроматография в органической химии. — М.: Химия, 1978 г. — 128 с., ил.

В книге сделан обзор современного состояния использования метода тонкослойной хроматографии в некоторых областях органической химии: для анализа пестицидов, консервантов, антиоксидантов, органических соединений, содержащих серу, и др.

Книга предназначена для широкого круга специалистов, интересующихся проблемами использования тонкослойной хроматографии в области органической и биологической химии, микроанализа, радиохимии, пищевой и химической промышленности. Книга может представить интерес для преподавателей высших учебных заведений.

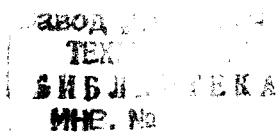
128 с., 28 табл., 10 рис., список литературы 205 ссылок.

К $\frac{20504-029}{050(01)-78}$ 29-78

© Издательство «Химия», 1978 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	4
Введение	5
Глава 1. Техника эксперимента, материалы и оборудование для тонкослойной хроматографии органических соединений	13
Глава 2. Сорбенты, применяемые в тонкослойной хроматографии органических соединений	23
Глава 3. Элюирование хроматограмм органических соединений	28
Глава 4. Тонкослойная хроматография органических кислот	48
Глава 5. Разделение изомеров органических соединений	59
Глава 6. Тонкослойная хроматография пестицидов	72
Глава 7. Тонкослойная хроматография консервантов, пищевых красителей и антиоксидантов	92
Глава 8. Тонкослойная хроматография органических соединений серы	101
Глава 9. Тонкослойная хроматография азотсодержащих соединений	111
Литература	119



ПРЕДИСЛОВИЕ

Метод хроматографии в тонких слоях в настоящее время широко используется в различных областях науки и техники. Широкое применение и развитие этого метода обусловлено рядом его преимуществ: быстротой выполнения анализа, относительной простотой метода, экономичностью и универсальностью. Метод используют для разделения и анализа микроколичеств веществ разнообразного происхождения, определения примесей в органических соединениях, качественной и количественной оценки примесей в продуктах пищевой и химической промышленности.

Возникнув первоначально как качественный метод, хроматография в тонких слоях начинает с успехом использоваться для полуколичественного и количественного определения и анализа органических соединений.

Описания экспериментальных работ по применению тонкослойной хроматографии в различных разделах органической химии разбросаны по многочисленным периодическим журналам и сборникам.

Монографии на русском языке, посвященные общим вопросам тонкослойной хроматографии и опубликованные еще в 1964—1965 гг., в настоящее время стали библиографической редкостью, а приведенные в них методики подверглись значительным модификациям. В связи с этим авторы ставили своей задачей обобщить имеющийся в литературе экспериментальный материал по применению тонкослойной хроматографии в различных областях органической химии и дать представление о современном состоянии этого метода.

В главе 1 раздел «Оборудование для тонкослойной хроматографии» написан сотрудниками СКБ аналитического приборостроения АН СССР Р. Г. Виноградовой, Ф. И. Романовым. Глава «Тонкослойная хроматография органических соединений серы» написана доктором химических наук Е. Н. Карауловой.

Авторы примут с благодарностью критические замечания и пожелания по данной работе.

ВВЕДЕНИЕ

Тонкослойная хроматография или, как ее часто называют, метод хроматографии в тонком слое адсорбента к настоящему времени получила всеобщее признание. Тонкослойную хроматографию с успехом применяют в различных областях органической, аналитической и биологической химии для анализа примесей в различных технических смесях и материалах, в фармацевтической и нефтеперерабатывающей промышленности, технологии пластических масс, сельском хозяйстве.

Метод тонкослойной хроматографии был предложен в 1938 г. Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер для разделения и анализа в тонком слое окиси алюминия некоторых алкалоидов из экстракта лекарственных растений [1]. Потребовалось, однако, еще более двадцати лет, прежде чем этот метод получил всеобщее признание. С выходом в свет работы Шталя [2] начинается новый этап в развитии хроматографии в тонких слоях. Тонкослойная хроматография становится одним из основных методов органической химии для анализа самых разнообразных органических соединений.

Хроматографический процесс в тонком слое адсорбента обеспечивается динамическим передвижением подвижной фазы (растворитель) через стационарную неподвижную фазу (адсорбент). В результате передвижения смеси растворителя и исследуемых веществ происходит разделение анализируемой смеси на компоненты, основанное на различной скорости их перемещения в слое адсорбента.

Механизм хроматографического разделения в условиях тонкого слоя в принципе не отличается от механизма хроматографии на колонках. Существенная раз-

ница, однако, заключается в том, что при тонкослойной хроматографии разделяемые соединения имеют возможность диффундировать не только в продольном, но и в поперечном направлении.

При хроматографии на колонках анализируемое вещество в обычных условиях движется вниз по колонке под действием гравитационных сил. Основными силами, действующими в тонкослойной хроматографии (при наиболее часто используемом варианте — восходящей хроматографии), являются капиллярные силы, которые преобладают над гравитационными силами. Благодаря этим силам и обеспечивается передвижение разделяемых компонентов смеси. Помимо этих сил в тонкослойной хроматографии действуют также и силы диффузии, влияющие на перемещение хроматографируемого вещества как в продольном, так и в поперечном направлении. По сравнению, например, с хроматографией на бумаге диффузия в тонком слое в значительно меньшей степени обуславливает возможность расширения пятна, что улучшает качество разделения компонентов смеси. Тонкослойная хроматография может быть восходящей, нисходящей, горизонтальной, круговой, двумерной.

Движение подвижной фазы в тонкослойной хроматографии может быть ступенчатым, прерывным или непрерывным. Тонкослойную хроматографию можно комбинировать с тонкослойным электрофорезом, тонкослойным изoeлектрическим фокусированием, тонкослойной гель-фильтрацией и т. д.

Тонкослойная хроматография была использована для анализа многих органических соединений: одно- и многоатомных спиртов, карбонильных соединений, одно- и многоосновных карбоновых кислот и их производных, ароматических соединений, аминов, органических соединений, содержащих серу, а также различных красителей [3], пептидов, белков [4], фосфолипидов [5], антибиотиков.

Хроматографическое поведение органических соединений зависит от их химического строения: наличия непредельных связей, различных функциональных групп и радикалов, их числа и положения в молекуле [3]. На хроматографическое поведение органических молекул может сильно влиять конформационное состояние молекулы. Изомеры многих органических соединений, разделение которых с помощью других методов является до-

вольно трудной задачей, могут быть легко разделены при хроматографии их в тонких слоях.

Особое значение имеет применение тонкослойной хроматографии для решения ряда задач прикладного значения, например для определения остаточных количеств пестицидов в окружающей среде. Большой интерес для определения пестицидов представляет сочетание методов тонкослойной хроматографии и ингибирования действия ферментов. Это в значительной степени увеличивает чувствительность метода.

Весьма перспективно оказалось также применение метода тонкослойной хроматографии для анализа различных консервантов и антиоксидантов, при разработке методов анализа продуктов и полупродуктов нефтехимического производства, а также для анализа органических соединений серы в различных фракциях нефти [6, с. 76—94].

Тонкослойная хроматография, возникшая как преимущественно аналитический метод, в последующем была широко использована и в качестве препаративного метода. Одной из первых работ в этом направлении была работа Кирхнера и Миллера [7]. В дальнейшем препаративная техника начинает довольно широко применяться в тонкослойной хроматографии, однако следует признать, что препаративная хроматография в тонких слоях все же не может полностью конкурировать с хроматографией на колонках.

В последние годы были предложены различные новые приемы препаративной хроматографии в тонких слоях, в том числе применение более толстых слоев, чем обычно [8]. Следует, однако, отметить, что увеличение толщины слоя [8] более чем до 750 мкм значительно ухудшает разделение анализируемой смеси. Таким образом, ограничение в толщине слоя ставит определенный предел препаративным возможностям тонкослойной хроматографии.

Одним из путей дальнейшего развития тонкослойной хроматографии будет, очевидно, применение ультрамикротонкослойной хроматографии, что позволит работать с микроколичествами вещества. Развитие тонкослойной хроматографии в этом направлении потребует разработки новой техники и, по-видимому, специальной аппаратуры. Другим возможным направлением развития тон-

кослойной хроматографии будет комбинирование хроматографии в тонких слоях с другими методами анализа. Получат дальнейшее развитие, по-видимому, методы электрофореза в тонких слоях, техника изоэлектрического фокусирования. Представляется перспективным изучение влияния магнитных полей на хроматографический процесс в условиях тонкого слоя. Новые возможности откроет, по-видимому, разработка техники градиента в тонкослойной хроматографии [9]. Это направление тонкослойной хроматографии за последние годы начинает все шире развиваться [9].

Развитие тонкослойной хроматографии, по-видимому, пойдет также в направлении разработки аппаратуры для улучшения регистрации результатов хроматографического анализа. В настоящее время, например, уже предложены для этой цели спектроденситометр, а также флуороденситометр.

Представляет существенный интерес также перспектива дальнейшего использования тонкослойной хроматографии в новых производственных процессах, например в текстильной промышленности [10].

Целесообразно кратко рассмотреть опубликованные к настоящему времени (март 1976 г.) книги и монографии по хроматографии в тонких слоях, появившиеся за последние 10—15 лет. Общим вопросам хроматографии в тонких слоях посвящены монографии [11, 12].

Технические вопросы использования тонкослойной хроматографии и характеристика многих органических соединений, которые подвергались разделению в тонких слоях, подробно разобраны в монографии А. А. Ахрема и А. И. Кузнецовой [13], много сделавших для популяризации метода тонкослойной хроматографии в нашей стране.

Следует также отметить обстоятельную монографию Рандерата [14] по тонкослойной хроматографии различных органических соединений, в основном биологически активных соединений.

Много сделали для развития и внедрения метода тонкослойной хроматографии в практику аналитических исследований Шталь [2, 15] и Кирхнер [16]. Монографии Шталя и Кирхнера являются капитальным трудом по тонкослойной хроматографии, почти энциклопедического характера, и могут служить своего рода справочным пособием. Из других представляющих интерес монографий по тонкослойной хроматографии следует отметить книги [17, 18].

Вопросам количественной оценки результатов тонкослойной хроматографии посвящены книга под редакцией Шелларда [19], а также монография Тоугстона [20], в которой рассматриваются количественные аспекты тонкослойной хроматографии с использованием для оценки результатов современных спектроденситометров и флуороденситометров. Специальная часть монографии в основном посвящена обзору по тонкослойной хроматографии биологически и физио-

логически активных соединений, а также контроль фармацевтической продукции.

Вопросам жидкостной хроматографии с использованием различных градиентов посвящена книга Литяну и др. [9], в одной из глав которой детально разбирается применение градиента для тонкослойной хроматографии. В 1974 г. опубликована монография [21] по применению тонкослойной хроматографии для анализа неорганических соединений.

Во многих из названных выше монографий и руководств по тонкослойной хроматографии помимо методических вопросов и вопросов обзорного характера обсуждаются вопросы теории хроматографии в тонких слоях. Следует, однако, отметить, что по сравнению с хроматографией на колонках теория тонкослойной хроматографии разработана еще недостаточно, и во многих случаях условия разделения смесей приходится подбирать эмпирически. Для разработки теории тонкослойной хроматографии много сделано Б. Г. Бельским и его сотрудниками [22—24].

Основной задачей хроматографического процесса является разделение исследуемой смеси на отдельные компоненты. Для того чтобы судить об эффективности хроматографического процесса, в колоночной хроматографии применяется величина, равная числу теоретических тарелок.

Понятие теоретической тарелки пришло в хроматографию из теории ректификации, где теоретическая тарелка соответствует определенному участку колонки, в которой пар и жидкость находятся в равновесии. В колоночной хроматографии эффективность работы колонки характеризуется как числом теоретических тарелок, так и высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), которая позволяет сравнивать колонки различной длины. Число теоретических тарелок пропорционально длине колонки.

В тонкослойной хроматографии для характеристики эффективности разделения на пластинках также используются указанные величины. Здесь число теоретических тарелок N определяется, как

$$N = 16 (n/m)^2$$

где n — расстояние от линии старта пятна на пластинке до нижней границы пятна; m — расстояние между нижней и верхней границами пятна на пластинке (рис. 1).

Величина H , равная высоте, эквивалентной теоретической тарелке в тонкослойной хроматографии, выражается, как

$$H = m^2/16n$$

В тонкослойной хроматографии эффективность разделения может достигать 2000 теоретических тарелок.

Величина, эквивалентная теоретической тарелке, ха-

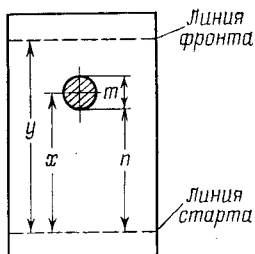


Рис. 1. Определение числа теоретических тарелок N и величины R_f при хроматографии в тонком слое:

n — расстояние от линии старта до нижней границы пятна; m — расстояние между нижней и верхней границами хроматографического пятна; x — расстояние от линии старта до центра пятна; y — расстояние от линии старта до линии фронта растворителя.

характеризует степень разделения хроматографируемых соединений в данной системе. Она зависит от объема удерживания (объем подвижной фазы, необходимый для полного элюирования данного соединения), а также от времени удерживания (время, которое требуется для элюирования данного соединения).

В данной хроматографической системе время удерживания и объем удерживания являются постоянными для данного соединения и могут служить для оценки разделительной способности системы.

В тонкослойной хроматографии важной характеристикой степени разделения хроматографируемых соединений является величина R_f — отношение расстояния от центра пятна на пластинке до линии старта (x), к расстоянию (y), пройденному растворителем (от линии старта до линии фронта) (см. рис. 1):

$$R_f = x/y$$

Величина R_f может служить и для оценки степени удерживания данного соединения в слое сорбента. Иногда величину R_f и объем удерживания в тонкослойной хроматографии используют для идентификации разделяемых компонентов хроматографируемой смеси. Величина R_f является характеристикой данного соединения, хроматографируемого на данном сорбенте в данном растворителе и в данных условиях опыта.

Величина R_f может быть выражена также отношением скорости движения исследуемого вещества ($V_{\text{оп}}$)

на пластинке к скорости передвижения фронта растворителя ($V_{\text{раств}}$):

$$R_f = V_{\text{оп}}/V_{\text{раств}}$$

Иногда подвижность соединений при хроматографии в тонких слоях оценивают по отношению к подвижности вещества, выбранного в качестве стандарта или свидетеля. Тогда

$$R_{\text{ст}} = R_f (\text{оп})/R_f (\text{свид})$$

Подвижность опытного пятна (R_x) можно также выразить как отношение пройденного пятном расстояния на пластинке ($l_{\text{оп}}$) к расстоянию, пройденному на той же пластинке соединением, выбранным в качестве свидетеля ($l_{\text{свид}}$).

$$R_x = l_{\text{оп}}/l_{\text{свид}}$$

В этом случае в отличие от R_f значение R_x может быть больше единицы.

Величины R_f и N связаны между собой уравнением:

$$R = \sqrt{N} \frac{R'_f - R''_f}{\sqrt{R'_f} - \sqrt{R''_f}}$$

где R — величина, характеризующая степень разделения компонентов смеси при хроматографии в тонких слоях, может быть названа коэффициентом разделения; R'_f и R''_f — значения R_f , соответствующие двум компонентам смеси.

Как и при хроматографии на колонках, механизм разделения опытной смеси веществ при хроматографии в тонких слоях может быть различным.

Различают следующие типы тонкослойной хроматографии: адсорбционная хроматография, основанная на различной сорбции испытуемых веществ твердой фазой сорбента, характеризуется константой сорбции; распределительная хроматография, основанная на распределении разделяемых веществ между подвижной и неподвижной жидкими фазами, характеризуется коэффициентом распределения; ионообменная хроматография, основанная на обмене ионами между растворенным веществом и ионогенными группами сорбента, характеризуется константой обмена. Необходимо отметить, что все эти виды хроматографических процессов обычно редко протекают в изолированном виде, однако один из них при этом обычно является основным.

Наконец, необходимо указать еще на один вид хроматографии, получивший развитие сравнительно позднее других разновидностей хроматографии. Это гель-хроматография или, как ее часто называют, ситовая хроматография или гель-фильтрация. В основе гель-хроматографии лежит распределение компонентов разделяемой смеси веществ между подвижной фазой — растворителем, находящимся в свободном состоянии, и неподвижной фазой — жидкостью, находящейся во внутренних порах или полостях полимерных гелей. Разделение зависит от размеров молекул разделяемой смеси. Большие молекулы, которые не могут проникать в поры геля, первыми вымываются из неподвижной фазы. Полимерные гели в этом виде хроматографии играют роль сита, разделяющего смесь в соответствии с размерами составляющих ее молекул.

В ситовой хроматографии наряду с фильтрацией определенную роль играют также адсорбционные процессы, протекающие между поверхностью геля и молекулами разделяемых веществ.

Коэффициент распределения в распределительной хроматографии, так же как константа сорбции в адсорбционной, характеризуется отношением концентрации анализируемого соединения, находящегося в неподвижной фазе, к концентрации этого соединения в подвижной фазе.

Между величиной R_f и коэффициентами распределения и адсорбции существует зависимость, выражаемая уравнением:

$$K = \frac{1}{q} \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

где q — отношение объемов подвижной (V_m) и неподвижной (V_s) фаз, $q = V_m/V_s$ (в тонкослойной хроматографии V_m определяется экспериментально на стандартной пластинке); V_s — объем твердой фазы.

ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Техника метода хроматографии в тонких слоях состоит в последовательном выполнении ряда приемов и операций. Сначала производят подборку пластинок или подложек соответствующего размера, являющихся носителями сорбционного слоя. На подготовленную соответствующим образом пластинку наносят слой адсорбента, который является неподвижной фазой в тонкослойной хроматографии. Сорбционный слой, если необходимо, высушивают и иногда подвергают активированию.

Следующий этап — нанесение на нижний край пластинки с адсорбентом проб испытуемого вещества. Пробу наносят, как правило, на расстоянии 1,5 см от нижнего края пластинки.

Подготовленную таким образом пластинку помещают в камеру для хроматографии, куда предварительно наливают нужный растворитель или элюирующий раствор. Свободный перемещающийся растворитель играет здесь роль подвижной фазы. Неподвижной фазой служит адсорбционный слой сорбента с пленкой растворителя, удерживаемого частицами сорбента.

В процессе хроматографии растворитель под действием капиллярных сил (в случае наиболее часто применяемой восходящей хроматографии) поднимается вверх по пластинке, достигает места нанесения анализируемых веществ и перемещает их. По мере продвижения растворителя происходит разделение анализируемой смеси веществ в зависимости от их сродства к сорбенту.

После окончания хроматографического процесса пластинку с сорбентом вынимают из камеры, отмечают линию фронта, до которой поднялся растворитель, и обрабатывают специальными реагентами для обнаружения пятен.

Приготовление хроматографических пластинок и нанесение сорбционной массы на пластинки. В тонкослойной хроматографии органических соединений в качестве пластинок-подложек чаще всего употребляют стеклянные пластинки различных размеров, удобные тем, что их можно легко очищать и использовать многократно.

Наиболее употребительные размеры стеклянных пластинок: 5×15 , 10×20 , 20×20 , 20×40 см и другие. В последнее время для микротонкослойной хроматографии используют пластинки размером $3,0 \times 8,0$ или $2,5 \times 7,5$ см. Размер пластинок определяется задачей, которая стоит перед экспериментатором, и количеством вещества, подвергаемого хроматографии.

Помимо стеклянных пластинок в тонкослойной хроматографии органических соединений применяют также пластинки из алюминиевой фольги, пластика и других материалов.

Выбирая пластинки для эксперимента, необходимо учитывать, что для воспроизводимости результатов необходимо употреблять пластинки одинаковых размеров, полученные из одного и того же материала.

Стеклянные пластинки перед нанесением на них сорбционной массы должны быть тщательно обезжирены обработкой свежеприготовленной хромовой смесью обычно в течение суток или 1%-ным раствором детергента с последующей промывкой пластинок дистиллированной водой.

Обезжиренные, промытые и высушенные пластинки необходимо предохранять от пыли и различных паров органических соединений, находящихся в воздухе; хранить пластинки можно в эксикаторе или в полиэтиленовых мешочках. Брать пластинки необходимо за ребра, не касаясь их поверхности.

Ответственной операцией является нанесение на пластинки массы сорбента. От качества нанесенного слоя в значительной мере зависит успех хроматографического разделения.

Подготовленная сорбционная масса наносится ровным слоем на горизонтальную поверхность пластинки при помощи специального прибора или ручным способом. Чтобы добиться строго горизонтального положения пластинки, рекомендуется пользоваться уровнем. Удобен

также для этой цели небольшой специальный столик, высоту и наклон которого можно легко регулировать.

Существуют различные способы нанесения сорбционной массы на пластинки: намазывание массы с помощью специального прибора или ручным способом, налив суспензии сорбента на пластинку, погружение пластинки в суспензию с сорбентом, опрыскивание пластинки разбавленной суспензией сорбента.

Наибольшее распространение получил способ намазывания сорбента на пластинку (в случае густой массы) и способ поливки (при наличии жидкой суспензии сорбента). В последнем случае при ручном нанесении суспензию наливают на пластинку, окружая иногда края пластинки небольшой плоской лейкопластыря для предотвращения сливания суспензии с пластинки.

Установлено, что оптимальная толщина сорбционного слоя составляет 0,15—0,25 мм. Однако в том случае, когда опыт проводится с препаративной целью, толщину слоя необходимо увеличить до 0,50—0,75 мм.

Сорбент, нанесенный на пластинки в виде водной суспензии, обычно содержит избыточное количество воды, которую необходимо удалить. Сушку пластинок с сорбентом осуществляют на воздухе при комнатной температуре или в токе воздуха. Затем пластинки с сорбентом сушат в вертикальном положении при 383 К (110 °С) в течение 30 мин.

В процессе сушки необходимо избегать загрязнения пластинок пылью или парами летучих соединений, которые могут находиться в воздухе, появления трещин в поверхностном слое сорбента. Иногда пластинки с силикагелем или окисью алюминия подвергают активированию — дополнительно нагревают в течение 3—4 ч при 423 К (150 °С).

В тонкослойной хроматографии органических соединений слой сорбента может быть закрепленным и незакрепленным, в зависимости от задач, которые возникают перед экспериментатором. При использовании незакрепленного слоя сорбент находится на пластинке в свободном состоянии, без добавления каких-либо связующих веществ. Закрепленный слой сорбента содержит связующие вещества, добавленные в сорбционную массу с целью придания большей прочности слою. В качестве связующих веществ в тонкослойной хроматографии

часто используют медицинский гипс или очищенный крахмал. Крахмал отмывают многократно водой, к которой добавлено небольшое количество четыреххлористого углерода или хлороформа, отфильтровывают на воронке Бюхнера и сушат на воздухе.

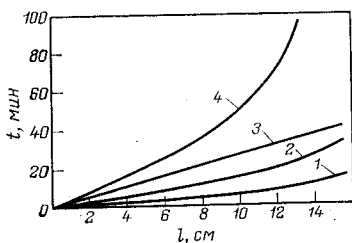


Рис. 2. Зависимость длины пути, пройденного растворителем (CCl_4) на пластинках с силикагелем различных марок, от времени:

1 — 2Pi-1; 2 — 2P-2; 3 — 2N-1;
4 — D2H-1.

Существенно важным при хроматографии в тонких слоях является необходимость добиваться по возможности стандартных и однородных по качеству адсорбционных слоев на пластинке. Воспроизводимость результатов в значительной степени зависит от характера и структуры адсорбционных слоев.

Недавно была предложена простая методика для оценки стандартности слоев адсорбента на пластинке по определению скорости потока подвижной фазы на пластинке с адсорбентом [25]. Длина пути (l), пройденного растворителем за время (t), является функцией времени для стандартного растворителя на разных адсорбентах (рис. 2):

$$l = f(t)$$

Пользуясь такой зависимостью, можно быстро проводить оценку различных адсорбционных слоев на пластинках, добиваясь их максимальной унификации и стандартизации.

Изучению вопроса применения различных типов адсорбентов при хроматографии в тонких слоях посвящена также работа [26]. Использовались различные формы силикагелей, окись алюминия, кизельгур, полиамиды и некоторые другие сорбенты, изучалось поведение некоторых соединений на адсорбционных слоях, обладающих различными поверхностными свойствами.

Оборудование для тонкослойной хроматографии*.

Комплект оборудования для тонкослойной хроматографии (ТСХ) наряду с аналитическими весами, рН-метром, ИК-спектрометром, газовым или жидкостным хроматографом должен входить в стандартное оборудование любой аналитической лаборатории. Этот комплект позволяет стандартизировать метод ТСХ, что очень важно при сравнении методик и результатов анализов, полученных различными исследователями.

Описаны [27] различные комплекты оборудования, выпускаемые более чем 100 фирмами.

Первым отечественным набором оборудования для ТСХ является комплект КТХ-01, разработанный СКБ аналитического приборостроения АН СССР совместно с Институтом высокомолекулярных соединений АН СССР [28, 29].

Комплект КТХ-01 включает оборудование для приготовления хроматографических пластин; для нанесения пробы; для хроматографирования восходящим, нисходящим, горизонтальным, проточным и градиентным методами; для проявления хроматограмм химическим способом; для просмотра хроматограмм в ультрафиолетовом свете и их фоторегистрации.

Для проведения качественного и количественного анализа веществ, меченных изотопами, дополнительно предусмотрена сцинтилляционная хроматографическая установка УСХ-1.

Оборудование для приготовления хроматографических пластин (рис. 3). Оборудование, входящее в комплект КТХ-01, позволяет использовать стеклянные пластины размером 60×60 и 60×100 мм для микрохроматографии и пластины размером 100×100 , 100×200 и 200×200 мм для аналитической и полупрепаративной хроматографии.

Суспензию сорбента наносят на пластины с помощью аппликатора 3. Толщину наносимого слоя сорбента можно регулировать в пределах $0,05 \pm 0,02$ мм. Неравномерность толщины слоя на каждой пластине и воспроизводимость толщины слоя в одной серии пластин не превышает 10%.

Суспензию сорбента готовят при помощи мешалки 2, укомплектованной стаканами емкостью 50, 250 и 500 см³.

* Раздел написан Р. Г. Виноградовой и Ф. И. Романовым.

Завод...
ТЭЛ...
ЭИ...
ИНВ. №

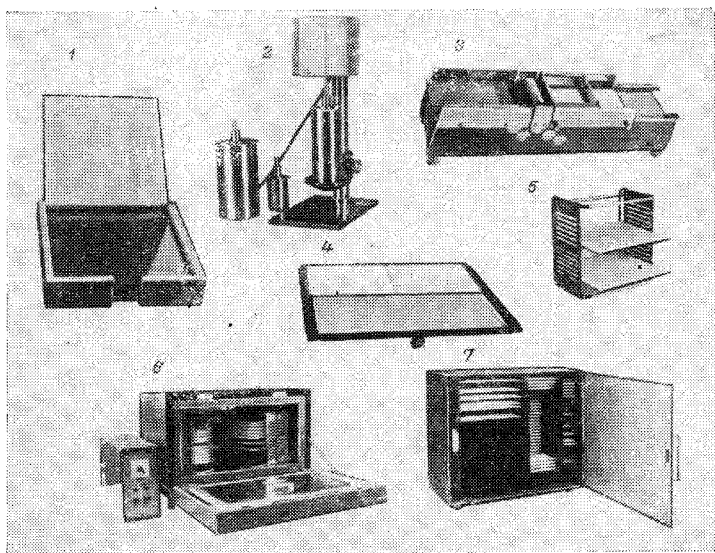


Рис. 3. Оборудование для приготовления хроматографических пластин:

1 — коробка с пластинами; 2 — мешалка; 3 — аппликатор; 4 — столик для сушки пластин; 5 — камера сушки и активации; 6 — стойка для пластин; 7 — шкафчик для хранения пластин.

После нанесения суспензии пластины укладывают в горизонтальном положении на столик для предварительной сушки на воздухе.

Дальнейшая сушка и активация хроматографических пластин осуществляется в камере 5 при температурах 308—498 К (35—225 °С). Готовые пластины хранят в герметичном шкафу 7.

