

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. А.М. БУТЛЕРОВА  
*Кафедра аналитической химии*

**М.И. СОРВИН, Е.О. ЧИБИРЕВ**

## **ПЛОСКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**

**Учебно-методическое пособие  
по аналитической химии**

Казань – 2024

**УДК 543.544.943**

*Принято на заседании учебно-методической комиссии Химического института  
им. А.М. Бутлерова  
Протокол № 10 от 25 апреля 2024 года*

**Рецензенты:**

кандидат химических наук,  
доцент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ  
**А.В. Порфирьева**

**Сорвин М.И.**

**Плоскостная хроматография. Учебно-методическое пособие по аналитической химии / М.И. Сорвин, Е.О. Чибирев. – Казань: Казан. ун-т, 2024. – 28 с.**

Учебно-методическое пособие к курсу «Аналитическая химия» для студентов 2 курса бакалавриата (04.03.01 – «Химия») и специалитета (04.05.01 – «Фундаментальная и прикладная химия») Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ предназначено для использования при выполнении лабораторного практикума.

В учебно-методическом пособии рассмотрены теоретические основы плоскостной хроматографии, описано выполнение практических работ по качественному и количественному определению органических и неорганических соединений методами тонкослойной и бумажной хроматографии, представлены вопросы для самоконтроля.

© Сорвин М.И., 2024

© Казанский федеральный университет, 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1. ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>2. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ</b>	5
<b>3. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ</b>	6
<b>4. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ</b>	16
<b>5. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ</b>	19
<b>5.1 Лабораторная работа № 1. Определение катионов металлов методом бумажной хроматографии</b>	20
<b>5.2 Лабораторная работа № 2 Определение аминокислот методом бумажной хроматографии</b>	22
<b>5.3 Лабораторная работа № 3 Применение бумажной хроматографии для определения фенолов</b>	23
<b>5.4 Лабораторная работа № 4 Определение глицерина, этиленгликоля и 1,2-пропиленгликоля с помощью ТСХ</b>	24
<b>5.5 Лабораторная работа № 5. Количественное определение аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах методом ТСХ</b>	25
<b>6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ</b>	27
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b>	28

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Хроматография – гибридный аналитический метод, который может быть использован для разделения и определения веществ. Хроматографию используют для идентификации и количественного определения органических и неорганических соединений. Метод широко применяется в научных исследованиях для установления состава сложных смесей, в препаративных целях – для получения небольших количеств особо чистых веществ, в промышленных масштабах – для получения больших количеств веществ и для автоматического контроля производства. Хроматография является одним из важнейших методов аналитической химии, поскольку обладает универсальностью, экспрессностью и высокой чувствительностью.

Методы тонкослойной (ТСХ) и бумажной хроматографии по технике выполнения относятся к плоскостной хроматографии.

ТСХ позволяет исследовать большое количество проб одновременно при незначительном расходе растворителя, что делает ее необходимым инструментом в ежедневной рутинной практике анализа. Для проведения количественного определения соединений методом ТСХ разработаны разнообразные приборы, которые находят широкое применение в научных и промышленных лабораториях.

Бумажная хроматография используется в качестве экономного метода при анализе большого числа проб и подходит для первичного анализа пищевых продуктов, красителей, фармацевтических и наркотических средств. Этот метод применяют для анализа объектов окружающей среды, например, образцов почвы.

## 2. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Все виды хроматографии основаны на использовании динамической двухфазной системы, состоящей из неподвижной (НФ) и подвижной (ПФ) фаз. Прохождение анализируемых веществ между фазами определяется установлением динамического равновесия распределения между сорбентом и элюентом. Коэффициент распределения  $\kappa'$  для этого равновесия можно рассчитать как отношение концентрации вещества в неподвижной фазе ( $C_S$ ) и подвижной фазе ( $C_M$ ):

$$\kappa' = \frac{C_S}{C_M} \quad (1)$$

Коэффициент распределения описывает константу равновесия для разделяемого вещества и является мерой склонности к распределению между двумя несмешивающимися фазами. Его также называют распределительным отношением.

НФ и ПФ должны находиться в тесном контакте друг с другом, чтобы могло установиться равновесие. Для разделения смеси веществ нужно, чтобы ее компоненты обладали различными коэффициентами распределения. При прохождении ПФ, содержащей анализируемую смесь, через НФ устанавливается динамическое равновесие. Одновременно идут процессы адсорбции соединений из ПФ на поверхность НФ и десорбции с поверхности НФ в ПФ в соответствии с величиной коэффициента распределения.

Благодаря многократному повторению этого процесса компоненты анализируемой смеси будут разделяться. Компонент, обладающий большим сродством к НФ, сильнее удерживается и мигрирует медленнее компонента, который слабее взаимодействует с НФ.

