

МЕТОДЫ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

В практике химико-токсикологического анализа используются различные методы аналитической химии, обеспечивающие разделение компонентов и очистку от сопутствующих веществ (белки, липиды, аминокислоты, жиры и др.) Наибольшее применение нашли следующие методы: жидкость-жидкостная экстракция, различные виды адсорбционной и распределительной хроматографии, перекристаллизация, переосаждение, перегонка, возгонка и другие.

Жидкость-жидкостная экстракция. Как правило, при проведении экстракции подбирают систему растворителей с ограниченной смешиваемостью компонентов, в которых распределяемое вещество растворяется в различной степени. Чем сильнее отличаются два растворителя по химической природе, тем обычно шире интервал, в котором эти растворители не смешиваются. В химико-токсикологическом анализе биологических объектов выбор системы не смешивающихся фаз несколько ограничивается тем, что одним из растворителей является вода. Поэтому при проведении «направленного» химико-токсикологического анализа, т.е. для изолирования конкретного соединения с хорошим фактором извлечения, можно выбрать экстрагент, пользуясь табличными данными значений K_r - коэффициента распределения. Под коэффициентом распределения подразумевается отношение концентрации вещества, растворенного в органическом растворителе, не смешивающимся с водой, к концентрации вещества, растворенного в воде.

На практике чаще всего встречаются следующие органические фазы, не смешивающиеся с водой: хлороформ, дихлорэтан, бензол, толуол, эфир и другие. Например, при экстрагировании водной вытяжки из биологического материала петролевым или диэтиловым эфиром, происходит отделение жиров и липидов из водной фазы, а при экстракции водной фазы хлороформом при $pH \approx 1,0 - 2,0$ или $9,0 - 10,0$ происходит разделение барбитуратов от алкалоидов и наоборот.

Если коэффициент распределения K_r между органической фазой и водой для какого-либо вещества известен, а также известны объемы этих двух растворителей, то легко вычислить, сколько изначально взятого вещества останется в водном растворе после каждой операции экстрагирования.

Иногда для экстрагирования могут применяться смеси органических растворителей. Например, смесь хлороформа и изопропанола в соотно-

Мишин 3:2 используется для извлечения кокаина из водной вытяжки.

В современном химико-токсикологическом анализе экстракция является одним из основных методов выделения алкалоидов и других токсических веществ (кислоты, щелочи, пестициды) из вытяжек биологических жидкостей (моча, кровь, промывных вод желудка) и ряда других объектов.

Для каждого алкалоида, пестицида (и других ядов) имеется область **ЧИИМ** pH , при которой они экстрагируются не смешивающимися с водой органическими растворителями в максимальных количествах. Область максимума экстракции отдельных алкалоидов зависит от природы органических растворителей. Известны алкалоиды (кокаин, кофеин, наркотин, теобромин и др.), максимум экстракции которых находится в кислой среде или на границе кислой и щелочной сред. Однако в определенных количествах эти алкалоиды экстрагируются и из щелочной среды. Алкалоиды, максимум экстракции которых находятся в щелочной среде, частично экстрагируются и из кислой среды. Ряд пестицидов экстрагируются из биологического материала (с понижением или подщелачиванием).

4.1.1. Методы экстракции

В современном химико-токсикологическом анализе метод **экстракции** широко используется для изолирования токсических веществ из объектов биологического происхождения, для очистки вытяжек из биологического материала от примесей, для выделения токсических веществ из предварительно очищенных вытяжек. Этот метод применяется для обнаружения ядовитых веществ, при помощи некоторых качественных реакций, для количественного определения этих веществ экстракционно-фотометрическими методами, для концентрирования исследуемых веществ, находящихся в сильно разбавленных растворах и (или) ряда других целей.

Экстракция - процесс извлечения растворителями соответствующих веществ из различных объектов. Объекты, из которых извлекают соответствующие соединения, могут быть твердыми веществами и жидкостями. Поэтому процессы извлечения подразделяют на экстракцию в системе *твердое тело - жидкость* и на экстракцию в системе *жидкость - жидкость* (жидкостную экстракцию).

Для экстракции веществ в системе *твердое тело - жидкость* в качестве экстрагентов применяют органические растворители. Извлечения соответствующих веществ из твердых тел водой называются выщелачиванием.

В химико-токсикологическом анализе метод экстракции в системе *твердое тело - жидкость* и метод выщелачивания применяются для изолирования исследуемых веществ (целевых компонентов) из органов, тканей, растений, почвы и других объектов.

Процесс экстракции (выщелачивания) целевых материалов из биологического материала является многостадийным. Основными стадиями этого процесса являются: проникновение экстрагента в клетки и ткани трупного материала и в другие объекты, в которых находится исследуемое вещество; растворение целевого компонента в экстрагенте или взаимодействие целевого компонента с экстрагентом в клетках и тканях биологического материала; перенос растворенного целевого компонента через оболочки клеток в межклеточное пространство и смешивание извлеченных из клеток веществ с основной массой экстрагента.