Оборудование для нанесения проб на хроматографические пластины (рис. 4). Нанесение пробы на тонкослойные пластины может осуществляться шприцевым дозатором 1, сильфонным дозирующим устройством 2 или автоматическим дозатором 3. Шприцевым дозатором можно одновременно нанести на пластину от одного до пяти анализируемых веществ. При необходимости нанесения на хроматографическую пластину ядовитых или радиоактивных жидкостей используют сильфонное дозирующее устройство, которое состо-

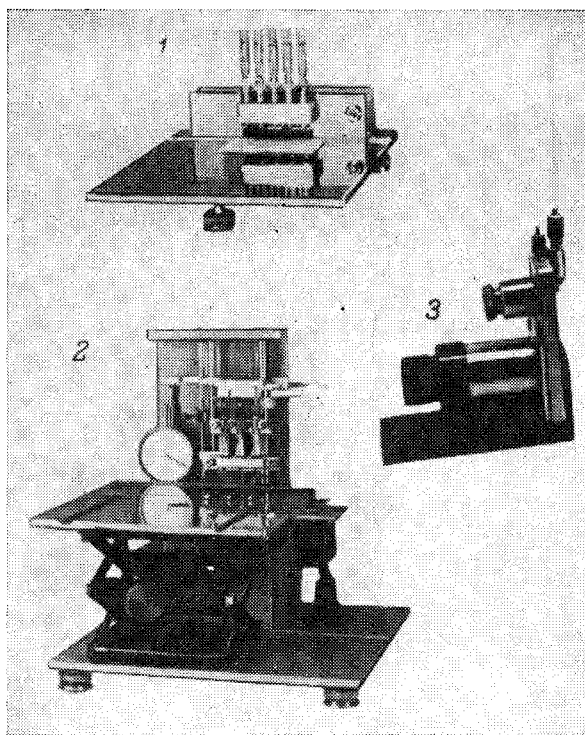


Рис. 4. Оборудование для нанесения пробы:

1 — шприцевый дозатор; 2 — сильфонное дозирующее устройство; 3 — автоматический дозатор.

ит из сильфонного насоса и набора пипеток. Для точечного нанесения сильно разбавленных растворов применяют автоматический дозатор.

Размер пятен пробы на хроматографической пластине зависит от установленного расстояния между иглами шприцев и слоем сорбента, нанесенного на пластину. При минимальном расстоянии можно получить пятно размером не более 3 мм при объеме пробы 100 мкл.

Оборудование для проведения тонкослойной хроматографии (рис. 5). Хроматографирование пластин с незакрепленным слоем сорбента нисходящим и проточным методами осуществляется в специальных камерах.

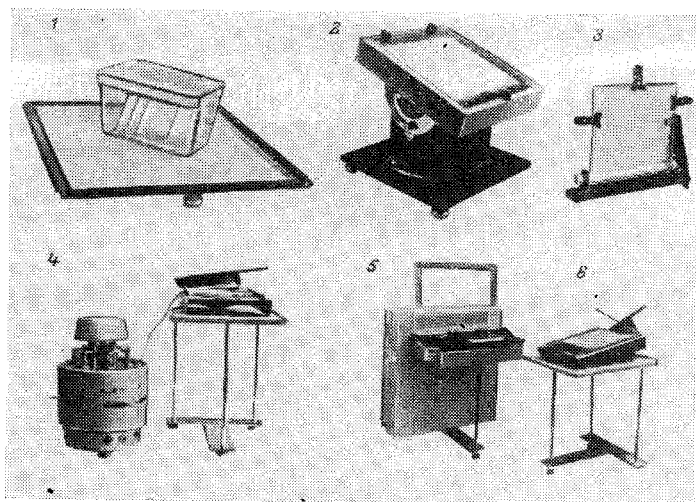


Рис. 5. Оборудование для проведения хроматографии:

1 — сосуд для хранения пластин; 2 — камера для проведения хроматографии на пластинах с незакрепленным слоем сорбента; 3 — С-камера; 4 — автоматическое устройство для получения градиентных растворов; 5 — проточная камера с устройством для подачи элюента на хроматографическую пластину.

При хроматографировании пластин с закрепленным слоем сорбента без насыщения объема камеры парами растворителя используют С-камеры, позволяющие производить одновременное хроматографирование восходящим методом двух пластин.

Для проведения тонкослойной хроматографии методом градиентной элюции в комплекте КТХ-01 предусмотрены автоматическое устройство для создания градиента (автоград) с капиллярными резервуарами для хранения градиентных растворов 4 и проточная камера 5.

Оборудование для проявления хроматограмм химическим методом (рис. 6). Тонкослойные пластины помещают для проявления в специальные камеры 1 и опрыскивают из распылителя 2 химическими реагентами, дающими цветные реакции с разделенными веществами. Если химическое воздействие реагента с разделенными веществами происходит только при повышенной температуре, то пластину после опрыскивания помещают в камеру проявления, которая по конструкции идентична камере сушки и активации (см. рис. 3) и отличается только меньшими размерами.

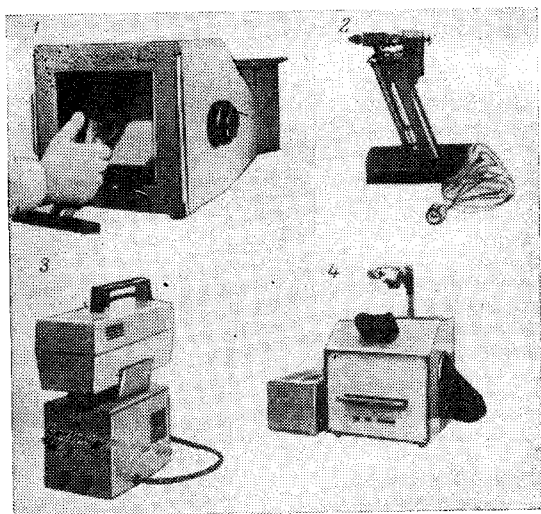


Рис. 6. Оборудование для проявления и обнаружения в ультрафиолетовом свете и фоторегистрации хроматограмм:
 1 — камера для опрыскивания; 2 — распылитель; 3 — ручной УФ-осветитель;
 4 — УФ-осветитель с фотографической приставкой.

Оборудование для просмотра хроматограмм в ультрафиолетовом свете и их фоторегистрация. Для обнаружения хроматографических пятен, флуоресцирующих в УФ-свете или поглощающих УФ-излучение, в комплекте КТХ-01 имеются два источника света 3 на 254 и 365 нм. Блок осветителя оборудован фотоприставкой 4 с фотоаппаратом «Зенит».

Фотоприставкой осуществляется репродукционная фотосъемка хроматограмм. Возможно осуществление документации хроматограмм контактным методом в белом и УФ-свете, а также методом контактной люминисцентной адсорбционной фотопечати.

Оборудование для анализа веществ, меченных изотопами. Для регистрации веществ, меченных тритием, радиоактивным углеродом и другими изотопами, в комплекте имеется хроматографическая установка УСК-1, в которой используется сцинтилляционный метод измерения радиоактивности (рис. 7).

Для регистрации радиоактивности этой установкой в процессе приготовления тонкослойных пластин в сорбент

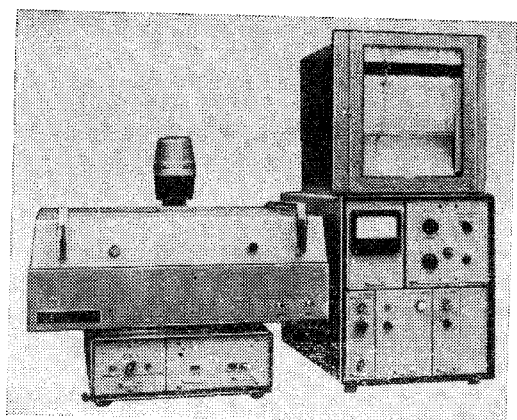


Рис. 7. Сцинтилляционная хроматографическая установка УСХ-1.

вводят неорганические сцинтилляторы — светосоставы на основе цинка (К-60, К-67, К-71 и др.). Порог чувствительности установки УСХ-1 составляет 10^{-8} Ки по тритию и 10^{-9} Ки по ^{14}C .

Установка УСХ-1 состоит из сканирующей стойки, измерительной стойки и стойки самопишущего потенциометра.

Сканирующее устройство установки позволяет просматривать хроматограммы размером до 200×200 мм в двух направлениях со скоростями 1,0; 4,0; 10 и 30 мм/мин.

В сканирующей стойке помещается датчик радиоактивности — одноканальный сцинтилляционный счетчик с малошумящим фотоумножителем ФЭУ-97, на фотокатоде которого устанавливается диафрагма размером 5×5 или $2,5 \times 5$ мм.

Вывод информации производится либо в виде аналоговой записи в логарифмическом масштабе, либо на фотопленку для получения масштабной карты распределения радиоактивности. Фотозапись производится с помощью неоновой лампы, число вспышек которой соответствует числу импульсов, полученных с фотоумножителя.

Предусмотрена также возможность вывода информации на вычислитель — интегратор «Вихрь».

СОРБЕНТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Для успешного проведения хроматографического анализа существенное значение имеет выбор и подготовка необходимых сорбентов.

Из многочисленных сорбентов в тонкослойной хроматографии органических соединений наибольшее употребление получили силикагели и окись алюминия. Кроме этих адсорбентов используют природные и синтетические полимеры органического и неорганического происхождения.

Общие требования к сорбентам, используемым в тонкослойной хроматографии, обычно сводятся к следующему. Сорбент должен быть устойчив по отношению к среде, в которой он будет использован, обладать максимальной способностью к сорбции данного вещества и достаточной механической прочностью, быть доступным и относительно дешевым материалом. В настоящее время общее количество сорбентов, используемых в хроматографии, достаточно велико [30].

Ниже приведены краткие характеристики сорбентов, наиболее часто используемых в тонкослойной хроматографии для анализа и разделения органических соединений.

Силикагель. Силикагель — гидрофильный сорбент, часто применяемый для хроматографии органических соединений.

Химические свойства силикагеля обусловлены наличием на его поверхности функциональных групп. Наличие групп Si—OH было подтверждено с помощью ИК-спектроскопии [31—39]. Считают, что OH -группы находятся на вершинах тетраэдров, выходящих на поверхность скелета силикагеля. При прокаливании при

высокой температуре за счет гидроксильных групп у соседних тетраэдров образуется силоксановая связь. Так как этот процесс сопровождается изменением взаимной ориентации тетраэдров, то на поверхности возникают напряженные «активные кислородные мостики», которые служат активными центрами в каталитических реакциях. На поверхности могут существовать как удаленные друг от друга на расстояние, большее 0,3 нм, и поэтому не взаимодействующие друг с другом «свободные» гидроксильные группы, так и расположенные на расстоянии, меньшем 0,3 нм, связанные водородной связью гидроксильные группы [31].

Вследствие этого кроме адсорбционных свойств силикагель обладает также ионообменными свойствами. Являясь гидрофильным сорбентом, силикагель обычно мало пригоден для сорбции веществ из водных растворов. Нейтральный силикагель употребляется для разделения нейтральных и основных соединений. Силикагель, обработанный уксусной или щавелевой кислотой, используется для хроматографии соединений кислотного характера.

Структура и пористость силикагеля зависят от способа и условий его получения. Силикагели, выпускаемые разными промышленными фирмами, обычно довольно сильно отличаются по свойствам и размерам пор, pH поверхности и, следовательно, обладают различными сорбционными свойствами, что делает необходимым проводить оценку каждой новой партии силикагеля.

Силикагель, применяемый в тонкослойной хроматографии, имеет обычно размер частиц 0,07—0,10 мм. Таким условием удовлетворяет силикагель КСК отечественного производства, образующий прочный слой сорбента на пластинке.

В настоящее время выпускаются сорта силикагеля специально для тонкослойной хроматографии.

Очень удобны готовые, с нанесенным тонким слоем силикагеля пластинки для хроматографии в тонких слоях (самag D-0, DS-0, DF-0 и другие) с размерами 10×10, 20×20, 20×40 см.

В качестве основы чаще всего используют стекло или алюминиевую фольгу, могут быть использованы и полимерные материалы.

Толщина слоя сорбента обычно составляет 0,1—0,2 мм. В качестве связующего вещества для получения однородного прочного слоя к сорбенту иногда добавляют гипс (5—20%) или крахмал (2—5%), для идентификации разделяемых соединений в слой часто добавляют различные флуоресцирующие вещества.

Активность силикагеля зависит от содержания в нем воды. Чем меньше содержание воды, тем выше активность силикагеля. Ниже приведена шкала активности силикагеля по Брокману:

Активность	I	II	III	IV	V
Количество воды, % .	0	10	12	15	20

Оксид алюминия. В тонкослойной хроматографии органических соединений оксид алюминия как сорбент используется достаточно широко и применяется для анализа различных соединений. Применяют выпускаемую нашей промышленностью «оксид алюминия для хроматографии», образующую на пластинке прочный слой сорбента.

Оксид алюминия может быть в различных формах: основной, нейтральной и кислой. Основную оксид алюминия употребляют для хроматографии соединений основного характера, таких как амины, основные аминокислоты и т. п. Кислую оксид алюминия используют для хроматографии веществ кислотного характера, например карбоновых кислот, кислых аминокислот и других. Нейтральную оксид алюминия обычно применяют для хроматографии из неводных растворов органических соединений, таких как предельные углеводороды, альдегиды, кетоны, спирты, фенолы, эфиры.

По сравнению с органическими сорбентами, например с целлюлозой, оксид алюминия имеет большую термостойкость. Перед употреблением оксид алюминия часто активируют нагреванием при 130 °С. Активность окиси алюминия зависит от содержания воды в сорбенте. Ниже приведена шкала активности окиси алюминия по Брокману:

Активность	I	II	III	IV	V
Количество воды	0	3	6	10	15

Активность неизвестного образца окиси алюминия можно определить при помощи хроматографии в тонких слоях, используя стандартный набор красителей и в ка-

честве растворителя — четыреххлористый углерод. Активность опытного образца определяют, сравнивая полученные значения R_f красителей со значениями, приведенными в табл. 1.

Таблица 1. Значения R_f стандартных красителей в тонком слое окиси алюминия

Краситель	Активность по Брокману			
	II	III	IV	V
Азобензол	0,59	0,74	0,85	0,95
<i>n</i> -Метоксиазобензол	0,16	0,49	0,69	0,89
Судан 1	0,01	0,25	0,57	0,78
Судан 4	0,00	0,10	0,33	0,56
<i>n</i> -Аминоазобензол	0,00	0,03	0,08	0,19

Многие зарубежные фирмы выпускают пластинки с тонким слоем окиси алюминия, готовые к употреблению в тонкослойной хроматографии. В качестве подложки используют обычно силикатное стекло. Толщина слоя сорбента составляет 0,10—0,15 мм.

Иногда в слой окиси алюминия добавляют в качестве связующего вещества крахмал или гипс.

Кизельгур. Кизельгур — сильнопористый сорбент, довольно часто используемый в качестве носителя при хроматографии. Это вещество дает прочный нейтральный слой сорбента и употребляется для хроматографии кетокислот, оксикислот, лактонов и других органических соединений. Иногда кизельгур используют в смеси с силикагелем или гипсом.

Целлюлозные порошки. Из органических полимеров природного происхождения довольно часто используют порошки целлюлозы.

Удобны и просты в употреблении выпускаемые различными фирмами пластинки с целлюлозами, специально предназначенные для хроматографии в тонких слоях. Наиболее часто используют ДЭАЭ-целлюлозу, эктеола-целлюлозу, РЕИ-целлюлозу, целлюлозы MN-300 и многие другие.

В настоящее время известно до 57 разновидностей различных целлюлоз, используемых в тонкослойной хроматографии.

Порошки целлюлозы образуют обычно достаточно прочные слои в ряде случаев и без добавления связующего материала. В качестве подложки обычно используют стекло или алюминиевую фольгу, толщина слоя сорбента 0,10—0,20 мм.

Полиамидные сорбенты. В последнее время полиамидные сорбенты с успехом применяются в тонкослойной хроматографии самых различных органических соединений. Полиамидные сорбенты могут быть получены в виде белого гигроскопического порошка. Отечественная промышленность выпускает полиамидный сорбент типа «капрон». За рубежом выпускаются полиамидные сорбенты как в виде порошков, так и в виде готовых к употреблению пленок или листов.

Полиамидные сорбенты устойчивы к действию многих органических растворителей, но гидролизуются под действием концентрированных минеральных кислот и щелочей, разрушаются под воздействием окислителей.

Сорбционные свойства полиамидных сорбентов, как отечественных, так и зарубежных, колеблются в довольно широких пределах (от 0,31 до 1,15 мг сорбируемого вещества на 100 мг сорбента). Сорбция на полиамидных сорбентах полностью обратима. Недостатком этих сорбентов является полидисперсность исходных смол и наличие примесей.

Техника хроматографии в тонких слоях на полиамидных сорбентах существенно не отличается от общепринятой.

Для приготовления суспензии сорбента используют различные органические растворители (этиловый или метиловый спирт, этилацетат, бензол и другие).

Более подробно техника работы с полиамидными сорбентами (в том числе и на тонких слоях) описана в монографии [33], а также в работе [34].

ЭЛЮИРОВАНИЕ ХРОМАТОГРАММ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

После нанесения опытных проб на пластинку с адсорбентом последнюю помещают в камеру для хроматографии, на дно которой предварительно наливают небольшое количество растворителя (подвижная фаза); высота жидкости $\sim 0,5$ см.

К настоящему времени предложено много разновидностей камер для хроматографии в тонких слоях [2, 13, 14, 16, 27]. Удобной в работе оказалась так называемая сэндвич-камера или С-камера, для которой необходимо небольшое количество растворителя. Задней стенкой в С-камере служит пластинка с адсорбентом, а передней стенкой — стекло такого же размера. При употреблении С-камер не требуется предварительного насыщения камеры растворителем и обеспечивается экономия элюирующего раствора.

При работе с камерами другого типа необходимо предварительное насыщение камеры парами растворителя. Степень насыщения камеры парами растворителя в значительной мере влияет на величину R_f .

При хроматографии органических соединений в тонких слоях используют как смешивающиеся, так и не смешивающиеся с водой растворители:

Растворитель	Т. кип., °С	Смешиваемость с водой*
Метиловый спирт	67,7	+
Этиловый спирт	78,4	+
Ацетон	56,5	+
Пиридин	115,3	+
Этилацетат	77,1	слабо
Хлороформ	61,3	—
Четыреххлористый углерод	76,8	—
Бензол	80,1	—
Циклогексан	81,0	—
Гептан	98,4	—
Гексан	69,0	—

* + — смешивается; — — не смешивается.

Необходимо обращать внимание на чистоту растворителей. Иногда требуется проводить дополнительную очистку растворителей.

В зависимости от направления движения растворителя и от положения пластинки с сорбентом различают восходящую, горизонтальную и нисходящую тонкослойную хроматографию. В методе восходящей хроматографии растворитель поднимается по пластинке снизу вверх под действием капиллярных сил. Пластинку ставят в камеру и погружают в растворитель приблизительно на 0,5—1,0 см.

При работе с закрепленным слоем продвижение растворителя на пластинке обычно не должно превышать 10—12 см, так как в противном случае наблюдается замедление движения фронта растворителя, диффузия пятен и большие колебания R_f . При работе с незакрепленными слоями пластинку обычно ставят под углом 10—15°, длина продвижения растворителя на пластинке обычно не вызывает больших колебаний R_f .

Метод нисходящей хроматографии характеризуется подачей растворителя на пластинку сверху вниз. В этом случае в верхнюю часть камеры над пластинкой с сорбентом помещают лоток, содержащий растворитель. Лоток соединяют с пластинкой при помощи фильтровальной бумаги. Скорость подачи растворителя при этом можно регулировать, используя фильтровальную бумагу различной толщины.

При горизонтальной хроматографии в тонких слоях пластинка в камере расположена строго горизонтально. В зависимости от способа подачи растворителя и приема, применяемого для нанесения пробы, могут быть следующие разновидности метода.

1. Метод круговой хроматографии, когда исследуемую пробу наносят в центр пластинки с адсорбентом и туда же по каплям добавляют растворитель. После разделения получаются кольцевые концентрические зоны разделяемых веществ.

2. Горизонтальная хроматография в камерах; растворитель подается в виде полосы.

3. Метод свободного испарения растворителя [35]. При этом способе растворитель после прохождения некоторого расстояния (на пластинке) в закрытой камере переходит в открытое пространство или в открытую ка-

меру, где имеет возможность свободно испаряться. При этом может быть осуществлено и принудительное испарение растворителя, например при помощи вентилятора.

Двумерная хроматография. Иногда при хроматографии в тонких слоях применяют специальную технику с целью получать лучшее разделение испытуемых веществ и добиться концентрирования хроматографируемых соединений, например, проводят разделение сначала в одном направлении, а затем в другом, перпендикулярном первому.

Интересен также другой прием, позволяющий сконцентрировать и затем препаративно выделить хроматографические пятна, полученные после разделения опытной смеси на тонких слоях [36]. Сначала проводится обычное разделение в одном направлении. Затем хроматографические пятна (видимые, например, в ультрафиолете) оставляют на пластинке в виде небольших выступов, удаляя адсорбент с части пластинки. После этого на выступы с пятнами накладывают небольшие полоски фильтровальной бумаги и производят разделение в направлении, перпендикулярном первоначальному (рис. 8).

В некоторых случаях для лучшего разделения смеси проводят двумерную хроматографию, используя пластинку с двумя различными адсорбентами. Таким способом на пластинке с кремневой кислотой и активированным углем была разделена смесь кетонов [16]. Хроматографию кетонов в одном направлении осуществляли при помощи системы растворителей бензол — этиловый

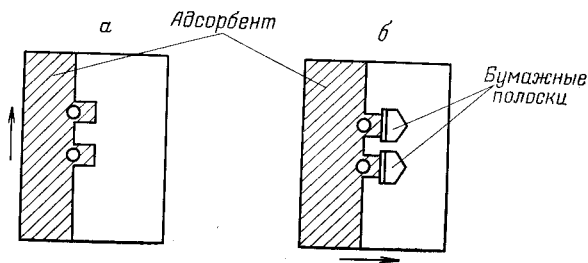


Рис. 8. Концентрирование пятен и перевод их на полоски бумаги:
а — пластинка с частично удаленным после разделения в одном направлении слоем сорбента;
б — разделение в направлении, перпендикулярном первому, и перевод пятен на полоски бумаги.

эфир — уксусная кислота (82 : 9 : 9), во втором направлении — бензол — этиловый эфир (85 : 15).

Градиентная хроматография. В последнее время в тонкослойной хроматографии все шире начинает использоваться метод градиентной жидкостной хроматографии [9]. По сравнению с обычными условиями хроматографии использование различных видов градиента позволяет значительно улучшить разделение анализируемой смеси и расширяет возможности этого метода.

В тонкослойной хроматографии могут быть применены следующие типы градиента.

1. *Градиент подвижной фазы* может быть вызван изменением концентрации элюирующего раствора (градиент концентрации), изменением полярности элюирующих растворов (градиент полярности), изменением pH в процессе хроматографии (градиент pH).

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

3. *Градиент среды* может быть обусловлен изменениями температуры, толщины слоя сорбента, изменениями летучести растворителей при хроматографии, а также некоторыми другими причинами.

При хроматографии в тонком слое можно использовать также и различия в направлении этих градиентов на пластинке по отношению к направлению потока элюирующего раствора.

Градиент подвижной фазы. В этом случае в процессе хроматографии происходит непрерывное изменение концентрации (или полярности, или pH) подвижной фазы.

Градиент концентрации подвижной фазы был использован [37] для разделения нуклеотидов на ДЭАЭ-целлюлозе. Для создания градиента концентрации элюирующего раствора (раствор бикарбоната аммония) использовали двухкамерный аппарат, перемешивание раствора осуществляли при помощи магнитной мешалки. На конце пластинки находилась бумажная масса для удаления избытка элюента, поступающего на пластинку (рис. 9).

Для разделения смеси красителей, а также липидов [38] использован иной тип прибора для обеспечения гра-

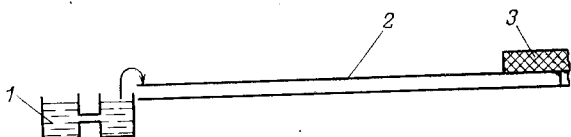


Рис. 9. Схема градиента концентрации при тонкослойной хроматографии с использованием подвижной фазы:

1 — камеры для создания градиента; 2 — пластинка с адсорбентом; 3 — буферная масса, для удаления избытка подвижной фазы.

диента концентрации подвижной фазы. Элюирующий раствор из камер (от 3 до 7) через капиллярную трубку подавался на пластинку с адсорбентом. Используя такой прибор, можно осуществлять градиентную элюцию как на горизонтальной пластинке, так и на пластинке, повернутой на некоторый угол, т. е. восходящую хроматографию.

Градиент неподвижной фазы был применен для разделения смеси кетонов [16]; при этом в качестве стационарной фазы были использованы одновременно два различных адсорбента (активированный уголь и кремневая кислота) на одной и той же пластинке. Примером использования градиента неподвижной фазы является также разделение смеси красителей [39] на пластинке с силикагелем и кизельгуром, растворитель — бензол.

Градиент неподвижной фазы был применен и для разделения стероидов [40]. В качестве адсорбента был использован силикагель, импрегнированный нитратом серебра.

Другим примером использования градиента неподвижной фазы является сочетание на одной пластинке кислотных и щелочных слоев адсорбента (рН-градиент) [41].

Градиент среды [42—44]. Для разделения анализируемых смесей (в основном, различных красителей) была использована разница в летучести многокомпонентных растворителей. Различие в скорости испарения растворителей в этих условиях и создает градиент. Пластинку при этом помещают в камеру слоем адсорбента вниз над рядом лотков, содержащих систему растворителей с заранее заданным градиентом испарения этих растворителей; хроматография горизонтальная; адсорбент — силикагель.

К этому же типу градиента можно отнести и способ так называемой полизональной хроматографии [45, 46]. В этом случае элюирующий раствор состоит из двух или более растворителей. При хроматографии происходит образование отдельных зон хроматографирования, обусловленное различным сродством растворителей к адсорбенту. Растворители, обладающие меньшей гидрофильностью, проходят на пластинке с адсорбентом большее расстояние, чем растворители с большой гидрофильностью.

При этом происходит расслаивание многокомпонентной смеси растворителей и опытные пробы поочередно подвергаются воздействию каждого из растворителей. При известной затрате времени можно подобрать наиболее оптимальный состав растворителей и осуществить разделение смеси.

Различные способы хроматографии в тонких слоях необходимо оценивать с точки зрения их простоты, быстроты выполнения и тех результатов, которые можно с их помощью получить. В этом отношении наибольшей популярностью пользуется метод восходящей хроматографии. Нисходящая хроматография применяется гораздо реже, требует специального устройства, сравнительно сложна, трудоемка и поэтому не имеет каких-либо преимуществ перед восходящей хроматографией. Горизонтальная круговая хроматография используется редко, обычно для быстрого подбора необходимого растворителя.

Определенный интерес представляет хроматография с непрерывным испарением растворителя. При помощи этого метода удается проводить разделение соединений с весьма близкими значениями R_f , метод этот весьма перспективен.

Применение метода градиентной хроматографии в значительной мере расширяет возможности хроматографии в тонких слоях. Дальнейшее развитие тонкослойной хроматографии возможно пойдет в этом направлении по пути разработки и применения соответствующей техники и аппаратуры. Однако следует отметить, что этот метод более сложен.

Обнаружение и идентификация органических соединений при хроматографии в тонких слоях. Для идентификации органических соединений после разделения

методом тонкослойной хроматографии чаще всего проводят опрыскивание пластинки с адсорбентом различными реагентами при помощи пульверизаторов различной конструкции [2, 13, 16].

Опрыскивание пластинок реагентами, как правило, должно проводиться в вытяжном шкафу или в особой камере, куда помещают пластинку.

После опрыскивания пластинку с сорбентом иногда необходимо нагревать обычно до 80—110°C для того, чтобы выявить действие реагента.

Соединения, поглощающие в УФ-области спектра, после разделения их на пластинке могут быть обнаружены путем опрыскивания пластинки раствором флуоресцирующего вещества. Иногда флуоресцирующее вещество добавляют к сорбенту.