### 3. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Тонкослойная хроматография (ТСХ) - один из наиболее широко используемых хроматографических методов - имеет огромное значение для быстрого качественного анализа смесей, контроля реакций и определения рабочих параметров, которые следует использовать в препаративной колоночной хроматографии. Этот метод простой по технике выполнения, экспрессный, позволяет анализировать микропробы и не требует дорогостоящего оборудования. Разделение в ТСХ обеспечивается движением ПФ через нанесенный на подложку тонкий слой сорбента. Продвижение элюента по пластинке обеспечивается капиллярными силами. Существует несколько вариантов ТСХ, различающихся способом подачи растворителя: восходящая, нисходящая (для анализа проб, компоненты которых очень медленно движутся по слою), радиальная и антирадиальная. В зависимости от режима подачи элюента различают ТСХ непрерывного (растворитель постоянно подается на пластину, а по достижении конца слоя удаляется испарением или впитывается фильтром), многократного (многократно повторяется процесс элюирования одним и тем же растворителем с высушиванием перед каждым последующим элюированием), ступенчатого (проводят различными растворителями так, что каждый новый растворитель поднимается выше уровня предыдущего), градиентного (свойства элюента изменяются в определенном направлении) и двумерного (элюирование проводится в двух взаимно перпендикулярных направлениях) элюирования.

#### **Общее описание**

Процесс разделения в ТСХ представляет собой одну из форм жидкостно-адсорбционной хроматографии. Разделение проводят на плоской пластинке, покрытой тонким слоем сорбента – силикагелем, целлюлозой, оксидом алюминия и т.д. (рис. 1. а).

Рассмотрим процессы, происходящие при разделении компонентов смеси, в восходящем варианте ТСХ. Разделяемую смесь, растворенную в соответствующем растворителе, наносят с помощью стеклянного капилляра или микрошприца на пластинку (рис. 1. б), и после испарения растворителя помещают пластинку в хроматографическую камеру (рис. 1. в) с растворителем. Растворитель поднимается по слою сорбента под действием капиллярных сил. При этом различные соединения, находящиеся в смеси, поднимаются с разными скоростями в зависимости от их сродства к сорбенту, т.е. хроматографическое разделение обусловлено переносом компонентов ПФ вдоль слоя НФ с различными скоростями в соответствии с коэффициентами распределения разделяемых компонентов. По достижении растворителем верхнего края пластинки компоненты смеси в идеальном случае должны полностью разделиться (рис. 1. г), образуя отдельные зоны, положение которых на хроматограмме характеризуется величинами  $R_f$  – относительной скоростью перемещения компонентов в тонком слое (или хроматографической подвижностью).

$$R_f = \frac{x}{L} \quad (2)$$

где  $x$  – путь, пройденный веществом,  $L$  – расстояние, пройденное растворителем.

Экспериментально величину  $R_f$  определяют как отношение расстояния  $x$ , пройденного веществом, к расстоянию  $L$ , пройденному растворителем. Разделение двух веществ практически возможно, если  $\Delta R_f \geq 0.1$ . Величина  $R_f$  зависит от активности и природы сорбента, толщины слоя сорбента, качества и природы растворителя, способа нанесения пробы, температуры и т.д.. В идеальном случае (линейная изотерма сорбции) величина  $R_f$  не зависит от концентрации определяемого вещества и присутствия других компонентов.

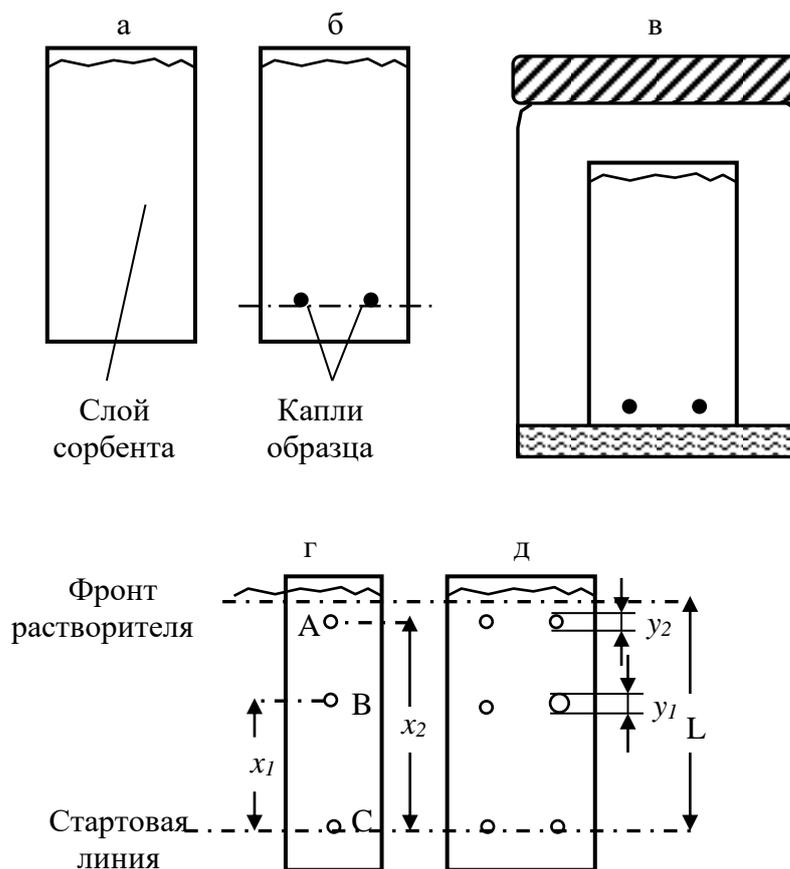


Рис. 1. Тонкослойная хроматография

Мерой эффективности разделения в ТСХ является высота эквивалентная теоретической тарелке  $H$  :

$$H = \frac{L}{N} \quad (3)$$

$$N = 16 \cdot \left( \frac{x}{y} \right)^2 \quad (4)$$

где  $y$  – длина пятна, а  $N$  – число теоретических тарелок,  $x$  – путь, пройденный веществом.