Степень изолирования исследуемых веществ из биологического материала зависит от следующих факторов

- растворимости извлекаемых веществ в экстрагенте;
- структуры (пористости) биологического материала:
- «проникающей способности экстрагентов в клетки и ткани биологического материала;
- степени его измельчения;
- интенсивности перемешивания смеси измельченного биологического материала и экстрагента;
- кратности настаивания биологического материала с экстрагентом.
- температуры, pH среды и ряда других факторов.

Влияние отдельных, перечисленных выше факторов на изолирование токсических веществ из биологического материала приводится ниже

Жидкость-жидкостная экстракция - процесс распределения растворенного вещества между двумя не смешивающимися жидкими фазами, одной из которых в большинстве случаев является вода, а второй - не смешивающийся с водой органический растворитель.

Извлечение вещества из фазы органического растворителя в водную фазу называется *реэкстракцией*.

Некоторыми преимуществами метода экстракции объясняется широкое применение его не только в токсикологической химии, но и в химической технологии, фармации, биохимии и т.д. При использовании методов экстракции не происходит химическое превращение разделяемых веществ, и не образуются побочные продукты. Вещества выделенные с помощью метода экстракции, как правило, не содержат примесей, связанных с процессами адсорбции и окклюзии. Этот метод оп- (ЮИДываег себя при разделении термолabileльных веществ. Использо- ипние метода экстра кии и для концентрирования позволяет переводить ивщества из сильно разбавленных растворов в небольшой объем орга- нического растворителя.

Переход экстрагируемого вещества из одного растворителя в дру- Ш11 происходит в результате разности концентраций и не одинаковой ИСТпоримости этого вещества в обоих растворителях. Исследования (Цкпзали, что экстрагируем ость химических соединений зависит от ра- створимости их в воде и в не смешивающихся с водой органических Цвегиорителях. применяемых для экстракции Подтверждением этого милмегся то, что коэффициент распределения некоторых веществ, при- близительно равен отношению их растворимости в органическом ра- шширителе и в воде.

Органические растворители, которые применяются для экстракции н!|) нических соединений, оказались не пригодными для экстракции Поиышого числа неорганических соединений. Поэтому сделаны попыт- ки, найти подходящие экстрагенты для извлечения неорганических со- чинений из водных растворов. Произведенные исследования показа- |ц, что для экстракции неорганических соединений в качестве экстра- нч1)тов с успехом могут быть использованы некоторые карбоновые и

■ \ифоновые кислоты, отдельные фосфорорганические соединения, вы- ■ окомолекулярные амины, соли четвертичных аммониевых оснований н чр Эти вещества при экстракции взаимодействуют с неорганически- МИ соединениями и их ионами Кроме перечисленных соединений в ка- Ч1\ тве экстрагентов для ионов металлов предложены так называемые капотирующие агенты (вещества, растворы которых с ионами метал - ЮН образуют хелаты). К числу хелатирующих агентов относятся: куп- фрон, 8-оксихинолин, дитизон, дитиокарбаматы и др.

В связи с применением перечисленных выше веществ, для экстрак- ции неорганических соединений и их ионов изменилось представление |/> жстрагентах. В настоящее время под экстрагентом понимают орга- нический растворитель (содержащий или не содержащий другие ком- поненты), который извлекает вещество из водной фазы. Составная часть экстрагента, химически взаимодействующая с извлекаемым ве- ществом, называется *реагентом*,

В зависимости от состава и свойств экстрагентов экстракционные системы подразделяются на две группы.

К первой группе относятся экстракционные системы с так называемым «физическим» распределением компонентов. В этих системах отсутствует химическое взаимодействие между экстрагентом (органическим растворителем) и экстрагируемыми веществами. Различная растворимость некоторых веществ, а, следовательно, и неодинаковая экстрагируемость их объясняются физическими свойствами этих веществ и экстрагентов (дипольный момент, диэлектрическая проницаемость и др.)

Свойства некоторых органических растворителей, применяемых в качестве экстрагентов, приведены в таблице 4.1,

Во второй группе растворителей относятся экстракционные системы, в которых экстракция осуществляется за счет химического взаимодействия извлекаемых веществ с экстрагентами. Эффективность разделения веществ в таких системах зависит от прочности образующихся соединений или комплексов. Эти экстракционные системы используются для извлечения неорганических веществ.

Экстракция с помощью экстрагентов, взаимодействующих с экстрагируемыми веществами, является более сложным процессом, чем экстракция, основанная на физическом распределении. При использовании экстрагентов, взаимодействующих с экстрагируемыми веществами, процессы экстракции могут осложняться побочными реакциями. В ряде случаев одновременно может происходить экстракция нескольких различных соединений.