В качестве реагентов для определения в тонкослойной хроматографии органических соединений используют различные вещества [2, 16].

Реагенты общего характера, дающие окраску с многими типами органических соединений, приведены в табл. 2.

Таблица 2. Реагенты для обнаружения и идентификации органических соединений в тонкослойной хроматографии

Реагент	Окраска пятен	Обнаруживаемые соединения
10%-ный раствор бихромата натрия в 50%-ной серной кислоте	Светло-голубая на оранжевом фоне	Органические кислоты
10%-ный спиртовой раствор фосфорно-молибденовой кислоты	Темно-голубая на желтом фоне	Органические кислоты, фенолы
0,25%-ный раствор роданида В в этаноле	Розово-лиловая	Органические кислоты
5%-ный раствор хлорного железа в метаноле	Темные пятна на белом фоне	Фенолы
Пары иода*	Коричневая на бледно-желтом фоне	Многие органические соединения
Раствор 50 мг флуоресцеината натрия в 100 мл 50%-ного метанола	Флуоресцирующие пятна, обнаруживаемые при помощи кварцевой лампы	Ароматические и гетероциклические соединения

* Хроматограмму на 15 мин помещают в закрытый сосуд, в котором находятся кристаллы иода и вода.

Препаративная хроматография. Техника препаративного выделения из тонких слоев в основном сводится к следующим операциям.

После элюирования хроматограммы на пластинке с адсорбентом и идентификации полученных при этом пятен или полос интересующий экспериментатора участок сорбента с пятном тем или иным способом переносится в сосуд-приемник, где вещество элюируется с сорбента. Сорбент отделяют фильтрованием или центрифугированием, а элюент с веществом после концентрирования подвергается анализу.

Самая ответственная операция в данном случае это перенос участка сорбента с анализируемым веществом с пластинки в приемник. При этом могут быть потери сорбента, а следовательно, и опытного вещества.

Наиболее простой способ переноса — соскоб. Пятно с веществом тщательно, обычно шпателем, соскабливают в приемник. Второй способ — использование различного типа вакуум-перегонки. Для этого участок сорбента, подлежащий переносу, предварительно обводят кончиком иглы. Затем стеклянный аспиратор или воронку с пористым фильтром одним концом подключают к водоструйному насосу, а другим концом с насаженной узкой трубкой, согнутой под углом, собирают участок сорбента с пятном. Для летучих соединений можно применять отгонку в вакууме при нагревании [47].

Предложено также использовать промывание хроматограмм растворителем [48].

При использовании гибких пластинок с готовым слоем адсорбента один из концов пластинки заостряют. На расстоянии 3 см от верхнего (не заостренного) края пластинки делают сгиб, на расстоянии 1,5 см от первого сгиба делают второй сгиб; адсорбент при этом должен находиться на внутренней стороне согнутой пластинки. Пластинку с адсорбентом устанавливают (по сгибам) на направляющие стержни. Вся конструкция помещается в камеру для хроматографии с верхним положением лотка для растворителя (хроматография нисходящая). Край пластинки, расположенный ниже первого сгиба, опускают в лоток с растворителем. Растворитель, перемещаясь по пластинке, элюирует нанесенное на пластинку вещество и перемещает его к заостренному концу пластинки. Фракции собирают, передвигая пластинку вдоль направ-

ляющих так, чтобы заостренный конец пластинки последовательно располагался вдоль ряда пробирок, находящихся на дне камеры.

По другому способу препаративного выделения разделяемых веществ промыванием хроматограмм (нисходящий метод) на стеклянную пластинку с адсорбентом, помещенную в камеру, растворитель при помощи бумажного фитиля поступает из сосуда, расположенного в верхней части камеры. Нижний край пластинки опускают в узкий стеклянный желоб, из которого пипеткой собирают фракции растворителя для анализа.

По сравнению с колоночной хроматографией препаративная хроматография в тонких слоях обладает следующими преимуществами: быстротой выполнения анализа, небольшими объемами растворителей, возможностью быстрого подбора систем растворителей, четкостью и быстротой определения хроматографических зон и сравнительной легкостью изоляции выделяемых компонентов из пластинок.

К недостаткам препаративной тонкослойной хроматографии относится сравнительно меньшее количество опытного материала, которое может быть использовано при хроматографии на пластинках, по сравнению с колонками. Мешает также возможная лабильность хроматографируемых соединений, которые могут подвергаться изменениям вследствие большой поверхности адсорбционного слоя.

Иногда для препаративных целей используют значительно более толстые слои адсорбента, чем при обычной хроматографии в тонких слоях, от 1,25 до 2,00 см, что позволяет существенно увеличить количество хроматографируемых на такой пластинке веществ [8]. Такой метод был использован для разделения красителей [8]. В качестве адсорбента применяли силикагель с добавкой 20% гипса. Была сконструирована специальная аппаратура для поддержания пластинок с толстым слоем в вертикальном положении, необходимом для того, чтобы растворитель проникал сквозь слой адсорбента с одинаковой скоростью.

Был предложен интересный вариант цилиндрической препаративной хроматографии в тонких слоях [49, 50]. Хроматографию проводят на наружной поверхности пробирок размером $3,8 \times 30$ или 5×50 см. Пробирки

погружают в суспензию адсорбента, например смесь силикагеля с хлороформом или метиловым спиртом (2:1). На 50 г силикагеля обычно требуется 170—180 мл хлороформа. К адсорбенту в качестве связующего добавляют поливинилпирролидон. Вместо силикагеля могут быть использованы также и порошки целлюлозы. Затем пробирку, покрытую адсорбентом, вынимают, сушат и ставят вертикально вверх дном. На поверхность дна пробирки, покрытую адсорбентом, точно в центр наносят каплями опытную пробу анализируемого вещества, дают пробе распространиться до сгиба пробирки и опускают затем нижний конец пробирки в сосуд с элюирующим раствором. По окончании хроматографии полосы разделенных веществ переносят в приемник при помощи соскоба, держа при этом пробирку с адсорбентом в горизонтальном положении.

В препаративной тонкослойной хроматографии большое значение имеет качество применяемого адсорбента, степень его загрязнения. Показано, что возможным источником загрязнений может быть тара, в которую упакованы адсорбенты. Так, в хлороформенных вытяжках из адсорбентов, упакованных в прорезиненную или пластиковую тару, методом спектроскопии обнаружены органические радикалы. Предпочтительнее использовать адсорбенты, упакованные в стеклянную тару.

В табл. 3 приведены некоторые из применяемых в препаративной тонкослойной хроматографии адсорбентов. Указано количество воды, требуемое для получения

Таблица 3. Характеристики адсорбентов, используемых в препаративной тонкослойной хроматографии [51]

Адсорбент	Толщина слоя, мм	Масса слоя, г	Количество воды, мл	Количество метилового спирта, мл	Температура сушки, °C	Время сушки, мин
Силикагель для TCX GF	1,9	50	72	5	105	45
Силикагель HF	0,9	30	78	—	105	45
Кизельгель DF	1,4	20	48	3	105	45
Кизельгур W	2,2	50	81	9	105	80
Силикагель (TCX)	0,9	30	35	—	комн.	1 день

* Добавка метилового спирта к адсорбционной массе предохраняет слой от растрескивания при высушивании.

адсорбционной массы, время сушки слоя и температура (размер пластинок 6×12 см).

Влияние различных факторов на воспроизводимость результатов тонкослойной хроматографии. По сравнению с хроматографией на бумаге R_f в тонкослойной хроматографии в значительно большей степени зависит от условий опыта [16]. Поэтому в тонкослойной хроматографии органических соединений часто применяют свидетели — эталонные вещества с заранее известной подвижностью на данном сорбенте, т. е. с известным значением R_f . Свидетели наносят на пластинку рядом с пятном опытного вещества. Даже при условии строгой стандартизации опытов R_f является относительной величиной и сильно зависит от условий эксперимента.

Отмечалось [52], что для получения воспроизводимых результатов при хроматографии в тонких слоях при описании экспериментов желательно указывать вид и тип хроматографических камер, материал, из которого эти камеры сделаны, способ приготовления адсорбционных слоев, тип и качество адсорбента, вид и размер подложки (стекло, пластик и т. п.), толщину слоя сорбента, способ его активации, условия сушки сорбционного слоя, количество хроматографируемых пластинок в камере, способ и метод нанесения на пластинку с сорбентом анализируемого вещества (пятно, полоса), количество испытуемого вещества и положение стартовой линии, способ хроматографирования (восходящая, нисходящая или горизонтальная хроматография), состав применяемых растворителей, степень насыщения камеры растворителем, температуру и влажность, при которых проводится разделение, способ идентификации анализируемых веществ на пластинке (погружение, опрыскивание или др.), использованные для этой цели реагенты, цвет и устойчивость окрашенных пятен, чистоту и квалификацию химических реактивов, а также другие детали эксперимента.

Выполнение этих требований в значительной мере увеличит воспроизводимость опытов и стабильность значений R_f . В этом случае R_f будет являться важной характеристикой хроматографируемых соединений.

Существенное значение при хроматографии в тонких слоях имеет качество адсорбента.

Обычно тонкослойную хроматографию органических

соединений проводят при комнатной температуре (18—20 °C). При прочих равных условиях температура обычно не оказывает заметного влияния на разделение опытной смеси. Однако, показано [53], что между изменением влажности при хроматографии и изменением температуры существует связь: с увеличением относительной влажности от 45 до 65% в интервале температур 20—60 °C с ростом температуры и степени влажности повышается также и R_f хроматографируемых соединений.

На подвижность хроматографируемых соединений в тонких слоях может оказать влияние также и толщина слоя адсорбента [54, 55].

Количественный анализ в тонкослойной хроматографии органических соединений. В настоящее время количественная хроматография в тонком слое сорбента является общепринятым методом анализа различных смесей веществ.

Существуют два основных способа количественного анализа в тонкослойной хроматографии органических соединений.

Первый способ — это оценка результатов хроматографии непосредственно на пластинке, второй — перенос пятна с пластинки в приемник с последующей элюцией вещества с сорбента и определением его при помощи общепринятых методов количественного анализа — колориметрических, спектрофотометрических и других.

Методы определения анализируемых соединений непосредственно на пластинке. *Определение площади пятен.* В этом методе обычно с контрастных пятен снимают фотокопии и площадь пятна измеряют при помощи планиметра или же переносят контуры пятна на прозрачную бумагу (наложением) и измеряют площадь при помощи миллиметровой бумаги.

Для оценки площади пятен строят калибровочную кривую. Зависимость между площадью пятна и логарифмом количества искомого вещества связана уравнением [12]:

$$\sqrt{Q} = a \lg g + b$$

где g — количество вещества; Q — площадь пятна; a и b — константы.

Эта зависимость справедлива при содержании вещества в пятне 1—80 мкг.

Помимо методов, основанных на измерении площади пятна, существуют способы количественной оценки соединений по размерам пятен [56]. В этих способах учитывают только ширину и длину пятен или же максимальный и минимальный диаметры пятен и оптическую плотность в центре пятна [57].

Расчет проводят по формуле

$$g = KADd$$

где g — количество измеряемого вещества; K — коэффициент пропорциональности; A — оптическая плотность в центре пятна; D и d — максимальный и минимальный диаметры пятна.

Способ обладает хорошей чувствительностью и позволяет определять соединения с количеством вещества до 10^{-11} — 10^{-9} мкг. Он основан на допущении, что максимум оптической плотности в центре пятна прямо пропорционален количеству измеряемого вещества. Для измерения пятен по этому методу [57] используют спектрофотометр, соединенный с источником света и микроскопом.

Следует, однако, отметить, что использование специальной аппаратуры существенно повышает чувствительность метода, однако увеличивает сложность метода и делает его мало экономичным для единичных анализов.

В целом, пределы ошибок, допускаемых при использовании методов с измерением площади или размеров пятен обычно составляют 5—6%. На размер ошибки может, например, оказывать влияние неравномерность распределения вещества в пятне и некоторые другие причины.

Денситометрический метод. Денситометрический метод связан с определением интенсивности проходящего или отраженного света, пропускаемого через пластинку. Этот метод требует применения особых приборов — денситометров. Между количеством определяемого вещества и величиной и плотностью окраски пятна должна быть линейная зависимость.

Существенное значение при денситометрии имеет равномерная окраска пятен, стандартизация условий хроматографии, соответствие размеров пятен длине щели денситометра и т. д.

Достоинствами метода являются быстрота измерений, отсутствие каких-либо дополнительных операций,

которые могут привести к загрязнению измеряемого вещества, относительная точность метода. К недостаткам относятся необходимость соблюдения различных требований к подготовке хроматографируемых веществ, поскольку воспроизводимость опытов в значительной степени зависит от характера и интенсивности окраски пятна. На результатах опытов отражаются также тип и технические данные прибора, используемого для денситометрии.

Обычно ошибки при использовании денситометрического метода при хроматографии в тонких слоях лежат в пределах 5—8%. Ошибки эти могут быть вызваны рядом причин, например различием в скорости перемещения пластинки с сорбентом в приборе (при замедленном передвижении пластинки площадь вычерчиваемого пика больше), а также тем, что невозможно учесть количество рассеянного света, попадающего на пластинку. Кроме того, в зависимости от метода измерения (в проходящем или отраженном свете) показания денситометра могут быть различны в зависимости от типа прибора.

Ошибки при денситометрии могут возникнуть также в процессе самой хроматографии в тонких слоях, например при измерении объемов опытного вещества при нанесении его на пластинку. Точность определения зависит и от толщины слоя адсорбента на пластинке, влажности слоя, присутствия посторонних веществ, характера растворителей и ряда других факторов.

Таблица 4. Зависимость площади пика от толщины слоя сорбента и метода измерения [55]

Толщина слоя сорбента, мм	Площадь пика, см ²	
	метод отражения	метод пропускания
0,13	13,13	15,08
0,30	11,38	18,50
0,39	10,54	20,53
0,47	10,01	22,05
0,52	9,66	22,31

Зависимость между толщиной слоя сорбента и площадью пика, вычерчиваемого денситометром при различных методах измерения, показана в табл. 4.

При работе по методу пропускания света через пластинку с увеличением толщины слоя адсорбента площадь пика, вычерчиваемого денситометром, увеличивается, тогда как при использовании метода отражения с увеличением толщины слоя площадь пика уменьшается (см. табл. 4).

Влажность адсорбционного слоя также может сказываться на площади пиков при денситометрии. Изменение относительной влажности на 3% вызывает изменение площади пика приблизительно на 1%.

Наконец, наличие посторонних примесей в опытной смеси также может вызывать изменение формы и размера пятна и, следовательно, отразиться на показаниях денситометра.

Оценка площади пятен при помощи денситометрии [58] использована при разделении пентапептидов в тонком слое силикагеля на микропластинках размером $7,5 \times 7,5$ см.

Прямая спектрофотометрия на пластинках. Прямые спектрофотометрические измерения опытных веществ непосредственно на пластинках с адсорбентом после хроматографического разделения в значительной степени увеличивают возможности тонкослойной хроматографии.

Прямая спектрофотометрия на пластинке является быстрым и чувствительным методом оценки. Следует однако заметить, что для этого метода необходимы специальные спектрофотометры, желательно с автоматическим отсчетом измерений. В современных спектрофотометрах такого типа измерения пятен могут проводиться как при помощи метода пропускания, так и методом отражения волн.

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

В настоящее время для количественной оценки результатов тонкослойной хроматографии выпускают специальные приборы — спектроденситометры, обеспечивающие непосредственное количественное сканирование результатов хроматографического процесса в тонких слоях. Более подробное изложение количественных аспектов

спектроденситометрии в тонкослойной хроматографии можно найти в работе [59].

По сравнению с денситометрией, где пятна на пластинке необходимо предварительно окрашивать специальными реагентами, при спектрофотометрии пятна на пластинке обычно невидимы.

Спектрофотометрические измерения можно с успехом использовать для количественного определения всех соединений, поглощающих в УФ-области спектра при длинах волн, соответствующих их максимуму поглощения. Чувствительность метода прямого спектрофотометрического измерения по сравнению с методом экстрагирования вещества с адсорбента приблизительно в десять раз больше, сам метод требует значительно меньшего времени.

Ошибки в методе прямого спектрофотометрирования на пластинках составляют 4—6%.

Прямая количественная флуорометрия на пластинках. Непосредственное количественное определение на пластинках пятен флуоресцирующих соединений может проводиться как методом измерения флуоресценции, так и методом гашения флуоресценции, основанным на гашении флуоресценции вещества, предварительно нанесенного на сорбционный слой. Ошибки первого метода находятся приблизительно в пределах 3—5%, второго — 5—8%.

Для измерений флуоресценции исследуемого вещества на пластинке применяют специальные приборы — флуорометры. В последнее время начинают использовать аппараты, сочетающие флуорометрический метод определения с техникой денситометрии, — флуороденситометры, обеспечивающие непосредственную флуорометрическую оценку результатов хроматографии в тонких слоях.

Количественная хроматография в тонких слоях с использованием метода элюирования. Метод количественного переноса сорбента с анализируемым веществом с пластинки в приемник с последующим элюированием вещества довольно широко применяется в тонкослойной хроматографии.

Считают [14], что этот метод дает наиболее верные результаты при количественном анализе в тонком слое.

Однако метод элюирования очень трудоемок и связан с неизбежными потерями исследуемого вещества.

После окончания хроматографического процесса на пластинке и проявления пятен, анализируемые пятна вместе с адсорбентом количественно переносят в приемник. Затем вещество вымывают с адсорбента соответствующим растворителем и после центрифугирования количественно переносят в кювету для измерения.

При применении этого метода необходимо учитывать ряд факторов, которые могут вызвать ошибки в измерении опытной пробы.

Важное значение в методе элюирования имеет чистота адсорбента. Примеси в адсорбенте могут перейти в измеряемый раствор и повлиять на результаты колориметрических или спектрофотометрических измерений.

Следы железа в силикагеле удаляют, обрабатывая адсорбент кипящим этиловым спиртом, содержащим серную кислоту, или пропуская раствор, содержащий метиловый спирт и концентрированную соляную кислоту (9:1). Иногда примеси удаляют, пропуская через пластинку с адсорбентом 20- или 80%-ные растворы этилового или метилового спирта и потом высушивая пластинку при 110 °С.

Определенное значение имеет также качество адсорбционных слоев на пластинке. Слои должны быть однородными и по возможности плотными. Повреждение слоев адсорбента, например при нанесении проб, вызывает обычно значительное изменение размеров пятна при хроматографии, затрудняет количественный перенос пятен с пластинки.

Применяемые в тонкослойной хроматографии растворители должны быть свободными от примесей. Существенное значение имеет и полнота удаления летучих растворителей при сушке пластинок после хроматографии.

После извлечения соединения подвергают анализу. Чаще всего для этого используют спектрофотометрические, колориметрические, а также флуорометрические методы.

Влияние различных факторов (толщины слоя, размера зерен сорбента, способа нанесения проб и т. д.) на точность измерений хроматографируемых соединений

спектрофотометрическими методами изучено в работе [60].

Ошибки, возникающие вследствие переноса сорбента с веществом, обычно зависят от того, каким способом производится измерение: при помощи спектрофотометрии, колориметрии или методом флуоресценции. При колориметрических способах измерения элюированного вещества колебания ошибки измерений составляют 1,0—5,2% [21], для спектрофотометрии — в среднем около 5,3%, тогда как для флуорометрического метода измерений при переносе вещества с тонких слоев — 3,5—9%, а в некоторых случаях 15%.

Ошибки при методе переноса пятен могут вызываться самыми различными причинами: неодинаковым объемом проб вещества, наносимого на пластинку с адсорбентом, повреждением поверхностного слоя сорбента, неполным элюированием анализируемых соединений с адсорбента.

При хроматографии в тонких слоях к адсорбенту часто добавляют различные вещества для получения более прочных закрепленных слоев. Присутствие таких веществ, если они переходят в элюирующий раствор, также может быть причиной дополнительных ошибок.

Учет всех факторов, влияющих на количественное определение анализируемых соединений при применении метода элюирования в тонком слое, может в значительной степени способствовать успеху эксперимента.

Большинство экспериментаторов в настоящее время, по-видимому, отдает предпочтение методу непосредственного количественного определения соединений на пластинке. Этот метод позволяет получать более точные результаты и в относительно более короткое время.

Комбинированное использование тонкослойной хроматографии в сочетании с некоторыми другими методами. Весьма интересные перспективы открываются при использовании метода тонкослойной хроматографии в сочетании с различными другими методами и способами идентификации соединений.

Хорошие результаты дает сочетание методов тонкослойной и колоночной хроматографии [61], так называемая пилот-техника. Благодаря скорости определения исследуемых компонентов, экономичности, наглядности хроматография в тонких слоях может быть использова-

на для предварительного подбора и оценки сорбентов, элюирующих растворов — растворителей, а также для выбора условий работы с последующим применением их в колоночной хроматографии.

Удачное сочетание тонкослойной и газовой хроматографии было продемонстрировано в ряде работ [62—64]. Тонкослойная хроматография может быть использована в качестве дополнительного метода для оценки и идентификации хроматографических пиков, получающихся при газо-жидкостной хроматографии.

Значительный интерес представляет также техника идентификации различных хроматографических зон на тонких слоях и корреляция этих зон с точками кипения соединений при газовой хроматографии.

Интересные результаты дает сочетание тонкослойной хроматографии с электрофорезом [65]. Метод применим также и в колоночной хроматографии. В качестве адсорбента был использован кизельгель. Сочетание этих методов при разделении смеси ароматических углеводородов дает значительный выигрыш во времени. Так, при обычной тонкослойной хроматографии на разделение смеси пиренов затрачивается 60 мин, тогда как при наложении на пластинку электрического поля достаточно всего 4 мин.

Недавно был предложен новый метод сканирования трубчатых тонкослойных хроматограмм [66]. Кварцевые трубки покрывались изнутри слоем силикагеля или смеси силикагеля и окиси меди с толщиной слоя 0,01—0,04 мм. После хроматографирования на таких трубках исследуемых соединений через трубку пропускали ток очищенного воздуха или смеси азота и кислорода (в отношении 4:1) и проводили сжигание, последовательно перемещая трубки через кольцевую печь при 600—800 °C.

Окончательный анализ продуктов проводили хроматографическим методом с использованием плазменно-ионизационного детектора. Установка, по-видимому, может быть использована в условиях промышленного производства.

Безусловно перспективным оказалось сочетание тонкослойной хроматографии с радиоизотопным методом. В этом случае высокая чувствительность радиоизотопного метода удачно сочетается с большой избиратель-

ностью тонкослойной хроматографии. На одной пластинке можно успешно разделить с помощью однократного хроматографирования достаточное количество смеси исследуемых веществ для анализа.

Для обнаружения радиоактивных веществ на пластинке чаще всего используют метод радиоавтографии. Недавно была предложена [67] интересная комбинация хроматографической камеры со счетчиком Гейгера—Мюллера в качестве детектора для счета радиоактивных частиц при анализе радиоактивных соединений на тонкослойных хроматограммах.

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Разделение смесей органических кислот связано с значительными экспериментальными трудностями. Химические способы разделения органических кислот сложны, в достаточной степени трудоемки и не всегда приводят к положительным результатам.

В последнее время для анализа органических кислот различных классов начинает с успехом применяться метод хроматографии в тонких слоях. Он отличается от других методов разделения органических кислот быстротой выполнения анализа и высокой чувствительностью, особенно если использовать ультрамикрохроматографию.

Несмотря на перспективность метода тонкослойной хроматографии для анализа и разделения органических кислот общее количество экспериментальных работ в этом направлении пока еще сравнительно невелико.

Одноосновные предельные карбоновые кислоты. Методами хроматографии в тонких слоях исследовали следующие алифатические карбоновые кислоты: муравьиную (C_1), уксусную (C_2), пропионовую (C_3), масляную (C_4), валериановую (C_5), гексановую (C_6), энантовую (C_7), октановую (C_8), пеларгоновую (C_9), декановую (C_{10}), ундекановую (C_{11}), лауриновую (C_{12}), миристиновую (C_{14}), пальмитиновую (C_{16}), стеариновую (C_{18}), арахидиновую (C_{20}).

В качестве адсорбентов для анализа и разделения монокарбоновых органических кислот использовали силикагель, кизельгур, а также окись алюминия, в отдельных случаях были применены полиамидные сорбенты.

В большинстве случаев на таких адсорбентах, как силикагель и окись алюминия, при увеличении числа углеродных атомов в молекуле кислоты увеличивается зна-

чение R_f , т. е. подвижность кислот увеличивается с ростом их молекулярной массы.

Следует, однако, отметить, что подобная зависимость наблюдается не для всех адсорбентов [68, 69]. Так, на полиамидных сорбентах значение R_f уменьшается с увеличением числа углеродных атомов в молекуле кислоты.

Тонкослойная хроматография на силикагеле. При тонкослойной хроматографии предельных одноосновных карбоновых кислот с числом углеродных атомов в молекуле от двух до двенадцати на силикагеле наблюдалось увеличение подвижности кислоты с увеличением числа углеродных атомов в молекуле. В качестве элюирующих растворов применяли различные системы растворителей.

Значения R_f эфиров некоторых кислот при разделении на силикагеле в системе бензол—этилацетат (20:1) [70] приведены ниже:

Кислота	R_f	Кислота	R_f
Муравьиная	0,20	Валериановая	0,40
Уксусная	0,19	Гексановая	0,43
Пропионовая	0,22	Октановая	0,45
<i>n</i> -Масляная	0,32	Пеларгоновая	0,46

Для разделения кислот в качестве растворителя была использована [71] также система метилацетат—аммиак (2,5%-ный) (95:5), причем в одном случае растворитель использовали сразу после приготовления (I), а в другом — спустя 24 ч (II). Значения R_f , полученные при этом, приведены ниже:

Кислота	R_f	
	I	II
Муравьиная	0,05	0,07
Уксусная	0,10	0,13
Пропионовая	0,15	0,30
<i>n</i> -Масляная	0,24	0,40
<i>n</i> -Валериановая	0,39	0,50
Гексановая	0,52	0,57
Энантовая	0,55	0,60
Октановая	0,58	0,66

Отчетливо видно увеличение значения R_f с ростом числа углеродных атомов в молекуле кислоты; четко видно и влияние растворителя. Метод достаточно чувствителен. Может быть определено до 5 мкг вещества.

Тонкослойная хроматография на кизельгуре. Кизельгур, импрегнированный диэтиленгликолем (I) и триэтиленгликолем (II) был использован в качестве адсорбента для хроматографии в тонком слое органических насыщенных кислот с числом атомов углерода от 2 до 12 [72]. В качестве смешанного растворителя использовали диизопропиловый эфир — петролейный эфир — четыреххлористый углерод — муравьиная кислота — вода (50:20:20:8:1). Ниже приведены значения R_f :

Кислота	R_f	
	I	II
Уксусная	0,15	0,09
Пропионовая	0,25	0,13
Масляная	0,34	0,19
Валериановая	0,43	0,26
Гексановая	0,52	0,33
Энантовая	0,63	0,43
Октановая	0,73	0,53
Пеларгоновая	0,84	0,63
Декановая	0,92	0,76
Ундекановая	0,94	0,87
Лауриновая	0,96	0,96

Из приведенных данных видно, как изменение в обработке одного и того же адсорбента отражается на значении R_f .

Для разделения жирных кислот (муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной и капроновой) был предложен метод разделения амидов этих кислот в тонком слое окиси алюминия [73] на пластинках размером $2,6 \times 7,6$ см.

Для получения амидов жирные кислоты при помощи хлористого тионила переводили в хлорангидриды, а затем обрабатывали ароматическим амином. Из-за летучести низших жирных кислот для получения амидов использовали их соли.

Лучшие результаты были получены при использовании в качестве растворителя смеси бензола с изоамил-ацетатом (4:1). Продолжительность разделения 7—10 мин. Наименьшая длина пробега на пластинке была у муравьиной кислоты (C_1), затем шла уксусная кислота (C_2), пропионовая (C_3), масляная (C_4). Наибольшей длиной пробега обладала гексановая кислота (C_6).