Критерий разделения двух веществ определяют исходя из хроматограммы по формуле разрешения  $R_s$  :

$$R_s = \frac{2 \cdot (x_2 - x_1)}{y_1 + y_2} \quad (5)$$

где  $x$  – путь, пройденный веществом,  $y$  – длина пятна.

Эффективность хроматографической системы можно оценить по фактору разделения (селективности) двух веществ с разными коэффициентами распределения:

$$\alpha = \frac{\frac{1}{R_{f1} - 1}}{\frac{1}{R_{f2} - 1}} \quad (6)$$

где  $\alpha$  – селективность  $R_f$  – хроматографическая подвижность.

### **ТСХ-пластинки и сорбенты**

Пластинки для ТСХ состоят из стеклянной, пластмассовой или алюминиевой подложки, на которую нанесен тонкий слой сорбента толщиной примерно 250 мкм (рис. 1. а). Сорбентом обычно служит либо силикагель, либо оксид алюминия с размером частиц до 10 – 30 мкм, к которым добавлено связующее вещество (до 10% гипса или крахмала), обеспечивающее прочность слоя. Пластинки бывают двух основных типов: многоразового использования и одноразовые.

Одноразовые пластинки имеют готовый слой сорбента, нанесенный обычно на пластмассовую пластинку или алюминиевую фольгу. Такие пластинки удобны тем, что их можно легко разрезать ножницами на полоски нужного размера.

Пластинки многоразового использования изготавливают из толстого стекла, на которое при помощи специального оборудования наносят сорбент, а затем после использования пластинки счищают его для повторного покрытия.

Пластинки бывают разных размеров от 20 × 5 см до дешевых пластинок, сделанных из микроскопных предметных стекол (75 × 25 мм), пригодных для контроля реакций. В учебных лабораториях обычно используют пластинки с заранее нанесенным слоем.

Одноразовые пластинки, благодаря тонкому плотному слою сорбента с однородными сферическими частицами небольшого размера (10 – 30 мкм), дают лучшее разрешение, чем пластинки многократного использования. Для большинства разделений вполне достаточно пластинка длиной 5 см. При работе с одноразовыми пластинками отрезают полоску размером 5 × 20 см, проводят карандашом слабую линию на расстоянии 5 – 10 мм от длинной нижней кромки, чтобы указать, куда наносить капли образца, и затем нарезают полоски соответствующего размера.

Готовые пластинки имеют определенную активность; их следует хранить в закрытой емкости над обезвоженным силикагелем или активировать в сушильном шкафу.

### **Приготовление ТСХ-пластин**

Для нанесения покрытий используют специальные приспособления. Хорошие результаты дает тщательное обезжиривание пластины детергентом перед нанесением покрытия. Приспособление для нанесения покрытия требует использования суспензии сорбента (размер частиц 10 – 30 мкм) в воде (2 мл воды на 1 г сорбента). Ориентировочно, чтобы покрыть пластинку площадью 100 × 20 см слоем толщиной 0.25 см, требуется 50 г сорбента. После нанесения покрытия пластины оставляют до тех пор, пока нанесенный слой не застынет, затем их переносят на специальную подставку и нагревают в термостате при 120 – 130 °С в течение 4 ч. Такой способ дает пластины с активностью по Брокману II-III степени. Пластины должны храниться в ящике над силикагелем.

## **Нанесение образца**

Образец обычно наносят с помощью капилляра (в случае проведения качественного анализа) или микрошприца (для более точной идентификации и количественного анализа) в виде 1 – 2 % раствора в летучем (для получения пятна минимального размера) растворителе типа дихлорметана, хлороформа или эфира. Объем наносимого на пластинку раствора составляет обычно 2 – 5 мкл. В ТСХ применяют, как правило, достаточно концентрированные пробы, так как для детектирования пятна оно должно содержать 1 – 10 мкг определяемого вещества.

Место нанесения капель в зависимости от размера пластинки должно быть на расстоянии 1 см от нижнего края на больших (5 × 20 см) пластинках и около 5 мм на маленьких одноразовых пластинках. Важно наносить капли таким образом (рис. 1. б, в), чтобы они не погружались в элюент, т.е. его уровень в хроматографической камере не должен быть выше отметки старта.

Перед нанесением образца заполните капилляр, погрузив его конец в раствор (капилляр заполняется раствором под действием капиллярных сил), затем слегка прикоснитесь заполненным кончиком к сорбенту, стараясь при этом не повредить его поверхности, чтобы не вызвать некоторого искажения капли при проявлении хроматограммы. Важно наносить как можно более маленькую каплю (объемом 1 – 2 мкл), а это требует тонкого капилляра. Перед проявлением хроматограммы дайте капле полностью высохнуть.