Тонкослойная хроматография на полиамидных смолах. Для разделения высших жирных карбоновых кислот с числом углеродных атомов от C_{10} до C_{20} были использованы полиамидные смолы [68],

а в качестве растворителей — смесь метанол—ацетон—вода (40:40:20).

В качестве объектов для анализа использовали декановую (C_{10}), лауриновую (C_{12}), миристиновую (C_{14}), пальмитиновую (C_{16}), стеариновую (C_{18}) и арахидиновую (C_{20}) кислоты.

Здесь также наблюдалась определенная зависимость между положением пятна на пластинке с полиамидным сорбентом и числом атомов углерода исследуемой кислоты. Наименьшая длина пробега на пластинке отмечалась для арахидиновой кислоты, т. е. для кислоты с наибольшим числом углеродных атомов, наибольшей длиной перемещения обладала декановая кислота, содержащая наименьшее число углеродных атомов (C_{10}).

Таким образом, хроматография на полиамидных слоях позволяет также осуществить успешное разделение смеси ряда высших жирных кислот. Однако на полиамидном сорбенте с увеличением числа углеродных атомов в молекуле подвижность кислот уменьшается [69].

Ниже приведены значения $R_{ст}$ для одноосновных насыщенных карбоновых кислот при хроматографии в тонком слое полиамида [в системе метанол—вода (9:1)], окиси алюминия [метанол—хлороформ—диэтиламин (1:99:0,5)] и силикагеля [метанол—хлороформ—диэтиламин (2:98:0,5)]:

Кислота	$R_{ст}$		
	полиамид	окись алюминия	силикагель
Уксусная	2,10	0,08	0,05
Пропионовая	2,00	0,15	0,14
Масляная	1,90	0,20	0,22
Валериановая	1,70	0,23	0,29
Гексановая	1,50	0,27	0,35
Энантовая	1,40	0,29	0,40
Октановая	1,30	0,31	0,42
Пеларгоновая	1,10	0,34	0,45
Декановая	1,00	0,35	0,47
Лауриновая	0,84	0,37	0,48
Миристиновая	0,66	0,39	0,51
Пальмитиновая	0,46	0,42	0,52
Стеариновая	0,35	0,45	0,55

Как видно из приведенных данных, на силикагеле и окиси алюминия подвижность кислот растет с увеличением молекулярной массы, на полиамидном сорбенте наблюдается обратная зависимость.

Сравнительная оценка способов разделения одноосновных карбоновых кислот (пальмитиновой, линолевой, олеиновой, стеариновой, арахидовой) методами тонкослойной (на силикагеле) и газо-жидкостной хроматографии показала, что оба метода дают близко совпадающие результаты [74]; таким образом, метод тонкослойной хроматографии может быть использован вместо более сложного метода газо-жидкостной хроматографии.

Двухосновные предельные карбоновые кислоты. Эти кислоты были успешно разделены при помощи тонкослойной хроматографии на кизельгеле. Значения R_f для различных систем растворителей приведены ниже: I — бензол — метанол — ледяная уксусная кислота (45:8:4), II — бензол — диоксан — ледяная уксусная кислота (90:25:4)]:

Кислота	R_f	
	I	II
Щавелевая	0,0	0,0
Малоновая	0,13	0,05
Янтарная	0,28	0,23
Глутаровая	0,35	0,28
Адипиновая	0,42	0,34
Пимелиновая	0,47	0,36
Азелаиновая	0,53	0,43
Себаценовая	0,55	0,47

Проводилось также разделение двухосновных карбоновых кислот в тонких слоях кизельгура [76]. Значения R_f приведены ниже:

Кислота	R_f	Кислота	R_f
Щавелевая	0,14	Пимелиновая	0,55
Малеиновая	0,21	Азелаиновая	0,82
Глутаровая	0,36	Себаценовая	0,92
Адипиновая	0,43		

Как на кизельгеле, так и на кизельгура подвижность двухосновных карбоновых кислот увеличивается с ростом длины углеродной цепи и увеличением молекулярной массы кислоты.

Оксикислоты, кетокислоты и непредельные карбоновые кислоты. Оксикислоты, кетокислоты и непредельные

кислоты могут быть легко разделены при помощи двумерной хроматографии в тонких слоях. В качестве сорбента использовали целлюлозу MN-300 [77] и целлюлозу СС-41 [78].

При хроматографии на целлюлозе MN-300 в направлении I были использованы системы растворителей: пропанол — цинеол — муравьиная кислота — вода (50:50:20:5), а в перпендикулярном направлении II — 96%-ный этанол — вода — 25%-ный раствор аммиака (100:12:16). Значения R_f в обеих системах растворителей приведены ниже:

Кислота	R_f	
	I	II
Фумаровая	0,89	0,27
Янтарная	0,77	0,22
Молочная	0,71	0,46
α -Кетоглутаровая	0,54	0,23
Яблочная	0,43	0,15
Лимонная	0,32	0,06

Тонкослойная двумерная хроматография этих же кислот на целлюлозе СС-41 при помощи систем растворителей: фенол — вода — муравьиная кислота (75:25:1) в направлении I и диэтилового эфира — муравьиной кислоты — воды (7:2:1) в направлении II дает следующие значения R_f [78]:

Кислота	R_f	
	I	II
Фумаровая	0,96	0,66
Янтарная	0,81	0,71
α -Кетоглутаровая	0,70	0,59
Яблочная	0,54	0,54
Лимонная	0,38	0,42

Для двумерной хроматографии карбоновых кислот на силикагеле использованы следующие системы растворителей: в направлении I — эфир (водн.) — муравьиная кислота (7:1), в направлении II — хлороформ — метанол — муравьиная кислота (80:20:1) [79]. Значения R_f приведены ниже:

Кислота	R_f	
	I	II
Фумаровая	0,95	0,60
Янтарная	0,87	0,59
Молочная	0,82	0,55
Яблочная	0,56	0,31
Лимонная	0,44	0,14

В целом, поведение рассмотренных выше карбоновых кислот при хроматографии в тонких слоях на силикагеле и порошках целлюлозы, в разных системах растворителей может быть, по-видимому, связано с длиной их углеродных цепей.

Увеличение длины углеродной цепи приводит к увеличению сорбируемости, уменьшению подвижности кислот и уменьшению R_f . За исключением отдельных случаев, общая тенденция к уменьшению R_f для кислот с большой длиной углеродной цепи выражена, по-видимому, в достаточной степени.

Кетокислоты. Была показана возможность успешного разделения кетокислот на окиси алюминия [80]. Обычно для анализа α -кетокислот используют хроматографию на бумаге; при этом разделение α -кетокислот представляет определенные трудности. Часто для этой цели применяют также газовую хроматографию кетокислот в виде их метиловых эфиров, получение которых трудно осуществить с количественным выходом.

Принцип данного метода основан на хроматографии α -кетокислот в виде производных хиноксалона, образующихся при взаимодействии α -кетокислот с *о*-фенилендиамином [81].

В качестве объектов были использованы смеси глиоксиловой, пировиноградной и α -кетоглutarовой кислот.

Хиноксалон, полученный из глиоксиловой кислоты, на хроматограммах дает два пятна: хиноксалон (пятно с большим значением R_f) и хиноксалин (пятно с меньшим значением R_f).

Были использованы различные системы растворителей: ацетонитрил — аммиак (5:1), диэтиловый эфир — пропанол — аммиак (3:10:8), четыреххлористый углерод — изопропанол — аммиак (1:1,5:1), изопропанол — бензол (1:7), бензол — изопропанол — уксусная кислота (12:10:1), *n*-амиловый спирт — муравьиная кислота (30:1). Во всех системах растворителей наибольшим значением R_f обладала пировиноградная кислота, наименьшим — α -кетоглutarовая кислота.

В качестве подложек для сорбционной массы использовали предметные микроскопические стекла.

Микротонкослойная хроматография хиноксалонов дает возможность анализировать кетокислоты даже в та-

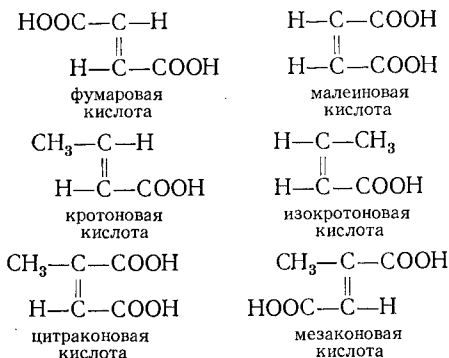
ких смесях, где они находятся в микроколичествах, не прибегая к их выделению.

Предложенная методика может быть использована и для количественного определения кетокислот. Воспроизводимость метода $\pm 5\%$.

Поведение пировиноградной, глиоксиловой и α -кетоглутаровой кислот при хроматографии в тонком слое силикагеля в смеси эфир (водн.) — муравьиная кислота (7:1) имеет несколько иной характер. Ниже приведены для сравнения значения R_f для этих кислот при хроматографии в тонких слоях окиси алюминия (четырёххлористый углерод — изопропанол — аммиак, 1:2,5:1) [73] и силикагеля [эфир (водн.) — муравьиная кислота, 7:1], [79]:

Кислота	Окись алюминия	Силикагель
Пировиноградная	0,65	0,86
α -Кетоглутаровая	0,41	0,74
Глиоксиловая	0,53	0,37

Разделение изомеров некоторых ненасыщенных органических кислот. При помощи хроматографии в тонких слоях оказалось возможным успешное разделение *цис*- и *транс*-изомеров некоторых ненасыщенных дикарбоновых кислот, например фумаровой и малеиновой, кротоновой и изокротоновой, цитраконовой и мезаконовой [82]:



Значения R_f этих кислот при тонкослойной хроматографии на силикагеле в различных системах растворителей [I — бензол — метанол — ледяная уксусная кислота

(45:8:4) и II — бензол — диоксан — ледяная уксусная кислота (90:25:1)] приведены ниже:

Кислота	R_f	
	I	II
Фумаровая	0,43	0,22
Малеиновая	0,13	0,06
Кротоновая	0,73	0,73
Изокротоновая	0,70	0,71
Мезаконовая	0,55	0,53
Цитраконовая	0,18	0,07

Как видно из приведенных данных, при хроматографии в тонких слоях *транс*-формы карбоновых кислот имеют большие значения R_f , чем *цис*-формы.

Ароматические карбоновые кислоты. Существуют сравнительно немногочисленные данные по тонкослойной хроматографии ароматических карбоновых кислот. В качестве адсорбентов использовали силикагель и окись алюминия.

На силикагеле удалось разделить бензойную кислоту от ее метилированных производных — толуиловых кислот [83]. В качестве элюирующего раствора использовали бензол — пиридин (85:15); хроматография восходящая. После разделения кислот избыток растворителя удаляли в течение 1 ч при 115°C. Для проявления пятен пластинки обрабатывали 1%-ным раствором бромкрезолового зеленого в 90%-ном этаноле. Значения $R_{ст}$ этих кислот (по отношению к бензойной кислоте, подвижность которой принята за единицу) приведены ниже:

Кислота	$R_{ст}$	Кислота	$R_{ст}$
<i>n</i> -Толуиловая	1,22	<i>o</i> -Толуиловая	1,18
<i>m</i> -Толуиловая	1,19	Бензойная	1,00

При хроматографии на тонких слоях силикагеля изомеры толуиловой кислоты имеют довольно близкие подвижности, но хорошо отделяются от бензойной кислоты.

При помощи тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей бензол — пиридин (85:15) были разделены изомерные оксibenзойные кислоты [83].

Значения $R_{ст}$ для этих кислот (по отношению к бензойной) кислоты приведены ниже:

Кислота	$R_{ст}$
о-Оксибензойная (салициловая) .	0,37
м-Оксибензойная	0,50
п-Оксибензойная	0,60

На тонких слоях окиси алюминия хорошо происходит разделение дикарбоновых ароматических кислот (фталевая кислота и ее изомеры), а также α - и β -нафтойных кислот [84]. Значения R_f этих кислот при использовании системы растворителей метанол — диметилформамид — 25%-ный раствор аммиака (1:2:2) приведены ниже:

	R_f
Фталевая кислота	0,0 ¹
Изофталевая кислота	0,1 ⁷
Терефталевая кислота	0,2 ⁷
α -Нафтойная кислота	0,5 ²
β -Нафтойная кислота	0,4 ⁸

Салициловая кислота, широко применяющаяся в ряде отраслей народного хозяйства, в частности для получения консервантов, а также в фармацевтической промышленности, часто содержит примеси, например салициловый эфир. Такие примеси могут быть легко идентифицированы при помощи тонкослойной хроматографии на окиси алюминия в системе растворителей петролейный эфир — этилацетат — уксусная кислота (85:10:5) [85]:

	R_f
Салициловая кислота	0,63
Эфир салициловой кислоты . . .	0,72

Успешное разделение некоторых ароматических оксикарбоновых кислот проведено в тонких слоях кремневой кислоты [16] в различных системах растворителей: I — эфир — целлозольв В (7:3), II — этилацетат — целлозольв В (3:1), III — ацетон — целлозольв В (1:3)]. Значения R_f этих кислот приведены ниже:

Кислота	R_f		
	I	II	III
Салициловая	0,72	0,88	0,48
β -Резорциловая	0,57	0,85	0,19
Ванилиновая	0,46	0,76	0,29
Протокатеховая	0,32	0,55	0,10
α -Резорциловая	0,21	0,61	0,73
γ -Резорциловая	0,10	0,15	0,10

Во всех трех системах растворителей ароматические оксикарбоновые кислоты легко могут быть разделены. Особенно хорошо разделяются α -, β - и γ -изомеры резорциновой кислоты.

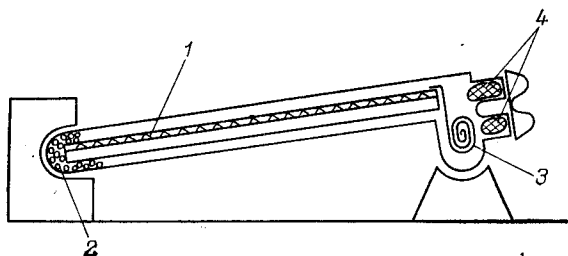


Рис. 10. Схема прибора для тонкослойной хроматографии под малыми углами:

1 — пластинка с сорбентом; 2 — стеклянная вата, пропитанная растворителем; 3 — бумажная спираль; 4 — бумажная масса.

Для разделения соединений, близких по своим химическим свойствам, недавно был предложен метод тонкослойной хроматографии под малыми углами. Этот способ дает возможность разделения на хроматограмме соединений с близкими значениями R_f [86]. В качестве адсорбента использовали коммерческий препарат микроструктурной целлюлозы с крахмалом. Растворителем служила система толуол — уксусная кислота — вода (125:72:3).

По этому методу в специальный сосуд, имеющий очень небольшой угол подъема (около 10°) над горизонтальной плоскостью, помещают пластинку с адсорбентом, на нижний конец которой предварительно наносят пробы анализируемых веществ (10—50 мкг) (рис. 10). На верхний конец пластинки накладывают сухую бумажную ленту, другой конец которой свернут в спираль. Бумажная спираль может быть развернута для удлинения пути растворителя. Такое устройство позволяет разделять соединения, имеющие близкие значения R_f (в пределах $0,02$ — $0,10R_f$) и обеспечивает возможность дополнительного продвижения опытного пятна на пластинке с адсорбентом. Максимальная длина пути, который может быть пройден пятном, достигает 55 см, продолжительность анализа 16—72 ч.

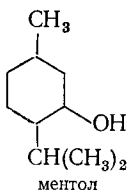
РАЗДЕЛЕНИЕ ИЗОМЕРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Применение тонкослойной хроматографии для разделения и анализа изомеров различных соединений началось сравнительно недавно. Во многих случаях с помощью тонкослойной хроматографии могут быть легко разделены изомеры органических соединений, которые обычно трудно разделить другими методами.

Карбоциклические соединения. В литературе имеются данные об успешном разделении в тонких слоях различных алициклических (главным образом терпенов) и ароматических соединений.

Стереοизомеры ментола и камфорной кислоты [87]. Ментол $C_{10}H_{19}OH$ является спиртом, производным циклогексана, и широко применяется, например, в фармацевтической промышленности.

Известны следующие стереοизомеры ментола: (+)- и (—)-ментолы, (+)- и (—)-изоментолы, (+)- и (—)-неоментолы и (+)- и (—)-неоизоментолы



На хроматографическое поведение стереοизомеров ментола большое влияние оказывает положение гидроксильной группы. Если гидроксильная группа находится в экваториальном положении (ментол и изоментол), то при хроматографии на кизельгеле G для таких молекул наблюдается более высокое адсорбционное средство, чем

для молекул, у которых гидроксильная группа находится в аксиальном положении.

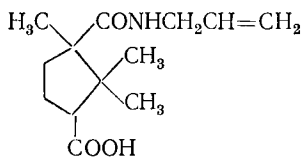
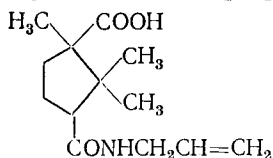
Влияние метильной группы на хроматографическое поведение стереоизомеров ментола выражено в значительно меньшей степени.

Ниже приведены значения R_f при хроматографии стереоизомеров ментола на кизельгеле; в качестве растворителей использовали: I — бензол, II — бензол—метанол (95:5), III — бензол — метанол (75:25), IV — метанол:

	R_f			
	I	II	III	IV
Ментол	0,16	0,36	0,67	0,90
Неоментол	0,28	0,51	0,73	0,85
Изоментол	0,17	0,37	0,62	0,91
Неоизоментол	0,29	0,55	0,76	0,80

Тонкослойная хроматография позволяет легко отделить ментол и изоментол от неоментола и неоизоментола [87]. Несколько сложнее обстоит дело при разделении ментола и изоментола, а также неоментола и неоизоментола, значения R_f которых сравнительно мало отличаются друг от друга. Однако подбором соответствующих растворителей эта задача, по-видимому, может быть решена. Так, можно добиться удовлетворительного разделения стереоизомеров ментола и изоментола, используя систему бензол — метанол (75:25), а для стереоизомеров неоментола и неоизоментола — метанол.

Из других производных терпенов хорошие результаты были получены при разделении хроматографией в тонких слоях структурных изомеров N-алкиламида (\pm)-камфорной кислоты [88]:



В качестве сорбента был использован кизельгель. Пластинки с кизельгелем (20×20 см) активировали нагреванием до 100 °С в течение 30 мин. Ниже приведены значения R_f для этих изомеров в различных системах растворителей: I — *n*-бутанол — вода (100:20), II — *n*-бутанол — 7%-ный раствор аммиака (100:20):

	I	II
α -Изомер	0,80	0,31 (0,50)*
β -Изомер	0,58	0,30 (0,40)*

* В скобках показаны значения R_f после трехкратной хроматографии на пластинках с кизельгелем.

Хроматографическое разделение различных изомеров терпенов и бициклических углеводородов при помощи тонкослойной хроматографии описано в работе [89]. В качестве адсорбента использовали силикагель G, импрегнированный нитратом серебра (адсорбционную массу наносили на пластинку и нагревали при 100—110 °C в течение 60 мин), в качестве растворителя — бензол. Оказалось, что адсорбционное сродство различных терпенов в значительной степени зависит от содержания нитрата серебра в силикагеле (табл. 5).

Таблица 5. Значения R_f терпенов при ТСХ на пластинках с различным содержанием AgNO_3

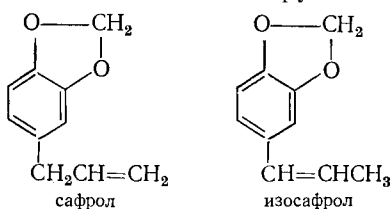
Соединение	Содержание AgNO_3 , %				
	0	6,25	12,50	18,75	25,0
α -Терпинен	0,70	0,58	0,51	0,45	0,43
γ -Терпинен	0,71	0,72	0,66	0,58	0,50
Терпинолен	0,71	0,72	0,69	0,61	0,53
Лимонен	0,72	0,52	0,42	0,35	0,31
α -Пинен	0,71	0,71	0,72	0,66	0,60
β -Пинен	0,70	0,59	0,50	0,46	0,42
Камфен	0,68	0,60	0,56	0,53	0,51
Δ^3 -Карен	0,73	0,73	0,72	0,66	0,60
Сабинен	0,71	0,38	0,30	0,27	0,25

Отчетливо видно изменение хроматографического поведения терпенов с увеличением содержания азотнокислого серебра в сорбционной массе.

Таким образом, тонкослойная хроматография на силикагеле с включением в гель нитрата серебра позволяет провести хорошее разделение ненасыщенных терпенов как циклического, так и бициклического типа, обычно довольно трудно разделяемых. При этом с увеличением количества нитрата серебра в сорбционной массе степень разделения терпенов улучшается (исключение составляет только пара α -пинен и карен).

Разделение некоторых терпенов, например сабинена и β -пинена, которое трудно осуществить при помощи газовой хроматографии, может быть легко достигнуто методом тонкослойной хроматографии на силикагеле с различным содержанием нитрата серебра.

Ароматические соединения. Силикагель, импрегнированный нитратом серебра, оказался также хорошим адсорбентом для разделения некоторых ароматических соединений. Таким способом, например, осуществлено разделение сафрола и его изомера изосафрола [90], что обычно сопряжено с известными трудностями



Различие в поведении сафрола и изосафрола, по-видимому, вызвано различной силой связи их молекул с ионом серебра, присутствующим в сорбенте.

При помощи тонкослойной хроматографии на силикагеле G удается легко разделить изомеры оксимов ароматических альдегидов и кетонов.

Значения R_f для этих соединений при разделении в тонком слое силикагеля G в системе растворителей бензол — этилацетат (50:10) [91] приведены ниже:

Оксим	α -Изомер	β -Изомер
бензальдегида	0,50	0,32
бензоина	0,14	0,37
анизоина	0,05	0,23

Представляет интерес возможность разделения в тонких слоях *орто*-, *мета*- и *пара*-изомеров замещенных ароматических углеводов.

Так, была показана возможность разделения на кизельгеле *орто*-, *мета*- и *пара*-изомеров нитрофенола, аминфенола, фенилендиамина, нитроанилина, толуидина, нитробензальдегида, а также α - и β -аминонафталинов [92]. В качестве растворителей были использованы бензол (I) и смесь (II) бензол — метанол (80:20). Значения R_f для этих соединений приведены ниже:

	R_f	
	I	II
<i>o</i> -Нитрофенол	0,56	0,79
<i>м</i> -Нитрофенол	0,12	0,55
<i>п</i> -Нитрофенол	0,07	0,53
<i>o</i> -Нитроанилин	0,34	0,61
<i>м</i> -Нитроанилин	0,19	0,53
<i>п</i> -Нитроанилин	0,16	0,50
<i>o</i> -Фенилендиамин	0	0,49
<i>м</i> -Фенилендиамин	0	0,40
<i>п</i> -Фенилендиамин	0	0,33
<i>o</i> -Аминофенол	0	0,50
<i>м</i> -Аминофенол	0	0,47
<i>п</i> -Аминофенол	0	0,41
<i>o</i> -Толуидин	0,19	0,65
<i>м</i> -Толуидин	0,17	0,62
<i>п</i> -Толуидин	0,15	0,59
<i>o</i> -Нитробензальдегид	0,36	0,66
<i>м</i> -Нитробензальдегид	0,31	0,69
<i>п</i> -Нитробензальдегид	0,33	0,68
α -Аминонафталин	0,20	0,68
β -Аминонафталин	0,17	0,66

Таким образом, используя предложенные системы растворителей, можно добиться удовлетворительного разделения *орто*-, *мета*- и *пара*-изомеров для ряда производных ароматических углеводородов.

В большинстве случаев наибольшей подвижностью обладают *орто*-изомеры, наименьшей — *пара*-изомеры.

Однако при тонкослойной хроматографии хлорнитробензолов на силикагеле хотя удастся провести разделение *орто*-, *мета*- и *пара*-изомеров, но характер подвижности изомеров здесь иной: наибольшим адсорбционным сродством, а следовательно, наименьшей подвижностью обладает *орто*-изомер [93].

Значения R_f при хроматографии на тонких слоях силикагеля *орто*-, *мета*- и *пара*-изомеров хлорнитробензола в различных системах растворителей [I — циклогексан — диизопропиловый эфир (2:1:1), II — петролейный эфир — этилацетат (95:5), III — петролейный эфир — этилацетат — диизопропиловый эфир (6:2:2)] приведены ниже:

	R_f		
	I	II	III
<i>орто</i> -Изомер	0,38	0,24	0,45
<i>мета</i> -Изомер	0,47	0,34	0,54
<i>пара</i> -Изомер	0,52	0,41	0,57

цис- и транс-Изомеры органических соединений. Довольно подробно изучено поведение на тонких слоях соединений, обладающих *цис-транс*-изомерией. Отмечено, что, как правило, при тонкослойной хроматографии *транс*-изомеры обладают значительно большей подвижностью и, следовательно, меньшим адсорбционным сродством, чем соответствующие им *цис*-изомеры.

Как уже указывалось выше (см. гл. 4), ненасыщенные дикарбоновые кислоты, имеющие одно и то же химическое строение, но различное пространственное расположение карбоксильных групп, обладают и различной подвижностью при хроматографии в тонких слоях.

Аналогично ведут себя *цис*- и *транс*-изомеры трикарбоновых, а также ароматических кислот. Так, *цис*- и *транс*-аконитовые кислоты при хроматографии на тонких слоях кизельгеля в системе растворителей бензол — метанол — ледяная уксусная кислота (45:8:4) характеризуются следующими значениями R_f :

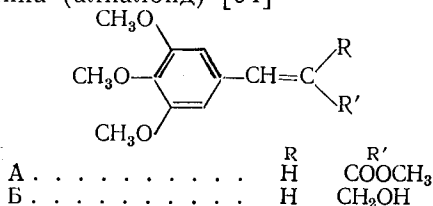
<i>транс</i> -Аконитовая кислота . . .	0,12
<i>цис</i> -Аконитовая кислота	0,03

Значения R_f *цис*- и *транс*-изомеров азобензола при хроматографии на тонких слоях кизельгеля в системе растворителей циклогексан — бензол (80:20) составляют:

<i>транс</i> -Изомер	0,60
<i>цис</i> -Изомер	0,07

Таким образом, *цис*-формы ароматических соединений также имеют значительно большее сорбционное сродство и, следовательно, меньшую подвижность при хроматографии на тонких слоях, чем соответствующие им *транс*-формы.

Однако этот вывод не может быть распространен на все соединения, обладающие *цис-транс*-изомерией. Так, при хроматографии *цис*- и *транс*-изомеров аналогов (А и Б) мецкалина (алкалоид) [94]



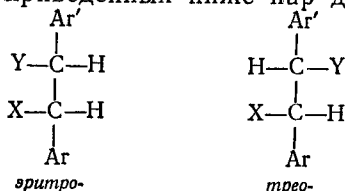
на силикагеле Н большей подвижностью обладают *цис*-изомеры:

Соединение	R_f				
	I	II	III	IV	V
А, <i>цис</i> -	0,69	0,70	0,86	0,49	0,42
А, <i>транс</i> -	0,66	0,68	0,86	0,40	0,35
Б, <i>цис</i> -	0,28	0,09	0,49	—	—
Б, <i>транс</i> -	0,23	0,09	0,46	—	—

* Растворители: I—петролейный эфир (30—60 °С)—ацетон (3:1); II—бензол—этилацетат (4:1); III—бензол—этилацетат (3:2); IV—петролейный эфир (30—60 °С)—ацетон (7:1); V—петролейный эфир (30—60 °С)—метанол (6:1).

В некоторых случаях метод тонкослойной хроматографии может быть использован для разделения *эритро*- и *трео*-изомеров, причем *эритро*-изомеры имеют более высокие значения R_f , чем соответствующие им *трео*-изомеры.

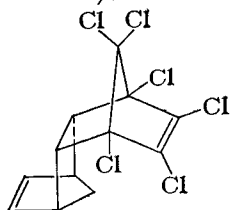
Разделение приведенных ниже пар диастереомеров



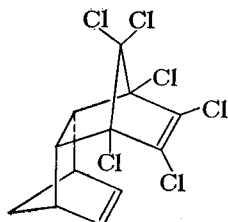
осуществляли в тонком слое силикагеля, используя различные системы растворителей (табл. 6).