*Меры безопасности. В этой операции обычно используются летучие легковоспламеняющиеся растворители, поэтому ее нужно проводить вдали от источников возгорания предпочтительно в вытяжном шкафу.*

## **Хроматографирование**

Хроматографирование проводят путем погружения нижнего края пластинки в растворитель (ПФ) в сосуде соответствующего размера (рис. 1. в). Камеру изнутри следует частично выложить фильтровальной бумагой, которая погружалась бы в растворитель, чтобы создать атмосферу, насыщенную парами

растворителя, и свести к минимуму испарение с пластинки. Для проведения процесса разделения сначала залейте в камеру столько растворителя, чтобы стартовая зона оказалась над его поверхностью, а затем опустите в камеру пластинку, стараясь расположить ее вертикально. Для придания герметичности крышку камеры можно смазать силиконовой или другой малорастворимой смазкой.

Это легко проделать с большими пластинками, но с маленькими легкими одноразовыми пластинками необходимо обращаться с большой осторожностью, используя микрощипцы или пинцет. На время хроматографирования камера должна оставаться закрытой. После подъема фронта растворителя до верха пластинки необходимо вынуть ее из камеры и отметить карандашом или шпателем положение фронта растворителя. Для удаления паров растворителя пластинку высушивают в вытяжном шкафу, при этом можно использовать нагревательный столик из комплекта для ТСХ.

### **Просмотр хроматограммы**

Если соединения образца окрашены, то после хроматографирования и высушивания их легко различить визуально, однако для бесцветных соединений требуется какой-либо метод визуализации или проявляющий реактив.

Наиболее распространенный метод - введение в слой сорбента неорганического флуоресцентного агента (0.5 %), которым снабжены коммерческие одноразовые пластинки. При освещении такой пластинки УФ – лампой (254 нм) сорбент начинает светиться бледно-зеленым или голубым светом, а большинство органических соединений образуют зоны гашения флуоресценции различной интенсивности, которые выделяются в виде темных пятен.

*Меры безопасности. Хотя специальные УФ – лампы для ТСХ имеют низкую мощность, их все же следует вмонтировать в смотровой бокс или*

колпак, чтобы защитить глаза наблюдателя от УФ – излучения и чтобы дневной свет не попадал в камеру.

Еще один распространенный метод состоит в использовании эксикатора с йодом, который представляет собой емкость такого же размера, как и камера для хроматографирования, куда помещено несколько кристалликов йода. Если сухую пластинку поместить в камеру на несколько минут, пары йода будут растворяться в органических "пятнах", окрашивая их в коричневый цвет, до тех пор, пока вся пластинка не потемнеет.

Имеется целый ряд реагентов, нанесение которых из пульверизатора на пластинку после хроматографирования, окрашивает соединения определенных классов в различные цвета. Примеры реагентов-проявителей приведены в таблице 1.

Для обнаружения компонентов используют также метод, основанный на измерении величин хроматографической подвижности ( $R_f$ ) для стандартного и обнаруживаемого веществ в определенном растворителе.

Какой бы метод ни использовался для визуализации, положение пятен для проведения дальнейших измерений необходимо пометить карандашом или шпателем (рис. 1. г).

Таблица 1.

Реагенты для определения некоторых органических соединений

Класс соединений	Реагент	Окраска пятен	Фон
Кислоты	Бромкрезоловый зеленый	Зеленая	Зеленый
Спирты	Нитрат церия-аммония 8-оксихинолинат ванадия	Коричневая Красная	Желтый Зеленый
Альдегиды	2,4-динитрофенилгидразин	От желтой до красной	Бледно- оранжевый
Амины	Тиоцианат кобальта	Голубая	Розовый
Фенолы	Хлорид железа (III)	Красно- фиолетовая	
Аминокислоты и пептиды	Нингидрин	В зависимости от соединения	

Необходимо отметить, что, хотя описанные выше методы в целом достаточно эффективны, одни соединения "проявляются" сильнее, другие слабее, а некоторые иногда не видны совсем. Поэтому нельзя принимать относительную яркость пятен в качестве характеристики относительных концентраций в смеси.

### **Использование ТСХ в качественном анализе**

При конкретном наборе условий (сорбент и растворитель) характеристикой соединения является значение величины  $R_f$  (рис. 1. г). Таким образом, идентичность значения  $R_f$  соединения, находящегося в смеси, со значением  $R_f$  стандартного образца (вещества сравнения) дает основание предположить, что они одинаковы. Поскольку сорбенты различны, а состав смеси растворителей трудно воспроизвести точно, необходимо доказать, что значения  $R_f$  одинаковы. Для этого хроматографируют смесь и вещество сравнения рядом друг с другом на одной и той же пластинке или добавляют небольшое количество вещества сравнения к отдельной пробе смеси, чтобы удостовериться в точном совпадении пятен (рис. 1. д).