Влияние конформационного состояния молекулы на ее хроматографическое поведение в тонких слоях. Под конформациями обычно понимают различные неидентичные пространственные формы молекулы, имеющие определенное строение и определенную конфигурацию.

На примере альдрина и изодрина было показано [90] влияние конформации на поведение молекул при хроматографии в тонких слоях (в качестве адсорбента использован кизельгель, в качестве растворителя — циклогексан).



альдрин

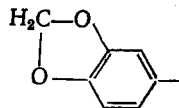







изодрин




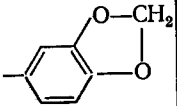

Таблица 6. Тонкослойная хроматография стереоизомеров [95]

I — этиловый эфир — гептан (2:1); II — гептан — этилацетат — метанол — аммиак (12:10 — 1,5:1, верхний слой); III — этиловый эфир — петролейный эфир (2:1); IV — этиловый эфир — гептан (1:5); V — бензол — этилацетат — этанол — аммиак (50:40:5:5, верхний слой); VI — этиловый эфир — гептан (1:1); VII — этиловый эфир; VIII — этиловый эфир — петролейный эфир; IX — этиловый эфир — ацетон (3:2); X — этиловый эфир — ацетон (4:1); XI — этиловый эфир — ацетон (9:1); XII — этиловый эфир — ацетон (7:3); XIII — этиловый эфир — метанол (17:3); XIV — этиловый эфир — метанол (1:1); XV — этилацетат — метанол — уксусная кислота (16:4:2); XVI — бензол — метанол — уксусная кислота (60:6:1); XVII — бензол — метанол — уксусная кислота (30:1:1).

Ar	Ar'	X	Y	R _f		Система растворителей
				трео-	эритро-	
<chem>c1ccccc1</chem>	<chem>c1ccccc1</chem>	NH ₂	COOCH ₃	0,30	0,39	I
<chem>COc1ccccc1OC</chem>	<chem>c1ccccc1</chem>	NH ₂	COOCH ₃	0,48	0,55	II
<chem>COc1ccc(OCCOC)cc1</chem>	<chem>c1ccccc1</chem>	NH ₂	COOCH ₃	0,27	0,41	I
<chem>c1ccccc1</chem>	<chem>c1ccccc1</chem>	NHCH ₃	COOCH ₃	0,39	0,55	I
<chem>COc1ccc(NC)cc1</chem>	<chem>c1ccccc1</chem>	NHCH ₃	COOCH ₃	0,48	0,60	I
<chem>COc1ccc(NC)cc1OC</chem>	<chem>c1ccccc1</chem>	NHCH ₃	COOCH ₃	0,27	0,39	I



	C_6H_5	$NHCH_3$	$COOCH_3$	0,31	0,51	I
C_6H_5	C_6H_5	$N(CH_3)_2$	$COOCH_3$	0,34	0,42	III
C_6H_5	C_6H_5	NHC_6H_5	$COOCH_3$	0,27	0,34	IV
C_6H_5	C_6H_5	$NHCONH_2$	$COOCH_3$	0,25	0,30	V
C_6H_5	C_6H_5	$NHCH_3$	$COOH$	0,46	0,52	XV
C_6H_5	C_6H_5	$NHCONH_2$	$COOH$	0,15	0,21	XVI
C_6H_5	C_6H_5	NH_2	CH_2OH	0,44	0,54	XIII
C_6H_5	C_6H_5	$NHCH_3$	CH_2OH	0,45	0,57	XIII
C_6H_5	C_6H_5	$CON(CH_3)_2$	CH_2COOCH_3	0,52	0,62	VII
C_6H_5	C_6H_5	$CON(C_2H_5)_2$	CH_2COOCH_3	0,32	0,39	VIII
C_6H_5	C_6H_5	CON  O	CH_2COOCH_3	0,43	0,52	VII
C_6H_5	C_6H_5	$CON(CH_3)_2$	$CH_2COOC_2H_5$	0,60	0,70	VII
C_6H_5	C_6H_5	$CON(C_2H_5)_2$	$CH_2COOC_2H_5$	0,40	0,46	VIII
C_6H_5	C_6H_5	CON  O	$CH_2COOC_2H_5$	0,52	0,58	VII
C_6H_5	C_6H_5	$CON(CH_3)_2$	$CH_2CON(CH_3)_2$	0,61	0,70	IX
C_6H_5	C_6H_5	$CON(CH_3)_2$	$CH_2CON(C_2H_5)_2$	0,49	0,66	X
C_6H_5	C_6H_5	$CON(CH_3)_2$	CH_2CON  O	0,45	0,60	IX
C_6H_5	C_6H_5	$CON(C_2H_5)_2$	$CH_2CON(CH_3)_2$	0,52	0,58	X
C_6H_5	C_6H_5	$CON(C_2H_5)_2$	$CH_2CON(C_2H_5)_2$	0,31	0,43	VII
C_6H_5	C_6H_5	$CON(C_2H_5)_2$	CH_2CON  O	0,32	0,43	XI
C_6H_5	C_6H_5	CON  O	$CH_2CON(CH_3)_2$	0,32	0,44	X

Ar	Ar'	X	Y	R_f		Система растворителей
				трео-	эритро-	
C_6H_5	C_6H_5	CON  O	$CH_2CON(C_2H_5)_2$	0,59	0,70	X
C_6H_5	C_6H_5	CON  O	CH_2CON 	0,38	0,54	XII
C_6H_5	C_6H_5	OH	$COOCH_3$	0,51	0,59	VI
C_6H_5		OH	$COOCH_3$	0,38	0,47	II
C_6H_5	C_6H_5	$CH_2N(C_2H_5)_2$	CH_2CH_2OH	0,35	0,52	XIV
C_6H_5	C_6H_5	CH_2N 	CH_2CH_2OH	0,15	0,46	VII
C_6H_5	C_6H_5	CH_2OH	CH_2CH_2OH	0,64	0,85	VII
C_6H_5	C_6H_5	OH	COOH	0,22	0,31	XVII

	R_f
Альдрин	0,60
Изодрин	0,50

Другой пример влияния конформации на различие в хроматографическом поведении молекул на тонких слоях может быть продемонстрирован на примере антрацена и дигидроантрацена. В качестве адсорбента был использован кизельгель. Антрацен имеет более высокое значение R_f , чем дигидроантрацен, и вследствие этого может быть легко отделен от дигидросоединения [96]. Еще более высокой подвижностью обладает октагидроантрацен, получаемый каталитическим гидрированием антрацена.

Аналогично ведут себя фенантрен $C_{14}H_{10}$ и его ди- и октагидропроизводные.

Ниже приводятся значения R_f , полученные при хроматографии на тонких слоях кизельгеля для антрацена, дигидроантрацена и октагидроантрацена, а также для фенантрена, дигидрофенантрена и октагидрофенантрена:

	R_f
Антрацен	0,30
9,10-Дигидроантрацен	0,21
Октагидроантрацен	0,43
Фенантрен	0,28
9,10-Дигидрофенантрен	0,25
Октагидрофенантрен	0,37

Различие в их адсорбционном поведении является, по-видимому, результатом конформационных изменений молекул, вызванных процессом гидрогенизации ароматических углеводородов.

Гетероциклические соединения. На адсорбционное поведение производных пиридина при тонкослойной хроматографии оказывают влияние как различные замещающие группы в молекуле пиридина ($COOH$, OH , NH_2 , CNO , CH_3 и др.), так и их положение в молекуле [90, 97, 98].

Значения R_f для пиридина и его различных производных на кизельгеле в хлороформе (I), этилацетате (II) и ацетоне (III) приведены ниже [97]:

	R_f		
	I	II	III
Пиридин	0,04	0,29	0,54
α -Пиколин (2-метилпиридин) . .	0,03	0,30	0,54
β -Пиколин (3-метилпиридин) . .	0,06	0,35	0,55
γ -Пиколин (4-метилпиридин) . .	0,04	0,27	0,48
2,4-Лутидин (2,4-диметилпиридин)	0,04	0,28	0,49
2,6-Лутидин (2,6-диметилпиридин)	0,06	0,36	0,59
Коллидин (2,4,6-триметилпиридин)	0,02	0,26	0,51
Конирин (2-пропилпиридин) . .	0,12	0,47	0,64
2-Оксипиридин	—	0,06	0,20
3-Оксипиридин	—	0,23	0,53
4-Оксипиридин	—	0,00	0,02
2-Амиопиридин	—	0,27	0,50
3-Амиопиридин	—	0,18	0,45
4-Амиопиридин	—	0,05	0,14
2-Формилпиридин	—	0,51	0,67
3-Формилпиридин	—	0,33	0,58
4-Формилпиридин	—	0,36	0,56
2-Пиридинкарбоновая кислота	—	0,02	0,04
3-Пиридинкарбоновая (никотиновая) кислота	—	0,06	0,06
4-Пиридинкарбоновая (изоникотиновая) кислота	—	0,05	0,05

Как видно, монометилпроизводные пиридина — пиколины в тонких слоях кизельгеля имеют сравнительно близкие значения R_f , однако α - и γ -пиколины имеют большее адсорбционное средство и меньшую подвижность на хроматограммах, чем β -пиколин. Подвижности диметил- и триметилпиридинов различаются более сильно.

Увеличение в пиридиновом кольце длины боковой углеродной цепи (конирин) приводит к уменьшению адсорбционного средства и увеличению подвижности молекулы.

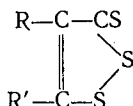
Изучено поведение хинолина, изохинолина, а также их производных при помощи хроматографии в тонких слоях на кизельгеле [98]; в качестве растворителя был использован хлороформ:

	R_f
Хинолин	0,11
Изохинолин	0,12
2-Метилхинолин (хинальдин)	0,16
4-Метилхинолин (лепидин)	0,13

6-Метилхинолин	0,18
7-Метилхинолин	0,16
8-Метилхинолин	0,31
2,4-Диметилхинолин	0,08
4,6-Диметилхинолин	0,11
2,8-Диметилхинолин	0,47

Наиболее сильно влияние метильной группы сказывается в случае 8-метилхинолина, а также 2,8-диметилхинолина.

Интересно поведение при хроматографии в тонких слоях гетероциклических соединений, содержащих серу, типа:



Показано [99], что подвижность этих соединений зависит от природы заместителей R и R'. Разделение осуществляли в тонком слое кизельгеля с предварительной активацией пластинок в течение 30 мин при 120—130 °С, в качестве элюента использовали петролейный эфир — бензол (1:1) (I) и сероуглерод (II). Полученные значения R_f приведены ниже:

R	R'	R_f	
		I	II
H	H	0,19	0,14
H	C ₆ H ₅	0,32	0,17
H	C ₆ H ₅ OCH ₃	0,15	0,05
H	C ₆ H ₅ Br	0,37	0,22
CH ₃	H	0,29	0,23
CH ₃	CH ₃	0,27	0,21
CH ₃	C ₆ H ₅	0,38	0,29
C ₂ H ₅	H	0,35	0,33
C ₆ H ₅	H	0,02	0,30
C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	0,31	0,14
COOC ₂ H ₅	NHCOCH ₃	0,07	0,0

Таким образом, изменения в структуре молекулы серосодержащего гетероциклического соединения непосредственно отражаются на его подвижности в тонких слоях. Тонкослойная хроматография, особенно в сочетании с другими методами, например спектроскопией, может быть использована для разделения, характеристики и идентификации таких соединений.

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПЕСТИЦИДОВ

В настоящее время для борьбы с вредителями, возбудителями заболеваний различных культурных растений и сорняками очень широко применяют пестициды, производство которых непрерывно возрастает.

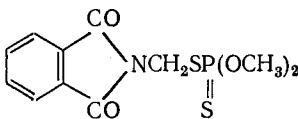
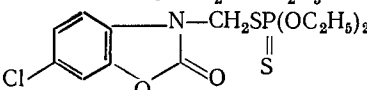
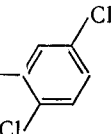
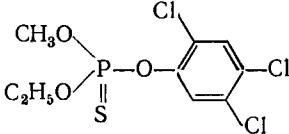
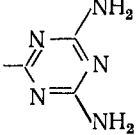
Чрезвычайно актуальной стала задача контроля над остаточными количествами пестицидов в окружающей среде, что потребовало разработки высокочувствительных методов определения пестицидов [100]. Среди методов определения пестицидов широкое применение получили различные хроматографические методы: жидкостная хроматография на колонках, газо-жидкостная хроматография и, в последнее время, метод тонкослойной хроматографии. Большой интерес представляет новая модификация этого метода — метод тонкослойно-хроматографического ингибирования ферментов для определения пестицидов, позволяющий сочетать хроматографию в тонких слоях с ферментативными реакциями.

Тонкослойная хроматография довольно широко и успешно применялась для анализа и идентификации фосфорсодержащих пестицидов. Используя различные комбинации растворителей, а также осуществляя соответствующий подбор сорбентов, можно разделить и идентифицировать очень большое число фосфорорганических пестицидов.

Успешное применение тонкослойной хроматографии для анализа пестицидов продемонстрировано [101] при определении остаточных количеств различных фосфорорганических соединений. В качестве адсорбентов использовали различные марки силикагеля.

В табл. 7 приведены значения R_f для этих пестицидов (растворители — хлороформ и метанол).

Таблица 7. Значения R_f некоторых пестицидов при тонкослойной хроматографии на силикагеле КСК

Пестицид	Структурная формула	R_f	
		хлоро- форм	мета- нол
Фталофос		0,36	—
Бутифос	$(C_4H_9S)_3P=O$	0,41	—
Малатион	$(CH_3O)_2PSCHCOOC_2H_5$	0,59	—
Фозалон		0,72	—
Цидиал	$(CH_3O)_2PSCHCOOC_2H_5$	0,80	—
Фенкаптон	$(C_2H_5O)_2PSCH_2S-$ 	0,85	—
Трихлорметафос 3		1,00	—
Сайфос	$(CH_3O)_2PSCH_2-$ 	0,0	0,38
Кильваль	$(CH_3O)_2PS(CH_2)_2SCHCH_3$	0,0	0,57
Рогор	$(CH_3O)_2PSCH_2CONHCH_3$	0,0	0,75
Хлорофос	$(CH_3O)_2P(=O)(OH)CHCl_3$	0,0	1,00

На значение R_f влияет как характер адсорбента [на крупнопористом силикагеле (КСК) сорбционное сродство пестицидов меньше, чем на среднепористом (КСС-3)], так и полярность растворителя (R_f увеличивается с увеличением диэлектрической постоянной растворителя).

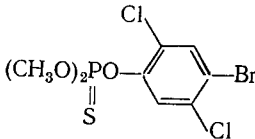
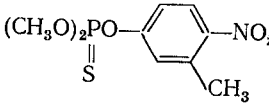
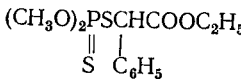
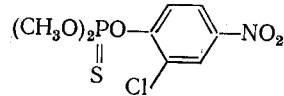
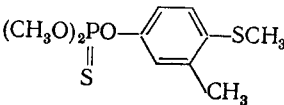
Чувствительность обнаружения пестицидов при проявлении пятен на хроматограммах при помощи бромфенолового реактива составляет 0,2—0,5 мкг.

Таблица 8. Значения R_f некоторых фосфорсодержащих пестицидов при тонкослойной хроматографии на кизельгеле

Пестицид	Структурная формула	R_f	
		I	II
Этион	$\text{CH}_2 \left[\begin{array}{c} \text{SP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2 \\ \parallel \\ \text{S} \end{array} \right]_2$	0,88	0,97
Дистион	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{PS}(\text{CH}_2)_2\text{SC}_2\text{H}_5$	0,72	0,95
Тимет	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{PSCH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$	0,61	0,95
Малатион	$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P} \begin{array}{c} \parallel \\ \text{S} \end{array} \begin{array}{c} \\ \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$	0,12	0,68
Роннел	$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{POC}_6\text{H}_2\text{Cl}_3\text{-}2,4,5$	0,07	0,43
Бутонат	$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P} \begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \\ \text{CHOCOC}_3\text{H}_7 \\ \\ \text{CCl}_3 \end{array}$	—	0,29
Малаоксон	$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P} \begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \\ \text{CHCOOC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$	0	0,23
Фосдрин	$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P} \begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \\ \text{CHCOOCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	0	0,05

Осуществлено разделение около 20 фосфорорганических пестицидов [102]; в качестве растворителей были

Таблица 9. Значения R_f некоторых пестицидов при тонкослойной хроматографии на окиси алюминия и силикагеле

Пестицид	Структурная формула	Окись алюминия			Силикагель		
		I	II	III	I	II	III
Бромфос		0,55	0,83	0,47	—	—	0,85
Метатион		0,55	0,77	0,41	0,73	0,78	0,70
Цидиал		0,52	0,85	0,35	0,73	0,96	0,70
Дикаптон		0,50	0,85	0,03	0,82	0,90	0,55
Байтекс		0,31	0,74	0,18	0,50	0,89	0,79

использованы: I — *n*-гексан — бензол — ацетон (15:10:1), II — бензол — ацетон (19:1); адсорбент — кизельгель.

Значения R_f для некоторых из этих пестицидов приведены в табл. 8.

Для разделения фосфорорганических пестицидов были использованы также силикагель и окись алюминия [103]. Растворителями служили: I — *n*-гексан — ацетон (3:1), II — хлороформ — ацетон (9:1) и III — *n*-гексан — ацетон (5:1) (см. табл. 9).

В работе [104] приведена общая схема экстракции фосфорсодержащих пестицидов из пищевых продуктов с последующим разделением вытяжки из хлороформа при помощи тонкослойной хроматографии в сочетании с газовой хроматографией. В работе приведены значения R_f почти для 40 фосфорорганических пестицидов.

Двумерная тонкослойная хроматография фозалона из экстракта яблок проведена на силикагеле КСК в системе растворителей гексан — ацетон (4:1) [105].

Осуществлено [106] успешное разделение смеси четырех фосфорсодержащих пестицидов в тонких слоях силикагеля в системе растворителей бензол — петролейный эфир (6:4):

	R_f
Фозалон	0,55
Метатион	0,65
Цидиал	0,70 (0,25)*
Трихлорметафос 3	0,95 (0,25)*

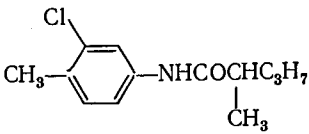
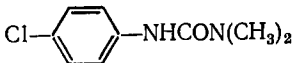
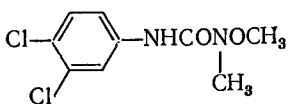
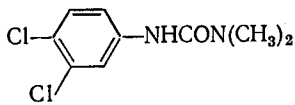
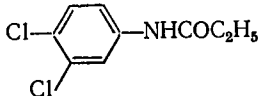
* В этой системе растворителей цидиал и трихлорметафос 3 образуют два пятна.

Для определения остаточных количеств фталофоса в пищевых продуктах в качестве сорбента использовали силикагель марки КСК в различных системах растворителей [107]. Экстракт из пищевой массы обычно содержит вместе с фталофосом продукт его разложения — оксиметилфталимид, который может быть легко отделен от фталофоса тонкослойной хроматографией в бензоле, хлороформе или смеси бензола и этанола (50:1):

Соединение	R_f		
	Бензол	Хлороформ	Бензол — этанол (50:1)
Фталофос	0,34	0,45	0,46
Оксиметилфталимид	0,0	0,07	0,08

Тонкослойная хроматография является весьма перспективным методом определения и разделения азотсодержащих гербицидов. Описано разделение таких препаратов в тонких слоях окиси алюминия, закрепленных гипсом (см. табл. 10).

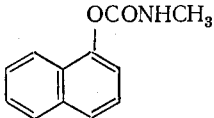
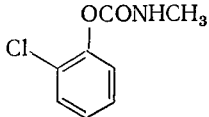
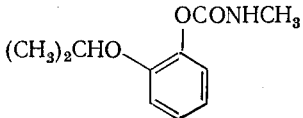
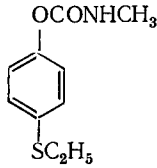
Таблица 10. Значения R_f некоторых гербицидов в различных системах растворителей:

Препарат	Структурная формула	R_f	Растворитель
Солан		0,65	Эфир — четыреххлористый углерод (1:1)
Монурон		0,43	Хлороформ
Линурон		0,42	Эфир — четыреххлористый углерод (3:2)
Диурон		0,41	Хлороформ
Пропанид		0,35	Эфир — четыреххлористый углерод (1:1)

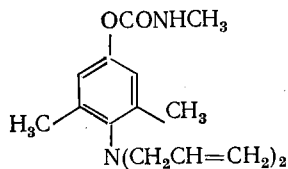
Пестициды, относящиеся к классу дитиокарбаматов также подвергали хроматографическому разделению в тонких слоях. Так, на окиси алюминия в системе раст-

Таблица 11. Значения R_f некоторых пестицидов в различных системах растворителей:

I — вода—метанол (5:5); II—вода—этанол—метанол (5:1:4); III—вода—ацетон (5:5); IV—вода—муравьиная кислота—метанол (4:1:5); V—вода—26%-ный аммиак—метанол (3:1:6); VI—циклогексан—ацетон (8:2)

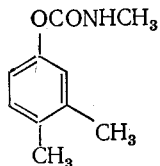
Соединение	Структурная формула	R_f					
		I	II	III	IV	V	VI
α -Нафтил-N-метилкарбамат (севин)		0,42	0,52	0,57	0,63	0,61	0,51
2-Хлорфенил-N-метилкарбамат (хопцид)		0,62	0,68	0,67	0,75	0,82	0,54
2-Изопропоксифенил-N-метилкарбамат (байгон)		0,73	0,78	0,74	0,81	0,82	0,60
4-Этилтиофенил-N-метилкарбамат		0,52	0,61	0,59	0,70	0,72	0,60

4-Диаллиламино-3,5-диметилфенил-
N-метилкарбамат (гидрол)



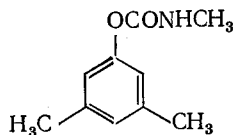
0,32 0,71 0,40 0,90 0,62 0,78

3,4-Диметилфенил-N-метилкарбамат
(меобал)



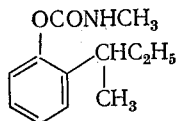
0,60 0,70 0,65 0,74 0,74 0,61

3,5-Диметилфенил-N-метилкарбамат
(макбарль)



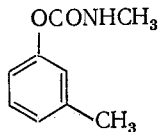
0,58 0,69 0,65 0,74 0,73 0,67

2-втор-Бутилфенил-N-метилкарбамат

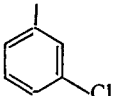
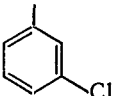
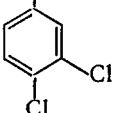

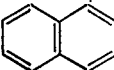


0,58 0,67 0,59 0,73 0,73 0,74

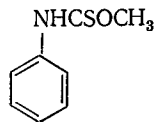
3-Метилфенил-N-метилкарбамат (ТМК)



0,67 0,76 0,70 0,78 0,76 0,63

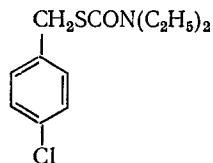
Соединение	Структурная формула	R_f					
		I	II	III	IV	V	VI
Изопропил-N-(3-хлорфенил)- карбамат (ИФК)	$\text{NHCOOCH}(\text{CH}_3)_2$ 	0,28	0,39	0,40	0,50	0,54	0,79
4-Хлорбутин-2-ил-N-(3-хлорфенил)- карбамат (карбин)	$\text{NHCOOCH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{Cl}$ 	0,22	0,33	0,35	0,47	0,50	0,67
Метил-N-(3,4-дихлорфенил)- карбамат (НИА 2995)	NHCOOCH_3 	0,20	0,29	0,34	0,41	0,44	0,60
Метил-N-фенилкарбамат	NHCOOCH_3 	0,56	0,66	0,64	0,71	0,70	0,61
Метил-N-α-нафтилкарбамат	NHCOOCH_3 	0,39	0,51	0,53	0,58	0,59	0,58

Метил-N-фенилтиокарбамат



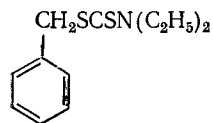
0,35 0,41 0,41 0,48 0,58 0,65

S-(4-Хлорбензил)-N,N-диэтил-
тиокарбамат (сатурн)



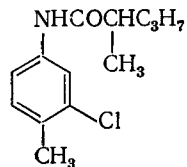
0,34 0,40 0,36 0,53 0,62 0,95

S-Бензил-N,N-диэтил-
дитиокарбамат

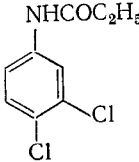
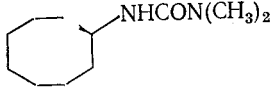
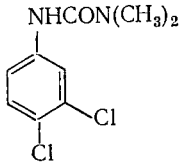


0,19 0,24 0,27 0,38 0,49 0,93

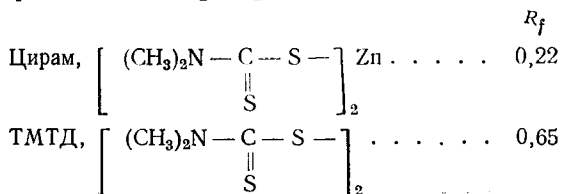
2-Метилвалериановая кислота,
3-хлор-4-метиланилид (солан)



0,21 0,33 0,32 0,48 0,50 0,72

Соединение	Структурная формула	R_f					
		I	II	III	IV	V	VI
Пропионовая кислота, 3,4-дихлор-анилид (пропанид)		0,23	0,33	0,36	0,47	0,47	0,50
N-Циклооктил-N',N'-диметил-мочевина (ОМУ)		0,71	0,77	0,72	0,80	0,81	0,61
N-(3,4-Дихлорфенил)-N',N'-диметил-мочевина (диурон)		0,33	0,45	—	0,56	—	0,45

ворителей *n*-гексан — бензол — ацетон (10:1:2,5) разделены цирам и ТМТД [109]:



Применение тонкослойной хроматографии дает возможность определить качественно, а также и количественно дитиокарбаматы и продукты их распада.

Помимо окиси алюминия в качестве сорбента для разделения пестицидов — производных карбаминовой кислоты были использованы также полиамиды. На тонких слоях полиамида марки Wako В-10, содержащих в качестве связующего вещества безводный сульфат кальция, были успешно разделены некоторые такие пестициды [110] (см. табл. 11).

Метод идентификации пестицидов в тонком слое полиамида оказался достаточно чувствительным. Так, при использовании пинакриптола желтого [111] в сочетании с облучением УФ-светом предел чувствительности определения таких пестицидов составляет от 0,01—0,05 до 0,5 мкг.

Отмечают, что метод определения пестицидов в тонком слое полиамида обладает значительно большей чувствительностью, чем, например, в слое силикагеля.

Для анализа остатков хлорорганических пестицидов в пищевых продуктах был предложен метод хроматографии в тонких слоях алюминия, импрегнированного нитратом серебра (30 г сорбента, 45 мл 0,4%-ного водного раствора AgNO_3) [112, 113]. Пластинки перед хроматографией предварительно активировали в течение 2 ч при 100°C [112]; в качестве растворителя применяли гексан (см. табл. 12).

ДДТ и его аналоги были разделены при помощи двумерной хроматографии на тонких слоях кизельгеля G-HR в системе растворителей гептан — ацетон (98:2) [114], а также на окиси алюминия [115]. При этом в некоторых системах растворителей удалось получить достаточно хорошее разделение (см. табл. 13).

Таблица 12. Значения R_f некоторых хлорсодержащих пестицидов

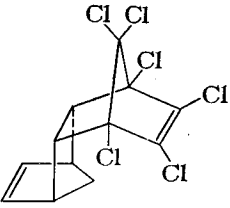
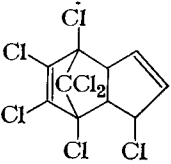
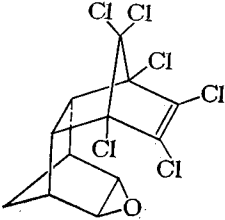
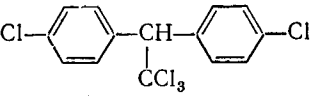
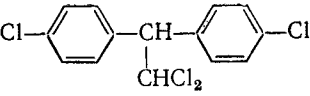
Пестицид	Структурная формула	R_f
Альдрин		0,70
Гептахлор		0,65
Эндрин		0,14
ДДТ		0,52
ДДД		0,25

Таблица 13. Значения R_f производных ДДТ на окиси алюминия в различных системах растворителей:

I—*n*-гептан; II—*n*-гексан; III—*n*-гексан—уксусная кислота (9 : 1); IV—*n*-гексан—эфир—уксусная кислота (100 : 1 : 1)

Пестицид	R_f			
	I	II	III	IV
ДДТ	0,67	0,74	0,85	0,92
ДДЕ	0,85	0,89	0,94	0,95
ДДД	0,39	0,47	0,85	0,75
ДДА	0,00	0,00	0,32	0,03

Определенный интерес представляет сопоставление метода тонкослойной хроматографии пестицидов с биологическим методом определения последних [116]. Сравнительная чувствительность этих методов приведена ниже:

Пестицид	Чувствительность метода*	
	биологич.	ТСХ
Цидиал	$3,4 \cdot 10^{-5}$	2,5
Метилэтилтиофос	$6,6 \cdot 10^{-4}$	2,5
Метафос	$7,2 \cdot 10^{-4}$	2,5
Метатион	$7,1 \cdot 10^{-3}$	5,0
Малатион	$1,4 \cdot 10^{-2}$	10,0
Хлорофос	$2,2 \cdot 10^{-2}$	5,0
Дихлорофос	$6,6 \cdot 10^{-2}$	10,0
Фталофос	$3,2 \cdot 10^{-2}$	2,0
Севин	$1,4 \cdot 10^{-1}$	2,5
Фозалон	$1,2 \cdot 10^{-1}$	2,0
Метилмеркаптофос	1,3	25,0
Антио	1,1	5,0
Рогор	1,6	5,0
Кильваль	4,9	2,0
Фитиос	3,6	2,0

* Чувствительность метода оценивается в мг/л вытяжки.

Таким образом, оказывается, что для метилмеркаптофоса, кильваля, фитиоса, рогора и антио метод тонкослойной хроматографии по степени чувствительности анализа близок к биологическому методу, тогда как для метилэтилтиофоса, метафоса, метатиона, малатиона, цидиала, хлорофоса и дихлорофоса биологический метод по чувствительности значительно превосходит метод тонкослойной хроматографии. В этом случае необходимо предварительное концентрирование анализируемых пестицидов обычными методами органической химии [117].

Применение для опрыскивания пластинок в тонкослойной хроматографии пестицидов, содержащих серу, 1,2-дихлор-4,5-дицианобензохинона в сочетании с флуорометрией позволило повысить чувствительность этого метода [118]:

Пестицид	Предел чувствительности, мкг
Рогор	0,050
Этион	0,010
Гузатион	0,050
Малатион	0,025
Прометрин	0,100
Тимет	0,040

Оценка пестицидов на тонкослойных хроматографах при помощи ингибирования ферментативных реакций. Этот метод может быть с успехом использован не только для оценки остаточных количеств пестицидов в окружающей среде и продуктах питания, но и для изучения путей метаболизма пестицидов в организме, а также в области криминологии и судебной химии.

Экстракт, содержащий исследуемый пестицид, наносят на хроматографическую пластинку и подвергают хроматографии. Затем эту пластинку последовательно обрабатывают раствором фермента и раствором субстрата. В результате на хроматографической пластинке происходит ферментативная реакция. Присутствие в пятне пестицида ингибирует эту реакцию. Для идентификации пятен на пластинке в том случае, если они бесцветны, применяют соответствующие индикаторы. Иногда бесцветные пятна контрастируют с окрашенным фоном пластинки. Такова, в общих чертах, техника

метода тонкослойно-хроматографического ингибирования ферментов.

При помощи этого метода были идентифицированы различные хлорсодержащие пестициды; в качестве фермента использовали фосфатазы, субстратом служил нафтил- или нитрофенилфосфат [119].

Чувствительность метода зависит от использованного субстрата, пестицида и предварительной подготовки материала (см. табл. 14).

Таблица 14. Чувствительность (в мкг) метода тонкослойно-хроматографического ингибирования ферментов

НФФ — нитрофенилфосфат; НФ — нафтилфосфат

Пестицид	Кислая фосфатаза		Щелочная фосфатаза	
	НФФ	НФ	НФФ	НФ
ДДТ	70	30	50	8
ДДД	30	10	60	6
ДДЕ	20	10	50	6
Кельтан	30	7	20	2
Метоксихлор	20	7	30	6
Перфан	30	2	20	2
Гексахлорбензол	100	100	150	—
Линдан	40	30	150	70
Изодрин	40	30	70	70
Эндрин	30	20	80	40
Альдрин	20	20	60	30
Дильдрин	40	20	80	30
Гептахлор	50	10	50	10
Октахлор	50	7	60	8
Эндосульфат	40	10	50	8
Октафен	100	80	50	20

Как видно из приведенных в табл. 14 данных, нафтилфосфат оказался более чувствительным субстратом, чем нитрофенилфосфат.

В работе [120] для оценки хлорорганических пестицидов в качестве фермента применяли трипсин, субстратом служил гидрохлорид *n*-нитроанилида *N*-бензоиларгинина.

По чувствительности метод тонкослойно-хроматографического ингибирования ферментов может с успехом конкурировать с токсикологическим определением пестицидов по индексу летальности (LD_{50}) и может быть

использован для токсикологической оценки пестицидов [121].

Представляют интерес работы, показывающие возможность применения этого метода в области судебной химии [121—123]. В качестве ферментов использовали эстеразу печени быка, субстратом служил β -нафтил-ацетат.

Показано [121, 123], что метод тонкослойно-хроматографического ингибирования ферментов по чувствительности значительно превосходит метод химического определения пестицидов и не уступает трудоемкому биологическому методу.

В цифровом исчислении предел чувствительности определения пестицидов методом ТСХ-ФИ составляет $10 \div 50$ нг.

Т а б л и ц а 15. Тонкослойно-хроматографическое определение пестицидов ингибированием ферментов

+ наличие ингибирования; — отсутствие ингибирования

Пестицид	Предел чувствительности*, нг	Эстеразы, полученные из печени				
		быка	овцы	свиньи	обезьяны	курицы
Севин	1	+	+	+	+(—)**	+
Дихлорофос	8	+	+	+	+	+
Этион	10	+	+	+	+	+
Метасистокс-И	50	+	+	+	+	—
Меркаптофос	50	+	+	+	+	—
Метасистокс-Р	50	+	+	+	+	—
Рогор	10 000	+	+	+	+	+
Диметоксон	10 000	+	+	+	+	+

* Наименьшее количество пестицида, при котором происходит ингибирование фермента пестицидом.

** При использовании водной вытяжки из печени ингибирование фермента не происходит, тогда как при использовании фермента, экстрагированного с помощью трисбуфера, осуществляется ингибирование.

Показана [124] успешная возможность сочетания методов тонкослойно-хроматографического ингибирования ферментов и полярографии для анализа фосфорорганических пестицидов — метатиона и его аналогов. Сорбентом служит силикагель; для проявления хроматограммы использовали систему петролейный эфир (фракция, перегоняющаяся при $60\text{—}80^\circ\text{C}$) — ацетон (3:1); ферменты — препараты эстераз. После опры-

**Т а б л и ц а 16. Значения R_f для пестицидов на различных адсорбентах
в разных системах растворителей:**

I — ацетон — бензол — пентан (20:10:70); II — ацетон — гексан (20:80)

Пестицид	Кизельгель		Силикагель		Силикагель D-5		Силикагель H		Силикагель AR		Оксид алюминия DS-5	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Темик	0,62	0,21	0,43	0,14	0,38	0,08	0,43	0,17	—	—	0,60	0,20
Карбоналат	0,89	0,35	0,64	0,26	0,55	0,18	0,63	0,28	—	0,27	0,73	0,42
Байгон	0,77	0,30	0,57	0,22	0,42	0,14	0,49	0,22	0,47	0,23	0,63	0,20
Фурадан	0,80	0,20	0,45	0,18	0,33	0,12	0,51	0,21	0,52	0,26	0,57	0,20
Аминокарб	0,70	0,28	0,45	0,18	0,33	0,12	0,51	0,21	0,47	0,21	0,57	0,22
Мезурол	0,80	0,35	0,54	0,22	0,47	0,18	0,60	0,27	0,62	0,33	0,63	0,27
Мобам	0,69	0,25	0,45	0,14	0,33	0,09	0,51	0,20	0,47	0,26	0,52	0,16
Орто-5353	0,89	0,39	0,65	0,25	0,61	0,19	0,68	0,32	0,60	0,35	0,73	0,30
Трицид	—	—	0,12	0,03	0,07	0,01	0,16	0,04	0,15	0,05	0,03	0,0
Цектран	0,86	0,37	0,64	0,24	0,61	0,19	0,71	0,30	0,60	0,39	0,73	0,30

скивания пластинки раствором фермента ее помещают во влажную камеру, насыщенную парами воды, и выдерживают в течение 30 мин. Затем опрыскивают проявляющим реагентом. Пятна переносят в небольшую колонку и элюируют минимальным количеством ацетона; полученный элюат оценивают полярнографически.

При тонкослойно-хроматографическом ингибировании ферментов были использованы [125] также эстеразы, полученные из печени быка, свиньи, овцы, обезьяны и курицы. Показано, что, во-первых, ферментативные реакции обладают разным пределом чувствительности по отношению к ингибированию различными пестицидами, а во-вторых, в зависимости от природы полученной ферментативной вытяжки ингибирование фермента может и не осуществляться (см. табл. 15).

Таблица 17. Пределы чувствительности ингибирования фермента пестицидами (фермент — эстераза из печени свиньи)

Пестицид	Предел чувствительности, нг		
	Кизельгель	Силикагель G	Оксид алюминия
Темик	50,0	30,0	10,0
Карбоналат	0,5	0,5	0,5
Байгон	10,0	10,0	10,0
Фурадан	1,0	1,0	1,0
Аминокарб	10,0	5,0	1,0
Мезурол	0,1	0,1	0,1
Мобам	0,5	0,1	0,5
Орто-5353	1,0	1,0	1,0
Тринид	100,0	50,0	5,0
Цектран	50,0	0,5	5,0

Следует отметить, что недостатком данной работы является использование не очищенных препаратов ферментов, а экстрактов из печени.

Метод тонкослойно-хроматографического ингибирования ферментов был тщательно изучен [126] для группы пестицидов — производных карбаминовой кислоты. Проведено сравнение различных типов адсорбентов (кизельгель, силикагели разных марок, оксид алюминия), систем растворителей, дана оценка чувствительности метода. В качестве ферментов были использова-

ны эстеразы из печени быка. Значения R_f для этих пестицидов на различных адсорбентах при использовании разных систем растворителей приведены в табл. 16.

В табл. 17 приведены наименьшие количества пестицидов, которые могут быть определены методом ферментативного ингибирования в тонких слоях. Интересно, что чувствительность метода в значительной мере зависит от типа применяемого адсорбента.

Сочетание методов тонкослойной хроматографии пестицидов и ингибирования ферментативных реакций в тонких слоях адсорбента еще более расширяет возможности метода тонкослойной хроматографии.

Анализу пестицидов при помощи метода тонкослойной хроматографии посвящена монография [127, с. 190].

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КОНСЕРВАНТОВ, ПИЩЕВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И АНТИОКСИДАНТОВ

Консерванты. В настоящее время широкое распространение получило применение различных консервирующих веществ (консервантов) для увеличения срока годности пищевых продуктов.

Расширение применения консервантов, увеличение их количества, а также потребность в их стандартизации — все это привело к необходимости разработки по возможности простых и экономичных способов анализа и определения консервантов в пищевых продуктах.

Хорошие результаты дало использование для анализа консервантов метода тонкослойной хроматографии.

Значения R_f для некоторых консервантов на смеси кизельгеля и кизельгура (1:1) (I) в системе растворителей петролейный эфир — хлороформ — муравьиная кислота (100:40:10) [128] и на целлюлозе (II) в системе растворителей *n*-бутанол — 35%-ный аммиак — вода (70:20:10) [129] приведены ниже:

Консервант	R_f	
	I	II
Бензойная кислота	0,77	0,50
Сорбиновая кислота	0,72	0,58
Салициловая кислота	0,63	0,56
Дегидроацетовая кислота	0,57	0,09
Бромацетоуксусная кислота	0,41	—
Пропил- <i>n</i> -оксибензоат	0,29	0,90
Этил- <i>n</i> -оксибензоат	0,24	0,86
Метил- <i>n</i> -оксибензоат	0,19	0,75
<i>n</i> -Оксибензойная кислота	0,10	—

В табл. 18 приведены значения R_f для некоторых консервантов при использовании в качестве адсорбентов силикагеля, полиамида и их смеси.

Таблица 18. Значения R_f для некоторых консервантов на различных адсорбентах:

I—*n*-гексан—бензол—ледяная уксусная кислота (1:1:1) [130];
II—вода—28%-ный аммиак (20:5)

Консервант	Смесь силикагеля и полиамида		Силикагель		Полиамид	
	I	II	I	II	I	II
Сорбиновая кислота	0,88	0,73	0,87	0,95	0,98	0,94
Бензойная кислота	0,84	0,64	0,89	0,96	0,98	0,88
Дегидроацетовая кислота	0,74	0,63	0,96	0,95	0,80	0,85
Салициловая кислота	0,66	0,49	0,84	0,96	0,62	0,74
Изобутил- <i>n</i> -оксибензоат	0,53	0,21	0,80	0,69	0,81	0,50
<i>n</i> -Бутил- <i>n</i> -оксибензоат	0,49	0,24	0,79	0,69	0,78	0,49
Изопропил- <i>n</i> -оксибензоат	0,44	0,32	0,78	0,72	0,74	0,60
<i>n</i> -Пропил- <i>n</i> -оксибензоат	0,41	0,34	0,78	0,79	0,74	0,59
Этил- <i>n</i> -оксибензоат	0,35	0,46	0,77	0,88	0,69	0,70
Метил- <i>n</i> -оксибензоат	0,30	0,55	0,73	0,91	0,61	0,78

При использовании смеси адсорбентов удается разделить бензойную и сорбиновую кислоты, а также пропил- и изопропил-*n*-оксибензоаты.

Успешное разделение смеси консервантов осуществлено [131] при использовании в качестве адсорбента смеси целлюлозы и силикагеля (7,5 г целлюлозы MN-300 и 15 г силикагеля G в 70 мл дистиллированной воды). Пластинки (20×20 см) предварительно активировали при 110°C в течение 30 мин. Растворитель: петролейный эфир (т. кип. 40—60°C) — четыреххлористый углерод — хлороформ — муравьиная кислота — уксусная кислота (50:40:20:8:2). Значения R_f приведены ниже:

Бензойная кислота	0,70	Пропил- <i>n</i> -оксибензоат	0,24
Сорбиновая кислота	0,63	Этил- <i>n</i> -оксибензоат	0,20
Салициловая кислота	0,56	Метил- <i>n</i> -оксибензоат	0,13
Дегидроацетовая кислота	0,50	<i>n</i> -Оксибензойная кислота	0,06
Бромацетоуксусная кислота	0,30		

Идентификация соединений после хроматографии в тонких слоях проводилась в ультрафиолетовых лучах

после опрыскивания пластинки различными реагентами:

Соединение	Реагент
Бензойная кислота . . .	Смесь 4,5 мл 30%-ной H_2O_2 , 1 мл насыщенного раствора $MnSO_4$, 4,5 мл H_2O
Салициловая кислота . .	0,1%-ный водный раствор $FeCl_3$
Дегидроацетовая кислота	3%-ный водный раствор $TiCl_3$ или 0,1%-ный водный раствор $FeCl_3$
Сорбиновая кислота . . .	0,5%-ный раствор $K_2Cr_2O_7$ в 0,3 н. H_2SO_4 с последующей обработкой насыщенным раствором тиобарбитуровой кислоты
Бромацетоуксусная кислота	Смесь (3:1, по объему) растворов фенолового красного (24 мг в 2,4 мл 0,1 н. $NaOH$, ацетон до 100 мл) и ацетата натрия (6 г в 3 мл CH_3COOH , вода до 100 мл)
Эфиры оксибензойной кислоты	Смесь 10%-ного раствора $NaOH$, 2%-ного спиртового раствора аминоантипирина и 8%-ного водного раствора $K_3Fe(CN)_6$

Данные по хроматографии в тонком слое наиболее часто используемых пищевых консервантов в различных системах растворителей на полиамиде марок Woelm и Wako B-10 [132] приведены в табл. 19.

Во всех использованных системах растворителей в тонком слое полиамида может быть достигнуто удовлетворительное разделение приведенных выше пищевых консервантов [132]. Во всех случаях для полиамида марки Woelm наблюдается значительно более сильное адсорбционное сродство по отношению к испытанным консервантам, чем для полиамида Wako B-10.

Авторы отмечают, что обнаружение пятен на пластинках с полиамидным сорбентом при помощи ультрафиолетовой спектрофотометрии оказалось почти в двадцать раз более чувствительным, чем на слоях силикагеля. По-видимому, тонкослойная хроматография на полиамидных сорбентах может быть использована для микроанализа пищевых консервантов.

Окраска пятен, возникающих в результате реакций между консервантами и реагентами, используемыми для идентификации их, при хроматографии на тонких слоях кизельгеля — кизельгура приведена в табл. 20.

Пищевые красители. Наряду с различными консервирующими веществами в пищевые продукты с целью придания им товарного вида добавляют красители.

Таблица 19. Значения R_f некоторых консервантов на слоях полиамидов марок
Woelm и Wako B-10

I—метанол—вода (6:4); II—ацетон—вода (5:5); III—метанол—ацетон—вода (5:1:4);
IV—метанол—25%-ный аммиак—вода (2:1:7); V—ацетон—вода (3:7); VI—*n*-гексан—ацетон (8:2)

Консервант	Полиамид Woelm						Полиамид Wako B-10					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
Этил- <i>n</i> -оксibenзоат	0,32	0,41	0,38	0,64	0,16	0,11	0,53	0,63	0,61	0,76	0,34	0,15
<i>n</i> -Пропил- <i>n</i> -оксibenзоат	0,27	0,37	0,32	0,55	0,10	0,15	0,49	0,58	0,56	0,68	0,25	0,21
<i>n</i> -Бутил- <i>n</i> -оксibenзоат	0,22	0,32	0,29	0,44	0,07	0,19	0,44	0,54	0,52	0,58	0,18	0,28
Сорбиновая кислота	0,20	0,29	0,56	0,92	0,32	0,64	0,43	0,44	0,72	0,93	0,55	0,68
Дегидроацетовая кислота	0,18	0,25	0,73	0,79	0,54	0,45	0,45	0,40	0,83	0,86	0,73	0,59
Бензойная кислота	0,14	0,21	0,46	0,85	0,23	0,56	0,34	0,33	0,66	0,91	0,43	0,62
<i>n</i> -Оксibenзойная кислота	0,13	0,18	0,30	0,96	0,16	0,04	0,31	0,34	0,53	0,95	0,33	0,06
Салициловая кислота	0,05	0,05	0,18	0,56	0,14	0,25	0,12	0,16	0,25	0,75	0,29	0,40

Т а б л и ц а 20. Окраска пятен, образующихся при проявлении тонкослойных хроматограмм ряда консервантов различными реагентами

Реагент и условия применения	Салици- ловая кислота	Бензой- ная кис- лота	Сорбино- вая кис- лота	2-Оксиби- фенил	Дегидро- ацетовая кислота	п-Оксибен- зойная кислота	Метил-п- оксибен- зойная кислота	Этил-п- оксибен- зойная кислота	Пропил-п- оксибен- зойная кислота
Родамин В — H_2O_2 : 0,05%-ный раствор родамина В с после- дующей обработкой 3%-ным раствором H_2O_2	пурпур- ная	темно- пурпур- ная	розовая	пурпур- ная	пурпур- ная	синяя	розовая	розовая	розовая
Бромкрезоловый зеле- ный	оранже- во-желтая	желтая	желтая	—	желтая	желтая	—	—	—
Тиобарбитуровая кис- лота (насыщенный раствор)	светло- пурпур- ная	—	ярко- красная	—	—	—	—	—	—
Тимол (20%-ный спир- товый раствор), за- тем нагревание 10 мин при 90 °С, обработка 4 н. H_2SO_4 и нагрე- вание 10 мин при 120 °С	—	—	пурпур- ная	—	пурпур- ная	желтая	желтая	желтая	желтая
$H_2O_2 + FeCl_3$: а) об- работка 3%-ным ра- створом H_2O_2 , нагре- вание 5 мин при 90 °С, опрыскивание 2%-ным раствором $FeCl_3$	пурпур- ная	светло- пурпур- ная	светло- желтая	—	светло- желтая, желто-ко- ричневая	желто- коричне- вая	—	—	—

б) нагревание 5 мин при 90 °С, обработка 2%-ным раствором FeCl_3 , затем 3%-ным раствором H_2O_2

Бромфеноловый синий: обработка смесью растворов 120 мг бромфенолового синего в 100 мл воды и 60 мг метилового красного в 100 мл 96%-ного этанола с добавлением 100 мл фосфатного буфера (рН 7,17) с последующей обработкой диазотированной сульфаниловой кислотой

2,6-Дихлор-*n*-бензохинон-4-хлоримин, 1%-ный раствор
n-Нитроанилин диазотированный

Сульфат церия: к 4 мл 2,5%-ного раствора CeSO_4 добавляют 1 г трихлоруксусной кислоты, нагревают и осветляют прибавлением H_2SO_4

пур- пурная	темно- коричне- вая	—	фиоле- товая	корич- невая	зеленая	серая	серая	серая
желтая	светло- желтая	желтая	пурпур- ная	желтая	желтая	—	желтая	желтая
—	—	—	корич- невая	серая	желтая	светло- желтая	светло- желтая	светло- желтая
—	—	—	коричне- во-крас- ная	—	—	—	—	—
коричне- во-серая	—	коричне- вая	фиолето- вая	—	светло- желтая	светло- желтая	светло- желтая	светло- желтая

В связи с этим в настоящее время поставлены вопросы о возможной физиологической роли и значении добавляемых в продукты пищевых красителей, о возможности накопления их в организме, токсичности, канцерогенности и т. д.

Для правильной постановки и решения всех этих вопросов весьма важна разработка методов определения и анализа пищевых красителей, присутствующих обычно в продуктах в микроколичествах.

Методы определения пищевых красителей из продуктов сводятся, как правило, к их экстракции с последующим определением при помощи различных аналитических методов. В последнее время для этой цели все шире начинает применяться метод хроматографии в тонких слоях.

Так, [133]. тонкослойная хроматография была использована для разделения и анализа 20 водорастворимых красителей, употребляемых в пищевой промышленности. В качестве адсорбента применяли полиамид марки Wako. Растворителями служили системы, содержащие метанол (А), 28%-ный водный раствор аммиака и воду (А:1:16).

В этом случае может быть достигнуто вполне удовлетворительное разделение пищевых красителей, причем значение R_f существенно изменяется в зависимости от количества метанола в растворителе. С увеличением содержания метанола в смеси R_f , как правило, повышается [133].

Для тонкослойной хроматографии пищевых красителей в качестве адсорбента был использован также силикагель [134]. Ниже приведены значения R_f некоторых красителей на этом адсорбенте в различных системах растворителей (I — диметилсульфоксид — изопропанол (70:30) + 25 г CuSO_4 ; II — диметилсульфоксид — изопропанол — уксусная кислота (30:69:1):

Краситель	R_f	
	I	II
Амарант	0,1	0,2
Аурамин	0,8	0,8
Кислотный бордо	0,1	0,1
Бриллиант черный BN	0,3	0,2
Эритрозин	0,9	0,9
Эозин	0,9	0,9
Индигокармин	0,2	0,3

Красный 2G	0,2	0,3
Красный 6B	0,2	0,2
Красный 10B	0,2	0,3
Красный FB	0,2	0,2
Кислотный желтый	0,3	0,3
Кислотный красный	0,3	0,4
Нафтоловый желтый	0,2	0,3
Кислотный оранжевый	0,2	0,3
Оранжевый I	0,8	0,8
Оранжевый GGN	0,3	0,3
Кислотный алый	0,1	0,2
Родамин В	0,7	0,7
Хинолин желтый	0,3	0,3
Хризоидин	0,9	0,9
Хризоин S	0,8	0,5
Черный 7984	0,1	0,1

Многие из приведенных красителей имеют довольно близкие или даже идентичные значения R_f и, следовательно, с трудом поддаются разделению в данных условиях.

Антиоксиданты. В настоящее время антиоксиданты широко применяют для защиты различных материалов от окислительного действия кислорода воздуха и озона. В частности, антиоксиданты используют для защиты каучуков и резин, различных смазочных материалов, промышленных жиров и т. д. [135].

Как метод анализа антиоксидантов в последнее время начинают использовать и метод хроматографии в тонких слоях. Описан [136] метод количественного тонкослойного определения таких антиоксидантов, как неозон Д (фенил- β -нафтиламин), диафен ФП (N-изо-пропил-N'-фенил-*n*-фенилендиамин) и *n*-оксинеозон (*n*-оксифенил- β -нафтиламин).

Методы химического и спектрофотометрического определения этих соединений без их предварительного разделения трудно осуществимы. Поэтому было проведено разделение антиоксидантов в тонком слое силикагеля с последующим препаративным выделением пятен и количественным определением содержащихся в них антиоксидантов. В качестве растворителей использована смесь — бензол — ацетон — концентрированный раствор аммиака (100:5:0,1); адсорбент — силикагель марки КСК.

Значения R_f этих веществ, а также характер окраски пятен в ультрафиолете приведены ниже:

Неозон Д	0,84	Ярко-фиолетовая
Диафен ФП	0,73	Коричневая
<i>n</i> -Оксинеозон	0,55 (0,42)	Бледно-лиловая

Неозон Д и *n*-оксинеозон определяют по реакции с диазотированным *n*-нитроанилином, диафен ФП — при помощи смеси, приготовленной из 0,5 г ацетата меди, 4,66 г KCl, 10 мл 0,5 н. HCl и 250 мл дистиллированной воды с последующим доведением до объема 1 л этанолом.

В настоящее время антиоксиданты широко используются во многих отраслях промышленности [137].

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ*

Тонкослойная хроматография находит широкое применение в химии органических соединений серы, особенно при их синтезе, исследовании реакций и установлении строения. Это обусловлено тем, что при образовании и превращениях соединений, содержащих серу, происходит, как правило, существенное изменение их адсорбционной способности. Оно весьма значительно, в частности, при реакциях, протекающих с участием самого атома серы или групп, связанных с этим атомом взаимным влиянием.

С помощью тонкослойной хроматографии изучали адсорбционные свойства различных органических соединений серы: S, S'-диоксидов, дисульфидов, дитиокарбаматов, изотиомочевин, изотиоцианатов, ксантогенатов, сложных эфиров тиокислот, сульфидов, сульфоксидов, сульфонов, сульффиновых и S-сульффиновых кислот, сульфенамидов, сульфинамидов, тиазолов, тиамидов, тиокарбаматов, тиокетонов, тиолактонов, тиоловых кислот, тиолов, тиомочевин, тиосульфидов, тиосульфидов, тиофенов, тиоцианатов, тиурамов, тиофосфорных соединений.

Адсорбенты. При тонкослойной хроматографии органических соединений серы применяют различные модификации двух адсорбентов — силикагеля и окиси алюминия (как в виде незакрепленного, так и в виде закрепленного слоев).

Незакрепленный слой силикагеля марки АСК с размером частиц 0,063—0,16 мм² использовали [6] для разделения сульфидов, дисульфидов, сульфоксидов и тиофосфорных соединений. На силикагеле марки КСК,

* Глава написана Е. Н. Карауловой.

содержащем 6% воды, хроматографировали тиофосфорные соединения [138].

На закрепленном слое силикагеля разделяли [139] сульфиды, сульфоксиды и сульфоны, на слое силикагель — гипс разделяли сульфиды, тиолактоны, тиоловые кислоты и полярные производные тиазола [140], а также дисульфиды, тиолы [141] и тиофосфорные соединения [142—143].