### **Количественный анализ**

Количественный анализ осуществляют непосредственно на хроматограмме или анализируемое вещество вымывают из слоя сорбента после вырезания зоны, и полученный раствор анализируют каким-либо методом. Непосредственно на хроматограмме количественный анализ можно осуществлять по размеру пятна (полуколичественное определение), спектрофотометрическим методом по спектрам поглощения и отражения, а также флуориметрическим, рентгенофлуоресцентным и радиометрическими методами. Определение компонентов после смывания можно выполнить спектрофотометрическим, флуориметрическим и атомно-абсорбционным методами.

### Выбор растворителя (подвижной фазы)

Высота, на которую поднимается по пластинке "пятно" соединения, зависит от сродства последнего к сорбенту и силы (полярности) проявляющего растворителя (табл. 2).

Таблица 2.

Сила некоторых растворителей для хроматографии

Растворитель	$\epsilon^\circ$	Растворитель	$\epsilon^\circ$
Пентан ( $C_5H_{12}$ )	0.00	2-Хлорпропан ( $CH_3CHClCH_3$ )	0.29
Толуол ( $C_6H_5CH_3$ )	0.29	Тetraгидрофуран ( $C_4H_8O$ )	0.45
Хлороформ ( $CHCl_3$ )	0.40	Ацетонитрил ( $CH_3CN$ )	0.65
Гексан ( $C_6H_{14}$ )	0.01	Диэтиловый эфир ( $C_2H_5OC_2H_5$ )	0.38
Метанол ( $CH_3OH$ )	0.95	1- и 2-Пропанол ( $C_3H_7OH$ )	0.82
Циклогексан ( $C_6H_{12}$ )	0.04	1,2-Дихлорэтан ( $CH_2ClCH_2Cl$ )	0.49
Диоксан ( $C_4H_8O_2$ )	0.56	Этилацетат ( $CH_3CO_2C_2H_5$ )	0.58
Этанол ( $CH_3CH_2OH$ )	0.88	Тетрахлорид углерода ( $CCl_4$ )	0.18
Дихлорметан ( $CH_2Cl_2$ )	0.42	Диметилсульфоксид ( $CH_3SOCH_3$ )	0.62

Полярные соединения (спирты, кетоны и т. п.) сорбируются сильно и поэтому плохо продвигаются при использовании слабых растворителей в качестве ПФ (например, гексана), тогда как неполярный углеводород (например, нафталин) хорошо поднимается по пластинке. Наиболее подходящий растворитель часто приходится находить эмпирическим путем. Силу растворителя легче всего регулировать, используя смеси сильного и слабого растворителей. Обычно начинают с 1:1-смеси эфира ("сильный" растворитель) с гексаном (или петролевым эфиром) ("слабый" растворитель) и затем соответственно меняют соотношение. Очевидно, что, если чистый эфир

не способен поднять "пятна" вверх по пластинке, необходимо перейти к более "сильному" растворителю (таблица 2).

В случаях, когда разделению препятствует сильное перекрывание двух пятен (т.е. при низкой эффективности разделения, мерой которой является ВЭТТ) можно попытаться улучшить разделение двумя путями:

- изменением химической природы ПФ при сохранении ее силы (это изменит величину  $\alpha$ );

- изменением природы неподвижной фазы, например, заменой оксида алюминия на силикагель, и наоборот. На практике при наличии разных пластинок последний путь часто является более эффективным и быстрым.

В случаях, когда разделяемая смесь содержит несколько полярных и неполярных соединений, может потребоваться двукратное хроматографирование – сначала в "слабом" растворителе для разделения неполярных соединений (полярные остаются на старте), а затем в более "сильном" растворителе для разделения полярных соединений (неполярные при этом сходятся вместе у фронта растворителя).

#### **4. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**

Бумажная хроматография – это достаточно простой метод, который обычно используется для разделения не очень сложных смесей. По механизму разделения бумажная хроматография является распределительной. В методе бумажной хроматографии разделение веществ происходит вследствие распределения их между водной НФ, содержащейся в целлюлозе, и ПФ, которая продвигается по бумаге главным образом благодаря капиллярным силам. В качестве ПФ используют органические растворители, воду или растворы электролитов. Возможен также обращенно-фазовый вариант, в котором бумагу предварительно пропитывают гидрофобными веществами (парафин, каучук и т.д.) или подвергают специальной химической обработке, направленной на удаление гидроксильных групп. В роли ПФ в этом случае

выступают вода и ее смеси с полярными органическими растворителями. Большое значение имеет выбор ПФ, т.к. анализируемые вещества должны лучше растворяться в НФ, чем в ПФ.

Как и в ТСХ, для количественной оценки подвижности вещества в хроматографической системе используют величину  $R_f$  – относительную скорость перемещения компонентов по бумажной полоске (хроматографическая подвижность), которая зависит от природы вещества, состава ПФ, типа бумаги, температуры и продолжительности хроматографирования.

Хроматографическая бумага различается по степени гидратации и пористости, что обеспечивает разную скорость движения ПФ. Скорость движения растворителя зависит также от плотности и толщины бумаги и увеличивается с уменьшением плотности растворителя. Повышение температуры также приводит к увеличению скорости движения растворителя из-за уменьшения вязкости последнего.