Для тонкослойной хроматографии [144] различных классов сернистых соединений можно использовать силикагель, закрепленный крахмалом и содержащий поликомпонентную флуоресцентную добавку, а также окись алюминия различных степеней активности (незакрепленный слой). На незакрепленном слое окиси алюминия разделяли смеси сульфидов, сульфоксидов и сульфонов. На незакрепленном слое окиси алюминия третьей степени активности хроматографировали сульфиды и тиокетоны, а на окиси алюминия четвертой степени активности — сульфоксиды [148].

Реагенты для проявления хроматограмм органических соединений серы. Наиболее универсальным проявителем для органических соединений серы являются пары иода. Для этого пластинку помещают в сосуд (обычно в большой эксикатор), на дне которого находятся кристаллы иода и несколько миллилитров воды. После проявления избытку иода дают испариться на воздухе. Время проявления различно, оно зависит, в первую очередь, от степени окисления атома серы (и, разумеется, от количества детектируемого вещества). Так, например, тиолы и сульфиды проявляются через несколько минут, сульфоксиды — через 10—15 мин, сульфоны — значительно медленнее. Предел [148] чувствительности для сульфоксидов 2,5—10 мкг.

Проявление парами иода удобно тем, что его можно применять при работе с незакрепленным слоем сорбента. Однако оно непригодно для препаративных целей, так как очень трудно четко отграничить зону действия проявителя, что при этом варианте ТСХ необходимо.

Для различных классов сернистых соединений описано свыше двух десятков проявителей, применяемых путем опрыскивания хроматограммы, т. е. пригодных для работы на закрепленном слое сорбента (см. табл. 21).

Таблица 21. Реагенты для проявления органических соединений серы при ТСХ

I — S,S'-диоксиды; II — дисульфиды; III — дитиокарбаматы; IV — изотио-мочевины; V — изотиоцианаты; VI — ксантогенаты; VII — сложные эфиры тио-кислот; VIII — сульфиды; IX — сульфоксиды; X — сульфоны; XI — сульфино-вые кислоты; XII — S-сульфоновые кислоты; XIII — сульфенамиды; XIV — сульфинамиды; XV — тиазолы; XVI — тиоамиды; XVII — тиокарбаматы; XVIII — тиокетоны; XIX — тиолактоны; XX — тиоловые кислоты; XXI — тиолы; XXII — тиомочевины; XXIII — тиосульфиды; XXIV — тиосульфаты; XXV — тиофены; XXVI — тиоцианаты; XXVII — тиурамы; XXVIII — тиофосфорные соединения.

Проявитель	Обнаруживаемые соединения	Литература
Анилин—Br ₂	II, III, VIII, XIII, XIV, XXI—XXIV	149, 150
IO ₄ ⁻ —бензидин*	II, V, VI, VIII, XVI, XVIII, XXI, XXII	151
Иодоплатинат	I, II, VIII—XI, XXI	152, 153
1,3,6,8-Тетрамеркуртетраацетат флуоресцеина (ТМФ) . .	VII, XVI, XVIII, XXI, XXII, XXVII	154
Платинохлористоводородная кислота	II, VIII—X, XXI, XXII	155, 156
N-Бромсукцинимид—флуоресцеин	III, VI, XIII, XV, XXVII	157
I ₂ — NaN ₃	II, VIII, XXI, XXII, XXVIII**	142, 143, 152, 153
PdCl ₂ — Calcein (флуоресцентная добавка)***	VIII, XVI, XX—XXII	158
KI + HCl	XI—XI, XXIV	159
Ацетальдегид — нитропруссид; HCl	VIII—X	160
HClO ₄ + H ₅ IO ₆	XXI, XXII, XXVIII	161
KMnO ₄ + конц. H ₂ SO ₄	VIII—X	162
H ₂ Se	II, XV	163
5,5'-Дитиобис(2-нитробензойная) кислота	XIX, XXI	164
2%-ный раствор нитропруссиды натрия в 75%-ном спирте . .	XIX****, XXI	140
Бромтимоловый синий	VIII, XXI	165
0,1 н. KMnO ₄ в H ₃ PO ₄	XVIII	147
0,4%-ный раствор изатина в конц. H ₂ SO ₄ с последующим облучением УФ-светом . . .	XXV	166

* Бензидин ядовит!

** Нижний предел чувствительности 1—5 мкг.

*** Предел чувствительности 10—100 нг.

**** Предел чувствительности для тиобутиролактона 0,1 мкмоль.

Для тонкослойной хроматографии сернистых соединений можно использовать силикагель, содержащий смесь трех флуоресцентных добавок, поглощающих УФ-излучение в различных областях спектра; проявляют хроматограмму, освещая ее подходящим источником УФ-света [144].

Сернистые соединения, дающие положительную пробу при методе «смешанных флуоресцентных добавок», должны содержать группы $C=S$ (тиомочевины, изотиомочевины, тиурамы, тиолактоны, сложные эфиры тиокислот, ксантогенаты, дитиокарбаматы) или связь $S-S$ (дисульфиды, S -сульфоновые кислоты).

Положительную пробу дают также тиофосфорные соединения (со связью $P=S$). Этим методом не проявляются тиолы, сульфиды, сульфоновые и сульфиновые кислоты и их эфиры, моноэфиры серной кислоты. Все же диапазон обнаруживаемых соединений весьма широк.

При работе методом «смешанных флуоресцентных добавок» используют пластинки, где слой адсорбента толщиной 250 мкм состоит [167] из 89% силикагеля, 1% крахмала и 7,9% смеси флуоресцентных добавок [$Sr_2P_2O_7$ с примесью солей олова ($\lambda_{\text{макс}}=260$ нм, голубая флуоресценция), Zn_2SiO_4 с примесью солей марганца ($\lambda_{\text{макс}}=280$ нм, зеленая флуоресценция) и YVO_4 с примесью солей европия ($\lambda_{\text{макс}}=330$ нм, красная флуоресценция)], взятых в соотношении 20:5:1. [Такие пластинки под названием «Wakogel FM» выпускает фирма Wako (Осака, Япония).]

Чувствительность этого метода проявления высока 10^{-8} — 10^{-11} моль. Цвет пятна зависит от длины волны поглощаемого УФ-света, так, например, пятна дисульфидов, изотиомочевины, изотиоцианатов, S -сульфоновых кислот, тиолактонов, тиоцианатов окрашены в красный цвет, пятна дитиокарбаматов и тиофосфорных соединений — в красно-фиолетовый, ксантогенатов — в синезеленый.

Системы элюентов. При тонкослойной хроматографии органических соединений серы применяют различные системы элюентов [оптимальный выбор их диктуется поставленной задачей (см. табл. 22, 23)].

Качественный анализ органических соединений, содержащих серу. Метод тонкослойной хроматографии

Т а б л и ц а 22. Системы элюентов при ТСХ органических соединений серы на силикагеле

Соединения	Элюенты	Литература
Дисульфиды	Диизопропиловый эфир* — изоктан (1,96 : 98,04)	6
	Фенол — вода (4:1); бутанол — пиридин — вода (1:1:1)	141
ароматические полярные	Бензол	167
	Бутанол — уксусная кислота — вода (5:2:3)	167
разделение гомологов	Жидкий парафин (5%)** — метанол	167
разделение с тиоловыми кислотами	Бутанол — уксусная кислота — вода (12:3:5)	141
Ксантогенаты	Пропанол — 25%-ный аммиак	144
	Бензол — диоксан — 28%-ный аммиак — насыщенный раствор тетрабората натрия; жидкий парафин (5%)** — 5%-ный аммиак; жидкий парафин (5%)** — 10%-ный раствор ацетата натрия	167
Сложные эфиры тиокислот	Бутанол — уксусная кислота — вода (5:2:3)	167
Сульфиды	Диизопропиловый эфир* — изоктан (1,16 : 98,84)	6
	Ацетон — бензол (2,5:97,5); толуол — этилацетат (1:1)	139
	Диизопропиловый эфир* — изоктан (1:4; 3:2)	140
	Изооктан	168
	Гексан — ацетон (2:1)	158
разделение с сульфоксидами и сульфонами	Хлороформ	169
Кетосульфиды	Диизопропиловый эфир*	158
Сульфоксиды	Ацетон — бензол (2,5:97,5)	139
разделение с сульфидами и сульфонами	Хлороформ	169
Сульфоны	Толуол — этилацетат (1:1)	139
	Хлороформ	169
	Ацетон — бензол (2,5:97,5)	139
разделение с сульфидами и сульфоксидами	Толуол — этилацетат (1:1)	139
S-Сульфоновые кислоты	Бутанол — уксусная кислота — вода (5:2:3); пропанол — 28%-ный аммиак (7:3)	167
Тиоамиды	Гексан-ацетон (2:1)	158

Соединения	Элюенты	Литература
Тиолактоны	Диизопропиловый эфир* — изоктан	140
	Бутанол — уксусная кислота — вода (5:2:3)	167
Тиоловые кислоты	Диизопропиловый эфир* — изоктан	140
	Гексан — ацетон (2:1)	158
	Фенол — вода; бутанол — уксусная кислота — вода (12:3:5); бутанол — пиридин — вода (1:1:1)	141
Тиолы	Гексан — ацетон (2:1)	158
Тиомочевины	Жидкие парафины (5%)* — хлороформ; жидкие парафины (5%)* — вода	167
Тиофены	Бензол — хлороформ (9:1)	166
полярные	Диизопропиловый эфир* — изоктан (1,16:98,84%)	6
Тиурамы	Бензол; этилацетат — гексан (1:6)	167
Тиофосфорные соединения	Диизопропиловый эфир* — изоктан (1,18:98:82)	6
	Гексан — ацетон (4:1)	142
	Метанол — хлористый метилен — 10%-ный аммиак (20:80:3; 7:12:1)	143

* Диизопропиловый эфир чрезвычайно легко окисляется при хранении с образованием взрывчатых перекисей (через 2—3 недели содержание перекисей может достичь 30%).

** Неподвижная фаза.

был использован для контроля скорости и глубины превращений при таких реакциях, как окисление сульфидов, перегруппировка арилалкенилсульфидов, реакция Пуммерера, дегидратация тиацикланолов, присоединение к кратной связи ненасыщенных сульфидов и др. [6]; осуществлено разделение стереоизомеров тиацикланов и тиациклансульфоксидов [6].

Необходимо отметить, что при наиболее часто применяющейся восходящей адсорбционной хроматографии на незакрепленном слое сорбента абсолютные значения R_f не обладают высокой воспроизводимостью, однако при разделении смесей сохраняется постоянная разность R_f , что при работе с подходящим свидетелем по-

Таблица 23. Система элюентов при ТСХ органических соединений серы на окиси алюминия

Соединения	Элюенты	Литература
Сульфиды	Диизопропиловый эфир* (с постепенным увеличением его доли в смеси) — изооктан	6, 168
	Изооктан	6
разделение гомологов	Цетан** — хлороформ — метанол (1:3)	165
разделение с сульфонидами	Гексан — эфир	145
Кетосульфиды	Диизопропиловый эфир* — изооктан (9:1)	6
Окисульфиды	Изооктан — эфир (3:2)	6
Сульфоксиды	Хлороформ; ацетон — четыреххлористый углерод	148
Сульфоны	Гексан — эфир	145
разделение с сульфидами	Петролейный эфир — эфир (от 1:1 до 1:4)	170
Тиокетоны	Эфир	145
Тиолы	Изооктан	6
алифатические	Цетан** — 96%-ная уксусная кислота — ацетонитрил (1:3)	165
ароматические	Цетан** — метанол — хлороформ — вода (5:5:1)	165
Тиофены, неполярные	Петролейный эфир	166
Тиофосфорные соединения	Гептан — ацетон (10:1)	161

* Диизопропиловый эфир чрезвычайно легко окисляется при хранении с образованием взрывчатых перекисей (через 2—3 недели содержание перекисей может достигнуть 30%).

** Неподвижная фаза.

звояет получать вполне удовлетворительные результаты.

Контроль окисления сульфидов в сульфоксиды. Значения R_f убывают в ряду:

Сульфиды > Сульфоны > Сульфоксиды

При хроматографировании смеси сульфоксида и соответствующего сульфида на окиси алюминия II степени активности в системе растворителей ацетон — четыреххлористый углерод или хлороформ сульфид четко отделяется от сульфоксида и движется с линией фронта; при использовании в качестве растворителя изооктана сульфоксид остается на старте. Метод был использован, например, для контроля полноты окисления

цис,цис-2-метил-1-тридекалина перекисью водорода в уксусной кислоте [171].

Разделение предельных и непредельных сульфидов. Полнота превращения сульфоксидов в ненасыщенные сульфиды нагреванием с уксусным ангидридом (реакция Пуммерера) также контролируется методом ТСХ, в качестве элюента используют ацетон — четыреххлористый углерод или хлороформ.

При этой реакции наряду с образованием непредельного сульфида происходит частичное восстановление сульфоксида в соответствующий насыщенный сульфид. Так, например, диизопентилсульфоксид превращается [6] в смесь *цис*- и *транс*-2,8-диметил-5-тианоненов-3 и диизопентилсульфида, которую не удалось разделить методом газо-жидкостной хроматографии. Методом тонкослойной хроматографии диизопентилсульфид ($R_f=0,3$) отделен [6] от смеси 2,8-диметил-5-тианоненов-3 ($R_f=0,5$).

Количественный анализ органических соединений серы. Разработан метод количественного определения дисульфидов, ксантогенатов, тиомочевин и тиурамов на силикагеле, содержащем смешанные флуоресцентные добавки [144]. Были использованы следующие системы элюентов: для дисульфидов — бензол, для ксантогенатов — неподвижная фаза — жидкие парафины (5%), подвижная фаза — 5%-ный раствор аммиака или 10%-ный раствор ацетата натрия; для тиомочевин неподвижная фаза та же, что для ксантогенатов, подвижная — хлороформ, для тиурамов — бензол или смесь этилацетат — гексан (1:6).

После проявления в УФ-свете пятна копируют на толстую бумагу, вырезают и взвешивают. Площадь пятна рассчитывают, сравнивая эту массу с массой бумаги площадью 100 мм².

Количественное определение изученных классов соединений возможно в пределах следующих концентраций (в моль):

Диалкилдисульфиды	$(3,3-10) \cdot 10^{-8}$
Ароматические дисульфиды	$(2-7,5) \cdot 10^{-10}$
Ксантогенаты	$(1,65-5) \cdot 10^{-9}$
Тиомочевины	$(2-10) \cdot 10^{-9}$
Тиурамы	$(4-20) \cdot 10^{-9}$

Препаративная тонкослойная хроматография органических соединений серы. Методика препаративной тонкослойной хроматографии (ПТСХ) применительно к органическим соединениям серы разработана авторами работы [171]. Были разделены и очищены от примесей насыщенные и ненасыщенные сульфиды, тиабиккланолы, кетосульфиды и сульфоксиды [6]. Удалось осуществить полное или частичное разделение смесей стереоизомерных тиабиккланов, тиабиккланолов и тиабикклансульфоксидов [6]. Сочетая методы ТСХ, ПТСХ и газо-жидкостной хроматографии, можно количественно оценить состав смеси стереоизомерных тиабиккланов, образующихся при нестереоспецифическом синтезе [6].

Для проявления сернистых соединений при ПТСХ удобен универсальный проявитель — раствор 0,5 г перманганата калия в 25 мл концентрированной серной кислоты. Проявление ведут, смачивая оба края вдоль длинных сторон пластины проявителем (его наносят с помощью пипетки с тонко оттянутым кончиком), при этом у краев зон адсорбированных сернистых соединений окраска адсорбента становится светло-желтой или бурой. После проявления краев отграничивают зоны разделения веществ поперек пластины и собирают их, всасывая адсорбент с помощью фильтра с пористой пластинкой № 2; поглощенные вещества десорбируют обычным образом.

Контроль полноты десорбции и хода разделения чаще всего осуществляют с помощью аналитической ТСХ. Если при однократной ПТСХ получают промежуточные фракции, то их хроматографируют многократно до тех пор, пока не будет достигнуто четкое разделение.

Разделение стереоизомеров 2-метил-1-тиадекалина. Смесь четырех стереоизомеров 2-метил-1-тиадекалина (*цис-транс*-, *транс-транс*-, *цис-цис*- и *транс-цис*-) хроматографировали [6] на нейтральной окиси алюминия II степени активности, растворитель — изооктан. Получены две фракции — *цис-цис*-2-метил-1-тиадекалин (56%) и смесь остальных трех изомеров (44%). Данные ПТСХ положены в основу колоночной хроматографии этой смеси стереоизомеров [169].

Разделение стереоизомеров 2-метил-1-тиадекалин-1-оксида, различающихся пространственным расположе-

нием сульфоксидной группы. При окислении *цис-транс*-2-метил-1-тиадекалина образуется смесь двух стереоизомерных сульфоксидов. Эта смесь была разделена на нейтральной окиси алюминия III степени активности, растворитель ацетон — четыреххлористый углерод (1:4). Выделены *транс-цис-транс*-изомер ($n_D^{20} = 1,4721$, $R_f = 0,39$; 70,8%) и *цис-цис-транс*-изомер [$R_f = 0,57$; т. пл. 74,5—76 °C (из изооктана); 29,8%].

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

В качестве сорбентов для тонкослойной хроматографии азотсодержащих соединений (амины, аминокислоты и их производные, белки) используют производные целлюлозы, обладающие ионообменными свойствами, сефадексы, гидроксилпатит, силикагель, порошки целлюлозы.

К анионитам на основе целлюлозы относятся диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза), триэтиламиноэтилцеллюлоза (ТЭАЭ-целлюлоза); эктеола-целлюлоза, аминоэтилцеллюлоза (АЭ-целлюлоза). К катионитам на основе целлюлозы относятся карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза), сульфэтилцеллюлоза (СЭ-целлюлоза), фосфорилированная целлюлоза. Характеристика некоторых используемых в тонкослойной хроматографии типов ионитов на основе целлюлозы приведена ниже:

Ионит	Полная обменная емкость мг-экв/г	Ионит	Полная обменная емкость мг-экв/г
Диэтиламиноэтилцеллюлоза	0,4—1,0	Эктеола-целлюлоза	0,3—0,5
Аминоэтилцеллюлоза	0,1—0,7	Карбоксиметилцеллюлоза	0,3—0,7
		Сульфэтилцеллюлоза	0,5

Для хроматографии в тонких слоях используют сефадексы различных марок. С их помощью осуществляют фракционирование веществ по молекулярной массе:

Сефадекс (сверхтонкий)	Диапазон фракционирования пептидов по молекулярной массе
G-25	1 000—5 000
G-50	1 500—30 000
G-75	3 000—70 000
G-100	4 000—150 000
G-150	5 000—400 000
G-200	5 000—800 000

При нанесении слоя сефадекса необходимо иметь определенную консистенцию геля сефадекса, которую получают после набухания сефадекса в буферном растворе. Объемы буферного раствора, прибавляемого к 10 г сухого сефадекса, приведены ниже:

Сефадекс (сверхтонкий)	Объем буферного раствора, мм	Сефадекс (сверхтонкий)	Объем буферного раствора, мм
G-25	50	G-100	190
G-50	110	G-150	225
G-75	150	G-200	250

При работе с сефадексами применяют как нисходящую, так и восходящую хроматографию. Для обнаружения результатов хроматографии разделяемые вещества переносят на лист хроматографической бумаги путем контакта бумаги с поверхностью геля в течение обычно 1 мин. Затем бумагу сушат 30 мин при 80 °С и обрабатывают соответствующими реагентами, например в случае белковых соединений 0,1%-ным раствором бромфенолового синего в смеси метанола и уксусной кислоты (9:1). Затем бумагу промывают водой, подкисленной уксусной кислотой.

Гидроксилapatит — неорганический адсорбент, состава $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$. Он обладает хорошей стабильностью в щелочной среде, широко применяется для хроматографии белков. Оптимальное отношение Са/Р в гидроксилapatите составляет 1,67. Это отношение колеблется от 1,30 до 2,00 в зависимости от способа получения.

Гидроксилapatит обычно получают взаимодействием растворов CaCl_2 и Na_2HPO_4 или K_2HPO_4 [172—175] и кипячением образовавшегося CaHPO_4 с NaOH . Предложен также метод получения гранулированного гидроксилapatита [176].

Амины. Для разделения смеси аминов (триптамина, тирамина, серотонина, гистамина) и аминокислот (триптофана, тирозина, гистидина) использовали [177] целлюлозу марки FND; элюирующий раствор — изопропиловый спирт — 25%-ный раствор аммиака — вода (80:10:10).

Смесь аминов разделяли на пластинках марки Silvol [178] в системе растворителей пиридин — трет-бу-

тиловый спирт — 26—27%-ный раствор аммиака (1:1:1):

Амин	R_f	Амин	R_f
Этилендиамин	0,19	1,6-Диамино-3-азагексан (этиленпропилен- амин)	0,27
1,5-Диамино-3-азапентан (диэтилентриамин) . . .	0,12	1,11-Диамино-4,8-диаза- ундекан (трипропилен- тетраамин)	0,10
1,8-Диамино-3,6-диазаок- тан (триэтилентетраамин)	0,07	Триэтаноламин	0,74
Пропилендиамин	0,33	Диэтаноламин	0,60
		Моноэтаноламин	0,46

Для хроматографии ряда аминов [179] в тонких слоях был использован также силикагель, импрегниро-
ванный оксалатом кальция (2 ч. силикагеля, 1 ч. окса-
лата кальция и 2 ч. дистиллированной воды). Пластин-
ки с сорбентом перед хроматографией активировали
нагреванием до 60°C в течение 24 ч. Значения R_f ами-
нов в двух системах растворителей приведены ниже:

Амин	Значение R_f	
	Бензол—этил- ацетат (90:10)	Четыреххло- ристый углерод— этилацетат (90:10)
Анилин	0,45	0,43
Монометиланилин	0,72	0,78
Диметиланилин	0,88	0,92
о-Толуидин	0,51	0,52
м-Толуидин	0,42	0,46
п-Толуидин	0,36	0,38
о-Анизидин	0,54	0,56
м-Анизидин	0,40	0,33
п-Анизидин	0,20	0,18
о-Фенетидин	0,64	0,64
п-Фенетидин	0,23	0,22
о-Оксианилин	0,14	0,12
м-Оксианилин	0,09	0,08
п-Оксианилин	0,05	0,02
о-Нитроанилин	0,56	0,49
м-Нитроанилин	0,44	0,26
п-Нитроанилин	0,32	0,15
о-Фенилендиамин	0,11	0,05
м-Фенилендиамин	0,08	0,03
п-Фенилендиамин	0,02	0,00

Для разделения нитрозаминов в качестве сорбента
использовали силикагель [180]. Значения R_f нитроз-
аминов приведены ниже:

Соединение	Растворитель	R_f
Диметилнитрозамин	<i>n</i> -Гексан — эфир — дихлорметан (4:3:2)	0,25
Этилметилнитрозамин	То же	0,40
Диэтилнитрозамин	»	0,50
<i>N</i> -Нитрозопиперидин	<i>n</i> -Гексан — эфир — дихлор — метан (5:7:10)	0,60
Диизопропилнитрозамин	То же (4:3:2)	0,65
Дифенилнитрозамин	То же (10:3:2)	0,80

Аминокислоты и их производные. Для разделения аминокислот в качестве сорбента использовали целлюлозу MN-300 с толщиной слоя 0,5 мм [181]. Хроматография восходящая, двумерная, в одном направлении использовали изопропиловый спирт — метилэтилкетон — 0,1 н. HCl (60:15:25), в перпендикулярном направлении — метиловый спирт — вода — пиридин (20:5:1). Для обнаружения пятен аминокислот на тонкослойных хроматограммах применяли флуоресцирующие реагенты (флуорескамин), что позволяет увеличить чувствительность метода [182, 183]. Хроматограмму опрыскивали 10%-ным раствором триэтиламина в CH_2Cl_2 и после сушки на воздухе в течение нескольких секунд — 0,05%-ным раствором флуорескамина в ацетоне с повторной обработкой хроматограммы 10%-ным раствором триэтиламина.

Эффективное разделение аминокислот в тонких слоях может быть достигнуто путем сочетания хроматографии и электрофореза [184]. Сорбент — целлюлоза MN-300 с толщиной слоя 0,25 мм, размер пластинок 20×40 см. В одном направлении по короткой стороне пластинки проводили нисходящую хроматографию в системе растворителей пиридин — этанол — вода (2:2:1) в течение 7,5 ч (за ходом хроматографии следили по передвижению пятна красителя — бриллиантового черного). После удаления растворителя слой сорбента пропитывали 0,025 М раствором буры и проводили электрофорез в перпендикулярном направлении при градиенте напряжения 10 В/см в течение 3 ч.

Пятна аминокислот обнаруживали при помощи

0,1%-ного раствора 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты в смеси ацетон — этанол — вода (2:2:1).

Широкое применение хроматография в тонком слое получила для разделения производных аминокислот — фенилтиогидантоиновых и дансильных (5-диметиламинонафтилсульфонильных) производных, широко используемых для анализа аминокислот в химии пептидов и белков.

Разделение фенилтиогидантоинов [185] проводили сначала в одном направлении в системе растворителей толуол — пентан — ацетон (60:30:16), затем после сушки на воздухе — в другом направлении в 25%-ном водном ацетоне.

Фенилтиогидантоины аминокислот наблюдали в виде темных пятен на люминесцирующем фоне. Продолжительность разделения 30 мин, чувствительность определения 0,05—0,20 нг. Для идентификации применяли стандартные растворы фенилтиогидантоинов аминокислот.

Для тонкослойной хроматографии фенилтиогидантоиновых производных аминокислот в качестве сорбента использовали также силикагель, а в качестве растворителей системы: ксилол — метанол (80:10) и гептан — дихлорэтан — пропионовая кислота (45:25:30) [186]. Проявление велось при помощи 1,7%-ного раствора нингидрина в смеси метанол — коллидин — уксусная кислота (15:2:5). Этим методом можно разделять фенилтиогидантоины, имеющие близкие значения R_f .

Фенилтиогидантоиновые производные аминокислот могут быть разделены на тонких слоях силикагеля в системах растворителей: сначала — *n*-гептан — пропионовая кислота — дихлорэтан (58:17:25), затем — *n*-гептан — *n*-бутанол — 75%-ная муравьиная кислота (50:30:9).

При введении в силикагель флуоресцирующего индикатора фенилтиогидантоины обнаруживаются в виде голубоватых пятен на флуоресцирующем фоне. После нагревания при 100°C в течение 15 мин пятна приобретают специфическую окраску. Чувствительность метода достигает 0,005 ммоль.

Для микротонкослойной хроматографии фенилтиогидантоиновых производных аминокислот использовали [187] кизельгель 60F₂₅₄ [188]. Пластинки размером

6,3×6,3 см предварительно погружали в 1%-ный раствор крахмала и сушили при 80°C в течение 30 мин. Хроматография восходящая; растворители хлороформ — метанол (9:1) и после сушки повторное элюирование в хлороформе на высоту 5 см. Пятна фенилтиогидантоиновых производных обнаруживали при помощи крахмал-иодного индикатора.

Используя различные системы растворителей, на слоях полиамида марки 6UV₂₅₄ удается добиться разделения одномерной хроматографией почти всех фенилтиогидантоиновых производных [189] (табл. 24).

Таблица 24. Значение R_f фенилтиогидантоиновых производных аминокислот

I — дихлорэтан — уксусная кислота (45:8); II — хлороформ — 95%-ный этанол — уксусная кислота (20:10:3); III — толуол—*n*-гептан — уксусная кислота (12:6:5); IV — уксусная кислота — вода (7:13); V — уксусная кислота — вода (1:3)

Фенилтиогидантоины аминокислот	R_f				
	I	II	III	IV	V
Аланин	0,57	0,76	0,31	0,72	0,64
Аргинин	0,20	0,80	0,05	0,90	0,87
Аспарагин	0,63	0,49	0,01	0,70	0,59
Валин	0,77	0,88	0,56	0,63	0,51
Гистидин	0,18	0,75	0,04	0,93	0,92
Гликокол	0,37	0,65	0,16	0,75	0,68
Глутаминовая кислота	0,12	0,68	0,05	0,64	0,53
Изолейцин	0,75	0,85	0,49	0,56	0,41
Лейцин	0,86	0,90	0,65	0,56	0,39
Лизин	0,49	0,88	0,09	0,83	0,75
Метионин	0,65	0,84	0,32	0,61	0,47
Серин	0,45	0,87	0,27	0,58	0,55
Тирозин	0,81	0,60	0,01	0,45	0,28
Треонин	0,40	0,76	0,25	0,57	0,44
Триптофан	0,34	0,67	0,08	0,27	0,16
Фенилаланин	0,83	0,84	0,51	0,45	0,29
Цистеин	0,76	0,50	0,39	0,57	0,36

При анализе концевых аминокислот часто применяют дансилпроизводные аминокислот. Их получают обработкой растворов аминокислот дансилхлоридом в ацетоне при pH=9,5 в 0,05 М боратном буфере.