Как и в случае ТСХ, существует несколько вариантов бумажной хроматографии, различающихся способом подачи растворителя: восходящий, нисходящий, горизонтальный и радиальный. В первых случаях на полоску хроматографической бумаги наносят микропипеткой пробу на расстоянии 1 см от нижнего края бумаги. При этом диаметр пятна не должен превышать 2 – 3 мм, т.к. чем меньше пятно, тем лучше разделение. Затем конец бумаги, на который нанесена проба, погружают в растворитель на 0.5 см (восходящая хроматография) или подают на него растворитель сверху (нисходящая хроматография). После прохождения растворителя через полоску бумаги ее вынимают, сушат и определяют положение отдельных компонентов аналогично методу ТСХ. В радиальной хроматографии капля анализируемого образца наносится в центре бумажного диска и туда же подается растворитель.

Радиальную хроматографию проводят в камере, состоящей из двух крышек чашек Петри равного диаметра, в одну из которых наливают растворитель, являющийся ПФ. На чашку с растворителем помещают

бумажный диск чуть большего диаметра с вырезанным "хвостиком" и нанесенной каплей анализируемой пробы, накрывая сверху второй чашкой. Так как скорость движения ПФ зависит от направления волокон бумаги, на получаемой хроматограмме наблюдаются пятна в виде эллипсов. Для обнаружения определяемых соединений диск разрезают на секторы и обрабатывают каждый сектор, проводя капилляром с соответствующим реагентом из центра диска по радиусу.

Возможно также проведение двумерной хроматографии, причем наиболее эффективным является применение двух различных ПФ, последовательно проходящих через бумагу в перпендикулярных направлениях.

Количественный анализ аналогичен методам, применяемым в ТСХ. Количество вещества определяют как по площади пятен, так и по интенсивности окраски, а также с помощью какого-либо метода количественного анализа после элюирования вещества из вырезанного участка бумаги.

## 5. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

При проведении работ методами тонкослойной и бумажной хроматографии необходимо соблюдать определенный порядок действий.

Предварительно небольшое количество смеси растворителей, используемой в качестве подвижной фазы, вносят в хроматографическую камеру для насыщения атмосферы камеры парами растворителя.

При проведении хроматографирования количество жидкости должно быть таким, чтобы нижний край полоски хроматографической бумаги или пластинки для ТСХ были погружены в растворитель на 0.3 – 0.5 см. При проведении анализа методом бумажной хроматографии, на полоске хроматографической бумаги проводят карандашом стартовую и финишную линии, для ТСХ линию старта можно нанести шпателем.

В середину стартовой линии наносят капилляром анализируемый раствор таким образом, чтобы диаметр пятна не превышал 5 – 7 мм. При этом не следует раствор капать, а необходимо прижать вертикально капилляр к бумаге, в этом случае капля будет меньше расплываться и хроматограмма будет более четкой.

После хроматографирования полоску либо пластину вынимают из камеры, высушивают. По табличным значениям  $R_f$  вычисляют  $x$  – высоту подъема зоны каждого определяемого соединения из анализируемой смеси. Для нахождения предполагаемого положения ананта на хроматограмме рассчитывают расстояние, пройденное веществом  $x$  по формуле:

$$x = R_f \times L \quad (7)$$

где  $R_f$  – хроматографическая подвижность,  $L$  - расстояние, пройденное растворителем. Полученное расстояние  $x$  откладывают от стартовой линии и отмечают зону, на которую необходимо нанести реагент-проявитель.

## 5.1 Лабораторная работа № 1

### Определение катионов металлов методом бумажной хроматографии

Для разделения катионов металлов методом одномерной восходящей бумажной хроматографии в качестве подвижной фазы применяют смесь соляная кислота - ацетон в соотношении 20:80, а в качестве проявителей – соответствующие реагенты.

**Выполнение работы.** На полоске хроматографической бумаги проводят карандашом стартовую и финишную линии на расстоянии 2 и 10 см от нижнего края бумажной полоски. В середину стартовой линии наносят капилляром анализируемый раствор и повторяют нанесение образца 5 раза.

Полоску хроматографической бумаги с нанесенной пробой надевают на крючок крышки цилиндра и опускают в цилиндр. Процесс хроматографирования продолжают до тех пор, пока растворитель не поднимется до финишной линии, находящейся на расстоянии 8 см от стартовой линии.

Обнаружение катионов проводят, обрабатывая зону каждого катиона соответствующим реагентом-проявителем. Капилляром с реагентом для обнаружения катиона прикасаются только к участку хроматограммы на высоте размещения зоны данного компонента. Появление характерной окраски подтверждает присутствие катиона в исследуемом растворе. При обнаружении ионов марганца, кобальта и хрома необходимо соблюдать следующие условия.

**Обнаружение марганца.** Соответствующий участок хроматограммы обрабатывают последовательно 2 М раствором NaOH и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, при этом образующийся Mn(OH)<sub>2</sub> быстро окисляется перекисью водорода до MnO(OH)<sub>2</sub>. Затем действуют каплей раствора бензидина, который окисляется под действием MnO(OH)<sub>2</sub>, в результате чего пятно синееет.

**Обнаружение кобальта.** Для проявления зоны, содержащей кобальт (II), на соответствующий участок наносят каплю насыщенного раствора NH<sub>4</sub>NCS

(комплекс  $\text{Co}(\text{NCS})_4^{2-}$  - неустойчив, поэтому рекомендуется брать избыток тиоцианата) и каплю ацетона. Образуется пятно синего цвета.

**Обнаружение хрома.** В пробирке готовят окислительную смесь, смешивая равные объемы 2 М раствора  $\text{NaOH}$  и 3% раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Каплю этой смеси наносят на соответствующий участок хроматограммы и прибавляют каплю бензидина. В присутствии хрома пятно синее.

**Обнаружение кадмия.** Участок хроматограммы, соответствующий зоне кадмия, подержать над парами концентрированного раствора аммиака, затем быстро нанести каплю раствора тиомочевина и подержать полоску над песчаной баней: в присутствии кадмия (II) появляется желтое пятно сульфида кадмия.

Таблица 3.

Реагенты-проявители для обнаружения катионов на хроматограмме

Катионы	$R_f$	Реагенты	Окраска зоны
$\text{Ni}^{2+}$	0.13	Диметилглиоксим, $\text{NH}_3$	Красный
$\text{Mn}^{2+}$	0.25	Смесь $\text{NaOH}$ и $\text{H}_2\text{O}_2$ , бензидин	Синий
$\text{Co}^{2+}$	0.54	насыщенный раствор $\text{NH}_4\text{NCS}$ или $\text{KNCS}$ , ацетон	Синий
$\text{Cu}^{2+}$	0.77	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Буро-красный
$\text{Pb}^{2+}$	0.70	$\text{KI}$	Желтый
$\text{Zn}^{2+}$	0.94	Дитизон	Красный
$\text{Cd}^{2+}$	1.00	Тиомочевина, $\text{NH}_3$	Желтый
$\text{Fe}^{3+}$	1.00	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Синий
$\text{Vl}^{3+}$	1.00	<i>o</i> -оксихинолин, $\text{KI}$	Оранжевый
$\text{Cr}^{3+}$	0.02	Смесь $\text{NaOH}$ и $\text{H}_2\text{O}_2$ , бензидин	Синий
$\text{Al}^{3+}$	0.15	Ализарин, $\text{NH}_3$	Розовый

## 5.2 Лабораторная работа № 2

### Определение аминокислот методом бумажной хроматографии

Для разделения аминокислот методом одномерной восходящей бумажной хроматографии в качестве подвижной фазы применяют смесь изопропанол – вода в соотношении 70:30, а в качестве проявителя – 0.2% раствор нингидрина в ацетоне.

**Выполнение работы.** На стартовую линию наносят капилляром раствор смеси аминокислот (концентрация 0.9 – 1.0 мг/мл) так, чтобы диаметр пятна не превышал 5 мм. Затем пятно подсушивают и повторяют нанесение образца 2–3 раза.

Проводят хроматографирование, вынимают бумажную полоску из камеры, высушивают в сушильном шкафу при температуре 70 – 80 °С, опрыскивают раствором нингидрина и высушивают до появления окрашенных зон. По параметрам, приведенным в таблице 4, проводят идентификацию аминокислот в смеси.

Таблица 4

Величины  $R_f$  и окраска пятен аминокислот на хроматограмме

Соединение	$R_f$	Окраска пятен
Лейцин	0.81	Фиолетовая
Валин	0.66	Фиолетовая
Пролин	0.53	Желто-синяя
Глицин	0.35	Фиолетовая
Лизин	0.10	Красно-фиолетовая

### 5.3 Лабораторная работа № 3

#### Применение бумажной хроматографии для определения фенолов

Для разделения фенолов методом одномерной восходящей бумажной хроматографии в качестве подвижной фазы применяют смесь изоамиловый спирт – ксилол – вода - ледяная уксусная кислота в соотношении 30:70:50:40, а в качестве проявителя – раствор диазотированной сульфаниловой кислоты.

Приготовление раствора диазотированной сульфаниловой кислоты: 0.5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 100 мл 1 М HCl, добавляют 100 мл 0.5% раствора KNO<sub>3</sub> и оставляют на 5 минут в 0.5 М раствор KOH в этаноле.

**Выполнение работы.** Предварительно атмосферу камеры в течение нескольких часов насыщают парами водного слоя растворителей, используемых в качестве подвижной фазы. На стартовую линию наносят 20 мкл раствора смеси фенолов (концентрация раствора фенола 1%) и хроматографируют в органическом слое вышеуказанной смеси растворителей. Затем бумажную полоску вынимают из камеры, высушивают и опрыскивают последовательно растворами диазотированной сульфаниловой кислоты и KOH. По параметрам, приведенным в таблице 5, проводят идентификацию фенолов в смеси.

Таблица 5

Величины  $R_f$  и окраска пятен фенолов на хроматограмме

Соединение	$R_f$	Окраска пятен
Фенол	0.96	Желтая
Пирокатехин	0.70	Розовая
Резорцин	0.58	Желтая
Гидрохинон	0.45	Коричневая
Пирогаллол	0.30	Желтая
Гидроксигидрохинон	0.11	Красно-коричневая

## 5.4 Лабораторная работа № 4

### Определение глицерина, этиленгликоля и 1,2-пропиленгликоля с помощью ТСХ

Для разделения применяют пластинки с силикагелем G, в качестве подвижной фазы используют смесь хлороформа, ацетона и 5 М аммиака в соотношении 10:80:10, а в качестве проявителя – аммиачный раствор нитрата серебра

Приготовление аммиачного раствора нитрата серебра: смешивают 5% раствор  $\text{AgNO}_3$  и 25 % раствор  $\text{NH}_3$  в соотношении 9:1.