Хорошее разделение дансилпроизводных аминокислот осуществлено [190] на пластинках с силикагелем. Хроматография одномерная с последовательным исполь-

зованием трех систем растворителей: толуол — пиридин — уксусная кислота (70:30:8); хлороформ — трет-бутанол — уксусная кислота (60:40:15); толуол — 2-хлорэтанол — 25%-ный аммиак — вода (30:50:2:2).

Тонкослойная хроматография фенилтиогидантоиновых производных использована для анализа пептидов [191].

Необходимо отметить, что анализ производных аминокислот в тонком слое приблизительно в 10 раз чувствительнее, чем хроматография их на бумаге. Используя оптимальное зернение силикагеля в пределах 2—5 мк и ограничивая пробег растворителя до 4—5 см, можно резко (в 5—10 раз) улучшить чувствительность определения фенилтиогидантоиновых производных аминокислот [192].

Белковые соединения. Сравнительно с тонкослойной хроматографией аминокислот хроматография белковых соединений в тонком слое развита пока недостаточно.

Наиболее часто тонкослойную хроматографию используют для определения молекулярной массы белков и белковых соединений. Показано [193, 194], что при помощи тонкослойной гель-фильтрации можно проводить приблизительную оценку молекулярной массы белков, используя сефадексы G-75 и G-200. Объем элюирующего буферного раствора находится в линейной зависимости от логарифма молекулярной массы белка [195].

Для получения достоверных результатов рекомендуется проводить гель-хроматографию на сефадексах G-75 и G-100 в присутствии денатурирующих агентов, например, в 6 н. растворе гидрохлорида гуанидина [196, 197].

На сефадексах проводилось также разделение различных белковых смесей. Для белков с относительно небольшими молекулярными массами использовали сефадексы G-50 и G-75; для белков с молекулярными массами 100 000 и выше применяют слабосшитые сефадексы G-100 и G-200. На пластинках с сефадексом G-75 удалось добиться хорошего разделения смеси альбуминов, а также β - и α -лактоглобулинов с молекулярными массами 60 000, 35 000 и 15 000 соответственно [198].

Интересно применение тонкослойной гель-хроматографии белков в сочетании с техникой изоэлектрофокусирования [199].

Сравнительно немного работ по разделению белковых соединений на тонких слоях целлюлозы. Так, проведено [200] разделение смеси альбумина и γ -глобулина сыворотки крови человека на пластинках с целлюлозой.

Предложен [201] метод оценки качества пищевых продуктов путем анализа пептидных карт, полученных на тонких слоях целлюлозы. Пептидные карты получают хроматографией проб на пластинке в одном направлении в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода и электрофореза в пиридин-ацетатном буфере при $pH=6,5$ в перпендикулярном направлении.

Для разделения и анализа белковых смесей и оценки однородности индивидуальных белков использовали также гидроксилапатит [202—205]. Хроматография восходящая, слой сорбента, как правило, незакрепленный, размеры пластинок $7,5 \times 15$ см, толщина слоя 0,5 мм. Элюирующие растворы — фосфатные буферы различных концентраций (0,07; 0,10; 0,15 и 0,40 М), $pH=6,8$. Для обнаружения пятен пластинки опрыскивали 1%-ным раствором нингидрина с последующим нагреванием до $80^\circ C$ [203].

Значения R_f некоторых белков при тонкослойной хроматографии на гидроксилапатите в фосфатном буфере ($pH=6,8$) приведены ниже:

Соединение	R_f	Концентрация фосфатного буфера, моль
Химотрипсин	0,85	0,10
Химотрипсиноген	0,64	0,15
γ -Глобулин	0,60	0,10
Трипсин	0,43	0,10
Рибонуклеаза	0,39	0,15
Альдолаза	0,35	0,15
Альбумин	0,33	0,10

Литература

1. Измайлов Н. А., Шрайбер М. С. «Фармация», 1938, № 3, с. 1.
2. Хроматография в тонких слоях. Пер. с нем. Под ред. Э. Шталя. М., «Мир», 1965. 508 с.
3. Kirchner J. G. Chem. Technol., 1974, Bd. 4, S. 79—83.
4. Кибардин С. А., Лазуркина В. Б. «Успехи химии», 1969, № 12, т. 38, с. 2279—2292.
5. Новицкая Г. В. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии фосфолипидов. М., «Наука», 1972. 63 с.
6. Караулова Е. Н. В сб.: Методы анализа органических соединений нефти, их смесей и производных. Под ред. Г. Ф. Гальперна. М., «Наука», 1969. с. 76—94.
7. Miller J. M., Kirchner J. G. Analyt. Chem., 1951, v. 23, p. 428—432.
8. Kirchner J. G., J. Chromat., 1971, v. 63, p. 3—6.
9. Liteanu C., Goran S. Gradient Liquid Chromatography. Chichester, Ellis Horwood, 1974. 338 p.
10. Loeffel H. "Textilveredlung", 1973, Bd. 8, S. 349—354.
11. Bobbit J. McCue. Thin. Layer Chromatography. London, Chapman a. Hall, 1963, 208 p.
12. Truter E. V. Thinfilm Chromatography. London, 1963, 205 p.
13. Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография. М., «Наука», 1964, 175 с.
14. Randerath K. Dunnschicht Chromatographie. 2Ed. Weinheim/Bergstr. Verl. Chemie. N. Y. — London, Acad. Press., 1966, 243 S.
15. Stahl E. Thin Layer Chromatography. N. Y. — London, Acad. Press., 1969. 553 p.
16. Kirchner J. G. Thin Layer Chromatography. N. Y. Interscience Publ., 1967. 788 p.
17. Janchen D. Thin Layer Chromatography. Muttzen, Camag, 1967. 380 p.
18. Progress in Thin Layer Chromatography. Eds. A. Niederwieser, G. Pataki. V. I. London, Ann. Arbor., 1970. 224 p.
19. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. Под ред. Э. Д. Шелларда. Пер. с англ. Под ред. А. Н. Ермакова. М., «Мир», 1971. 192 с.
20. Touchstone J. Quantitative Thin Layer Chromatography. N. Y., Willey, 1973. 330 p.
21. Вольнец М. П. Тонкослойная хроматография в неорганическом анализе. М., «Наука», 1974. 150 с.

22. Бельский Б. Г., Нестеров В. В., Ганкина Э. С. ЖФХ, 1968, т. 42, с. 2876—2881.
23. Бельский Б. Г., Нестеров В. В., Смирнов М. М. ЖФХ, 1968, т. 42, с. 1484—1489.
24. Бельский Б. Г. и др. В сб.: «Теория ионного обмена и хроматографии». М., «Наука», 1968, с. 140.
25. Waksmundzki A., Rozylo J. K. "Chemia Analityczna", 1972, v. 17, p. 1079—1084.
26. Waksmundzki A., Rozylo J. K. J. Chromat., 1973, v. 78, p. 55—59.
27. Hurtubise R. J., Lott P. J., Dias J. R. J. Chromat. Sci., 1973, v. 11, p. 476—491.
28. Вдовенко В. М. и др. «Изотопы в СССР». 1973, № 30, с. 20—25.
29. Виноградова Р. Г. и др. «Заводская лаборатория», 1975, т. 41, № 5, с. 556—559.
30. Лурье А. А. Сорбенты и хроматографические носители. М., «Химия», 1972. 320 с.
31. Runge F., Zimmerman W. J. pract. Chem., 1955, Bd. 1, S. 5—6.
32. Неймарк И. Е., Чуйко А. А. «Высокомолекулярные соединения», 1961, № 5, с. 711—715.
33. Тюкавкина Н. А., Литвиненко В. И., Шостаковский М. Ф. Хроматография на полиамидных сорбентах в органической химии. Новосибирск, «Наука», 1973. 176 с.
34. Wang K.-T., Huang J. M.-K., Wang J. S. Y. J. Chromat., 1966, v. 22, p. 362—368.
35. Eijnden D., von Den H. Anal. Biochem., 1974, v. 57, p. 321—322.
36. De Deyne V. J. R., Velters A. F. J. Chromat., 1967, v. 31, p. 261—264.
37. Stickland R. G. Anal. Biochem., 1965, v. 10, p. 108—119.
38. Niederwieser A., Honegger C. G. Helv. Chim. Acta, 1965, v. 48, p. 893—898.
39. Warren B. J. Chromat., 1965, v. 20, p. 603—605.
40. Rozumek K. E. J. Chromat., 1969, v. 40, p. 97—102.
41. Stahl E., Dumont E. "Talanta", 1969, v. 16, p. 657—667.
42. Sandroni S., Schlitt H. J. Chromat., 1970, v. 52, p. 169—171.
43. De Zeenw R. A., Wijsbeek J. Anal. Chem., 1970, v. 42, p. 90—94.
44. De Zeenw R. A. Anal. Chem., 1968, v. 40, p. 2134—2139.
45. Niederwieser A., Brenner M. "Experientia", 1965, v. 21, p. 50—55.
46. De Zeenw R. A. Anal. Chem., 1968, v. 40, p. 915—918.
47. Blume P. Anal. Biochem., 1966, v. 16, p. 372—375.
48. Horobin R. W. J. Chromat., 1968, v. 37, p. 354—356.
49. Jordan D. M. J. Chromat., 1971, v. 57, p. 427—432.
50. Jordan D. M. J. Chromat., 1971, v. 63, p. 442—445.
51. James C. N., Ma T. S. J. Chromat., 1966, v. 21, p. 151—154.
52. Smith J. e. a. J. Chromat., 1973, v. 82, p. 159—163.
53. Geiss F., Schlitt H. J. Chromat., 1968, v. 33, p. 208—216.
54. Janchen D. J. Chromat., 1968, v. 33, p. 195—198.
55. Dallas M. S. J. J. Chromat., 1968, v. 33, p. 193—194.
56. Нестеров В. В., Бельский Б. Г., Эрастов Д. П. «Биохимия», 1968, т. 33, с. 537—542.
57. Samuels S., Fisher C. J. Chromat., 1972, v. 71, p. 297—306.
58. Goodall R. R. J. Chromat., 1972, v. 73, p. 161—172.

59. *Touchstone J. C., Levin S. S., Murawee T.* Anal. Chem., 1971, v. 43, p. 858—862.
60. *York H. J.* Chromat., 1970, v. 48, p. 372—374.
61. *Schlitt H., Geiss F. J.* Chromat., 1972, v. 67, p. 261—276.
62. *Janak J., Klimes J., Hana K. J.* Chromat., 1965, v. 18, p. 270—277.
63. *Janak J. J.* Chromat., 1964, v. 15, p. 15—28.
64. *Janak J. J.* Gas Chromat., 1965, v. 18, p. 270—274.
65. *Pretorius V., Hopkins B. Y., Schicke J. D. J.* Chromat., 1974, v. 99, p. 23—30.
66. *Mukherjee K. D. J.* Chromat., 1974, v. 96, p. 242—244.
67. *Jimeno de Osse F. J.* Chromat., 1974, v. 96, p. 239—241.
68. *Copius-Peereboom Y. W.* "Nature", 1964, v. 204, p. 748—750.
69. *Thompson A. C., Hedin P. A. J.* Chromat., 1966, v. 21, p. 13—17.
70. *Seligman J. M., Doy F. A.* Anal. Biochem., 1972, v. 46, p. 62—66.
71. *Lynes A. J.* Chromat., 1964, v. 15, p. 108—110.
72. *Knappe E., Yekunde K. G. Z.* Anal. Chem., 1964, Bd. 203, S. 87—92.
73. *Андреев В. Л., Финкельштейн З. И., Беляев С. С.* Прикл. биохим. и микробиол., 1974, т. 10, с. 308—312.
74. *Gosselin L., De Graeve Y. J.* Chromat., 1975, v. 110, p. 117—124.
75. *Petrowitz H. Y., Pastuska G. J.* Chromat., 1962, v. 7, p. 128—130.
76. *Knappe E., Peteri D. Z.* Anal. Chem., 1962, Bd. 188, S. 184—189.
77. *Higgins H., Brand T.* Anal. Biochem., 1966, v. 15, p. 122—126.
78. *Myers W. F., Huang K. Y.* Anal. Biochem., 1966, v. 17, p. 210—213.
79. *Beaudoin A. B., Moorjan S., Lemonde A.* Can. J. Biochem., 1973, v. 51, p. 318—320.
80. *Андреев В. Л., Сапожникова Г. П., Родионова М. А.* Прикл. биохим. и микробиол., 1974, т. 10, с. 921—927.
81. *Hoffman N. E., Killinger Jh. A.* Anal. Chem., 1969, v. 41, p. 162—163.
82. *Pastuska G., Petrowitz H.-Y. J.* Chromat., 1963, v. 10, p. 517—520.
83. *Frankenfeld J. W. J.* Chromat., 1965, v. 18, p. 179—180.
84. *Андреев Л. В. и др.* Прикл. биохим. и микробиол., 1972, т. 8, с. 75—81.
85. *Bailey R. W.* Anal. Chem., 1964, v. 36, p. 2021—2025.
86. *Kelly S. H., Finkll B. J. J.* Chromat., 1971, v. 63, p. 438—441.
87. *Petrowitz H.-J.* Angew. Chem., 1960, Bd. 72, S. 921—922.
88. *Henein R. G., David A. J.* Chromat., 1968, v. 36, p. 543—545.
89. *Lawrence B. M. J.* Chromat., 1968, v. 38, p. 535—537.
90. *Petrowitz H. J. J.* Chromat., 1971, v. 63, p. 9—14.
91. *Hranisavljevic-Jakovljevic M., PejkoVIC-Tadic Y., StojljkoVIC A.* J. Chromat., 1963, v. 12, p. 70—74.
92. *Pastuska G., Petrovitz H.-J.* Chem. Zeit., 1964, Bd. 88, S. 311—316.
93. *Berei K., Vasazos L. J.* Chromat., 1967, v. 26, p. 301—304.
94. *Cooper P. D. J.* Chromat., 1972, v. 67, p. 184—185.
95. *Palamareva M. e. a. J.* Chromat., 1971, v. 64, p. 383—387.
96. *Petrowitz H.-J.* Chem. Zeit., 1966, Bd. 90, S. 627—630.
97. *Petrowitz H.-J.* "Chimia", 1964, v. 18, p. 137—141.

98. *Petrowitz H.-J., Pastuska G., Vagner S.* Chem. Zeit., 1965, Bd. 89, S. 7—10.
99. *Mayer R., Rosmus P., Fabian J. J.* J. Chromat., 1964, v. 15, p. 153—167.
100. *Мельников Н. Н.* Химия и технология пестицидов. М., «Химия», 1974. 766 с.
101. *Письменная М. В., Клисенко М. А.* «Проблемы аналитической химии», 1972, т. 2, с. 111—115.
102. *Ackermann H. J.* J. Chromat., 1969, v. 44, p. 414—416.
103. *Ramasamy M.* "Analyst", 1969, v. 94, p. 1075—1080.
104. *Askew J., Ruzicka J. H., Wheals B. B.* "Analyst", 1969, v. 94, p. 275—283.
105. *Косматый Е. С., Тверская Б. М., Полонская Ф. И.* «Проблемы аналитической химии», 1972, т. 2, с. 70—72.
106. *Вилегжанина Г. Ф., Колмыкова Р. Г.* «Проблемы аналитической химии», 1972, т. 2, с. 32—38.
107. *Новикова К. Ф., Мельцер Ф. Р.* «Проблемы аналитической химии», 1972, т. 2, с. 95—98.
108. *Самосват Л. С.* «Проблемы аналитической химии», 1972, т. 2, с. 127—130.
109. *Векштейн М. Ш., Клисенко М. А.* «Проблемы аналитической химии», 1972, т. 2, с. 21—27.
110. *Nagasawa K., Yoshidome H., Kamata F. J.* J. Chromat., 1970, v. 52, p. 453—459.
111. *Nagasawa K., Yoshidome H., Anryu K. J.* J. Chromat., 1970, v. 52, p. 173—176.
112. *Abbott D. C., Tatton J. O'G., Wood N. F. J.* J. Chromat., 1969, v. 42, p. 83—85.
113. *Sadroni S., Schlitt H. J.* J. Chromat., 1971, v. 55, p. 385—389.
114. *Fehring N. N., Westfall J. E. J.* J. Chromat., 1971, v. 57, p. 397—405.
115. *Bishera R. H., Born G. S., Christian Y. S. J.* J. Chromat., 1971, v. 57, p. 444—447.
116. *Седых А. С. и др.* «Проблемы аналитической химии», 1972, т. 2, с. 130—135.
117. *Bonelli E. J.* Anal. Chem., 1972, v. 44, p. 603—605.
118. *Frei K. W., Belliveau P. E.* "Chromatographia", 1972, v. 5, p. 296—299.
119. *Glike F. J.* J. Chromat., 1971, v. 61, p. 279—283.
120. *Clike F. J.* J. Chromat., 1970, v. 5, p. 447—452.
121. *Mendoza C. E. J.* J. Chromat., 1973, v. 78, p. 29—40.
122. *Geldmacher-Mallinckrodt M., Ong G. L.* Arch. Kriminol., 1970, Bd. 146, S. 154—159.
123. *Bogusy M., Borkowski T. Z.* Rechtsmed., 1971, Bd. 68, S. 267—270.
124. *Seifert J., Davidek J. J.* J. Chromat., 1971, v. 59, p. 446—449.
125. *Mendoza C. E. e. a.* "Analyst", 1969, v. 94, p. 805—810.
126. *Mendoza C. E., Sjields J. B. J.* J. Chromat., 1970, v. 50, p. 92—102.
127. *Sherma J., Zweig G.* Thin Layer Chromatography and Analysis Pesticides of International Importance. N. Y., Acad. Press., 1973. 225 p.
128. *Gossele Y. A. W., Srebznik-Friszman S. J.* J. Chromat., 1966, v. 23, p. 305—308.

129. *Copius-Peereboom J. W., Beekes H. W. J. Chromat.*, 1964, v. 14, p. 417—423.
130. *Chiamg H.-C. J. Chromat.*, 1969, v. 44, p. 201—207.
131. *Gossele Y. A. W. J. Chromat.*, 1971, v. 63, p. 433—437.
132. *Nagasowas K., Yoshidome H., Takeshita R. J. Chromat.*, 1969, v. 43, p. 473—479.
133. *Takeshita R., Yamashita T., Itoh N. J. Chromat.*, 1972, v. 73, p. 173—182.
134. *De Clerco H., Massart D. L. J. Chromat.*, 1974, v. 93, p. 243—247.
135. Старение и стабилизация полимеров. Под ред. А. С. Кузьминского. М., «Химия», 1966. 210 с.
136. *Солодова Г. М., Малышев А. И., Ростовцева Е. Е. «Проблемы аналитической химии»*, 1970, т. 1, с. 91—96.
137. *Гедрайтите Г. Б., Багданайте В. А., Юшкевичюте С. С. ЖАХ*, 1975, т. 30, с. 1618—1619.
138. *Мастрюкова Т. А., Сахарова Т. Б., Кабачник М. И. Изв. АН СССР. ОХН*, 1963, № 12, с. 2211—2219.
139. *Fischbein L., Faulkers J. J. Chromat.*, 1966, v. 22, p. 323—328.
140. *Korte F., Vogel J. J. Chromat.*, 1962, v. 9, p. 381—385.
141. *Bonker G. J., Tonge B. L. J. Chromat.*, 1963, v. 12, p. 52—56.
142. *Bäumler J., Rippstein S. Helv. chim. acta*, 1961, v. 44, p. 1163—1168.
143. *Fischer R., Klingelhöller W. Arch. Toxikol.*, 1961, v. 19, p. 119—124.
144. *Nakamura H., Tamura Z. J. Chromat.*, 1974, v. 96, p. 195—210.
145. *Прилежаева Е. Н., Снегоцкий В. И., Сюндюкова В. Х. Х научная сессия по химии сероорганических соединений нефтей и нефтепродуктов. Тезисы докладов. Уфа, 1966, с. 61.*
146. *Дронов В. П., Снегоцкая В. А., Коленченко Л. И., Ворончухина Д. П. Там же*, с. 61.
147. *Párkányi C., Zahradník R. Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1962, v. 27, p. 1355—1358.
148. *Караулова Е. Н., Бобруйская Т. С., Гальперн Г. Д. ЖАХ*, 1966, т. 21, с. 893—896.
149. *Bayfield R. F., Clarke V., Cole E. R. J. Chromat.*, 1965, v. 19, p. 370—374.
150. *Bayfield R. F., Cole E. R. J. Chromat.*, 1969, v. 40, p. 470—472.
151. *Stephan P., Erdman J. G. "Nature" (London)*, 1964, v. 203, p. 749—755.
152. *Chargaff E., Levine C., Green C. J. Biol. Chem.*, 1948, v. 175, p. 67—70.
153. *Winegrad H. M., Toennies G. "Science"*, 1948, v. 108, p. 506—509.
154. *Havir J., Vrestal J., Chromy V. Chem. listy*, 1965, v. 59, p. 431—435.
155. *Toennies G., Kolb J. J. Anal. Chem.*, 1951, v. 23, p. 823—826.
156. *Wong F. F. J. Chromat.*, 1971, v. 59, p. 448—451.
157. *Popov A., Gadeva V. J. Chromat.*, 1964, v. 16, p. 256—260.
158. *Frei R. W., Maclellan B. L., Macheil J. D. Anal. Chem. Acta*, 1973, v. 66, p. 139—142.
159. *de Marco C. "Nature" (London)*, 1963, v. 198, p. 683—686.
160. *Carson J. F., Wong F. F. J. Chromat.*, 1963, v. 12, p. 408—411.

161. *Petschik H., Steger E. J. Chromat., 1962, v. 7, p. 135—136.*
162. *Ertel H., Horner L. J. Chromat., 1962, v. 7, p. 268—269.*
163. *Wrounski M. J. Chromat., 1966, v. 24, p. 480—482.*
164. *Glaser C. B., Maeda H., Meienhofer J. J. Chromat., 1970, v. 50, p. 151—154.*
165. *Prinzler H. W., Pape D., Teppke M. J. Chromat., 1965, v. 19, p. 375—381.*
166. *Curtis R. D., Phillips G. T. J. Chromat., 1962, v. 9, p. 366—368.*
167. *Nakamura H., Tamura Z. J. Chromat., 1974, v. 96, p. 211—222.*
168. *Караулова Е. Н. и др. «Проблемы аналитической химии», 1970, т. 1, с. 76—79.*
169. *Караулова Е. Н. и др. ХГС, 1973, № 7, с. 913—917.*
170. *Грачева Е. П. и др. ЖОХ, 1963, т. 33, с. 2493—2496.*
171. *Караулова Е. Н. и др. «Нефтехимия», 1967, т. 7, с. 812—815.*
172. *Tiselius A., Hjerten S., Levin O. Arch. Biochem. Biophys., 1956, v. 65, p. 132—155.*
173. *Anacker V. T., Stoy V. Biochem. Z., 1958, Bd. 330, S. 141—152.*
174. *Main R. K., Wilkins M. J., Cole L. J. J. Am. Chem. Soc., 1959, v. 81, p. 6490—6498.*
175. *Atkinson A., Bradford P. A. Selmes J. P. J. Appl. Chem., 1973, v. 23, p. 517—529.*
176. *Мазин А. Л., Сулимова Г. Е. «Биохимия», 1975, т. 40, № 1, с. 115—122.*
177. *Fucker K., Meyer R. A., Pictsch H. P. "Nahrung", 1976, Bd. 20, S. 81—82.*
178. *Wiesner J., Wiesnerova L. J. Chromat., 1975, v. 114, p. 411—417.*
179. *Srivastava S. P., Dua V. K. Z. Anal. Chem., 1975, Bd. 276, S. 382—383.*
180. *Gunatilaka A. A., Leslie P. J. Chromat., 1976, v. 120, p. 229—233.*
181. *Krivos A. F., Ong C. C. Microchem. J., 1971, v. 16, p. 391—394.*
182. *Felix A. M., Jimener M. H. J. Chromat., 1974, v. 89, p. 361—364.*
183. *Sherma J., Touchstone J. C. Anal. Letter., 1974, v. 7, p. 279—287.*
184. *Munier R. L., Peigner A., Thommegay Ch. "Chromatographia", 1970, N 5, p. 205—210.*
185. *Kulbe K. D. Anal. Biochem., 1974, v. 59, p. 564—573.*
186. *Walz D. A., Routerby J. J. Chromat., 1975, v. 104, p. 180—183.*
187. *Sjoquist J. Jeppsson J. O. Anal. Biochem., 1967, v. 18, p. 264—269.*
188. *Solal M. C., Bernard J. L. J. Chromat., 1973, v. 80, p. 140—143.*
189. *Rangarajan M., Darbre A. Biochem. J., 1975, v. 147, p. 435—438.*
190. *Stehelin D., Duranton H. J. Chromat., 1969, v. 43, p. 93—102.*
191. *Pataki G. J. Chromat., 1964, v. 47, p. 1763—1765.*
192. *Беленький Б. Г. и др. «Молекулярная биология», 1967, т. 1, № 1, 184—190.*
193. *Andrews P. Biochem. J., 1964, v. 91, p. 222—230.*
194. *Determann H. "Experientia", 1962, v. 18, p. 389—395.*
195. *Детерман Г. Гель-хроматография. Пер. с нем. Под ред. А. С. Хохлова. М., «Мир», 1970. 252 с.*
196. *Heinz F., Prosch W. Anal. Biochem., 1971, v. 40, p. 327—330.*
197. *Klaus G. G. B., Nitecki D. E., Goodman J. W. Anal. Biochem., 1972, v. 45, p. 286—297.*
198. *Johansson B. G., Rymo L. Acta Chem. Scand., 1962, v. 16, p. 2067—2070.*

199. *Dravert F., Muller W.* "Chromatographia", 1971, v. 4, p. 23—26.
200. *Simonianova E., Rybak M.* Biochim. Biophys. Acta, 1964, v. 93, p. 194—198.
201. *Gunther H. Z.* Anal. Chem., 1968, Bd. 243, S. 609—616.
202. *Hofmann A. F.* Biochim. Biophys. Acta, 1962, v. 60, p. 458—462.
203. *Кибардин С. А., Лазуркина В. Б.* «Биохимия», 1965, т. 30, с. 559—562.
204. *Лазуркина В. Б., Кибардин С. А.* «Биохимия», 1968, т. 33, с. 922—927.
205. *Лазуркина В. Б.* Кандидатская диссертация. Л., ЛГУ, 1972,

СЕРГЕЙ АЛЕКСЕЕВИЧ КИБАРДИН
КОНСТАНТИН АЛЕКСЕЕВИЧ МАКАРОВ

**ТОНКОСЛОЙНАЯ
ХРОМАТОГРАФИЯ
В ОРГАНИЧЕСКОЙ
ХИМИИ**

Редактор Пастушенко М. Н.
Технический редактор Вознесенская Р. М.
Художник Сумнительный Е. А.
Художественный редактор Носов Н. В.
Корректоры Лобанова В. А., Ивлиева М. А.

ИБ № 239

Сдано в наб. 13.01.78. Подп. в печ. 20.04.78. Т-07678
Формат бумаги 84×108¹/₃₂. Бумага тип. № 2. Гарн. лит.
Печать высокая. Усл.-печ. л. 6,72 Уч.-изд. л. 6,79
Тираж 7500 экз. Зак. № 80 Цена 55 к. Изд. № 1133
Издательство «Химия», 107076, Москва, Стромынка, 13.

Московская типография № 32 Союзполиграфпрома
при Государственном комитете Совета Министров СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
Москва, К-51, Цветной бульвар, 26.