**Выполнение работы.** На пластинку наносят раствор спиртов (примерная концентрация 5 и 10 % для трехатомного и двухатомного спиртов, соответственно) таким образом, чтобы диаметр пятна на старте не превышал 2 мм. Проводят хроматографирование, опрыскивают проявителем и сушат 15 минут при 100 °С. По параметрам, приведенным в таблице 6, проводят идентификацию спиртов. При наличии в смеси многоатомных спиртов наблюдаются темно-коричневые пятна на желто-коричневом фоне.

Таблица 6

Величины  $R_f$  и окраска пятен спиртов на хроматограмме

Соединение	$R_f$	Окраска пятен
1,2-Пропиленгликоль	0.85	Темно-коричневая
Этиленгликоль	0.70	Темно-коричневая
Глицерин	0.35	Темно-коричневая

## 5.5 Лабораторная работа № 5

### Количественное определение аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах методом ТСХ

Для определения применяют пластинки «Силуфол». В качестве ПФ используют смесь состава: этилацетат – ацетон – уксусная кислота – этанол – вода (5:3:1:1:2). Идентификацию зон проводят визуальным путем после нагревания пластин при 120 °С в течении 5 – 7 мин до появления бурых пятен, соответствующих окисленной форме аскорбиновой кислоты.

**Выполнение работы.** К точной навеске фармацевтического препарата, растворенного в порошок, постепенно приливают 5 % раствор уксусной кислоты в кратном соотношении к навеске (не менее 3 мл на 1 г навески). После растирания смесь настаивают в ступке в течении 10 мин. После настаивания, содержимое ступки количественно переносят в мерную колбу емкостью 25 мл. Допускается непосредственное перенесение навесок хорошо растворяющихся объектов в мерную колбу для растворения в ней и настаивания. После этого содержимое колбы перемешивают и фильтруют через фильтр для просветления. Полученные растворы хранят на холоду в темной посуде.

На пластине «Силуфол» карандашом проводят линию старта на расстоянии 1.5 см от края и на расстоянии 13 см от линии старта наносят финишную линию.

Для построения градуировочного графика на линию старта хроматографической пластины с помощью микрошприца наносят 1, 2, 3, 4, 5, 10 мкл стандартного раствора аскорбиновой кислоты (5 мг/мл) и 1 – 5 мкл раствора фармпрепарата.

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

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

Полученный график используют для определения аскорбиновой кислоты в различных фармацевтических препаратах.

## 6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ:

1. Место хроматографии в современной химии.
2. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы метода.
3. Классификация методов ТСХ по способу подачи растворителя.
4. Классификация методов ТСХ в зависимости от режима подачи элюента.
5. Бумажная хроматография. Сходство и отличия с методом ТСХ.
6. Методы визуализации положения зон соединений на хроматограммах.
7. Величина  $R_f$  и ее связь с коэффициентом распределения. Методы определения  $R_f$ . Факторы, влияющие на  $R_f$ .
8. Подложки и сорбенты для ТСХ.
9. Растворители для ТСХ.
10. Методы качественного и количественного анализа в ТСХ.
11. Идентификация веществ на основе параметров удерживания в ТСХ и бумажной хроматографии.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**

### **Основная литература**

1. Стойков И.И., Основы хроматографии / И.И. Стойков, Е.Е. Стойкова. – Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2010. — 178 с.
2. Золотов, Ю.А. Введение в аналитическую химию: учебное пособие / Ю. А. Золотов. – 2. изд. – Москва: Лаборатория знаний, 2020. – 266 с. Текст: электронный: <https://e.lanbook.com/book/151516>.

### **Дополнительная литература**

1. Сальникова, Е. В. Хроматографические методы анализа : методические указания / Е. В.Сальникова, Е. А. Осипова. – Оренбург: ОГУ, 2019. – 63 с. Текст: электронный: <http://elib.osu.ru/handle/123456789/12262>
2. Сумина Е.Г. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение: учебное пособие / Е.Г. Сумина, С.Н. Штыков, Н.В. Тюрина. – 2. изд., доп. Саратов: Издательство Саратовского университета, 2006. – 128 с. Текст: электронный <https://viewer.rsl.ru/ru/rsl01002959586>
3. Вергун, О.М. Хроматографические методы анализа: практикум для студентов фармацевтического факультета / О.М. Вергун, Н.Д. Яранцева. – Минск: БГМУ, 2018. – 30 с. Текст: электронный: <https://rep.bsmu.by/handle/BSMU/20068>

### **Благодарности**

Авторы выражают благодарность д.х.н., профессору Стойкову И.И. и к.х.н. Стойковой Е.Е. за помощь при написании настоящего учебно-методического пособия и за предоставленный научный материал.