Таблица 4

Свойства некоторых органических растворителей, применяемых для экстракции (по И. М. Коренману, 1977)

Растворитель	D ₄ ²⁰	ρ ₄ ²⁰	n _D ²⁰	n _D ²⁵	Растворимость при 20°C	
					в воде, % (мас)	в экстрагенте, г/100 мл
Н-Амилацетат	0,875	149,2	1,475	1,91	0,79	0,18
Н-пентанол	0,814	138,5	13,9	1,80	9	2,7
Бензол	0,874	80,1	2,28	0,00	0,054	0,082
Н-Бутанол	0,813	117,7	17,1	1,68	20,5	7,9
Н-Гексан	0,659	68,7	1,89	0,00	0,072	0,014
Н-Гептан	0,684	98,5	1,92	0,00	0,015	0,005
1,2-Дихлорэтан	1,257	83,5	10,36	2,06	0,15	0,87
диэтиловый эфир	0,719	34,5	4,34	1,15	1,47	6,5
Изо-пентано*	0,813	132,0	14,7	1,82	1,79	2,67
Изо-бутанол	0,817	107,9	17,7	1,79	16,9	9,5
Сероуглерод	1,262	46,3	2,64	0,00	0,005	0,22
Хлороформ	1,489	6 и	4,80	1,15	0,072	0,8
4-хлор углерод	1,595	76,7	2,24	0,00	0,01	0,08
Этилацетат	0,901	112	6,02	1,81	3,3	8,6

4.1.2. Основные количественные характеристики процессов экстракции

При рассмотрении того, что экстракция как метод разделения длительное время применяется в аналитической химии и химической технологии, теоретические основы этого метода долгое время оставались неизученными. В частности оставались неизученными основные количественные характеристики экстракционных процессов, что было определено

ным препятствием для широкого внедрения экстракции в практику. Для рйсчста количества вещества, которое экстрагируется органическими рис гворителями, необходимо знать константу и коэффициентраспреде- ния, степень экстракции и т.д.

М Бергло и Ю Юнгфлейш были первыми исследователями, кото- 1Н.1С в 1872 г. на основании экспериментальных данных показали, что <ч ношение равновесных концентраций вещества, распределяющегося между двумя жидкими фазами, является постоянным. Это отношение термодинамическим путем было выведено В Нернстом, который в 1НО| г. сформировал закон *распределения*.

(опасно такому распределения, вещество, растворенное в двух не • ишвивающихся или ограниченно смешивающихся жидкостях, распре- имается между ними в постоянном отношении. Это отношение для н шальных систем зависит только от температуры, природы вещества н нс зависит от концентрации

Из этого закона следует, что при одновременном растворении нс- ■ кольких веществ, каждое из них распределяется между обеими жид- кими фазами таким образом, как будто в системе нет никаких других тществ, подлежащих распределению Закон распределения справед- нн1 лишь в том случае, если распределяемое вещество в обеих фазах ничодится в одной и той же форме.

Числовое значение распределения вещества является постоянной не шчиной, которое выражает отношение концентрации распределяемого т'щества, находящегося в обеих фазах (после наступления равновесия) к одной и той же форме и называется оно *константой распределения*:

Фориула

! Г константа распределения; $[A]_0$ - концентрация вещества в фазе <|ч инического растворителя, моль/л; $[A]_в$ - концентрация вещества в вод- Н'фазе, моль/л.

Неличина константы распределения зависит от природы распреде ляемого вещества, состава и свойств, применяемого экстрагента. Ис I пературы. при которой производится экстракция. Эта константа не м висит от равновесных концентраций экстрагируемого вещества и оГп сч мов водной и неводной фаз Числовое значение константы распределе ния можно вычислить и подругой формуле (9), исходя из величины С|| пени экстракции соответствующего вещества и объемов жидких фа 11

Коэффициент распределения. При расчетах константы распре! деления вещества по формуле (1) необходимо быть у веренным в тощ что распределяемое вещество в обеих фазах находится в одинаковое форме (в одинаковом молекулярном состоянии). Однако во многих >к! стракционных системах не соблюдается указанное выше условие П одной из жидких фаз могут происходить диссоциация, сольватация, гид! ролиз распределяемого вещества, образование комплексов и т.д. Д;А расчетов экстракционных равновесий в таких системах не принимаю! во внимание форму су ществования вещества в каждой фазе, а учит! вают только отношение суммарных (аналитических) концентраций р;щ| распределяемого вещества в обеих фазах.

На основании определения суммарных концентраций можно расечИ' тать не константу, а коэффициент распределения данного вещества в при меняемой системе растворителей (вода - органический растворитель)!

Коэффициент распределения - это отношение суммарной анали« тической концентрации вещества в фазе органического растворителя» суммарной аналитической концентрации этого вещества в водной фа« (без учета того, в какой форме находится вещество в каждой фазе): I

$$Г) = e_0 / C_в, \quad (21)$$

где О - коэффициент распределения; C_0 - суммарная аналитическая концентрация вещества в фазе органического растворителя, моль/л; С|

- суммарная аналитическая концентрация вещества в водной фазе, моль/л.

Степень экстракции. Степень экстракции (процент экстракции) это отношение количества экстрагированного вещества к общему (начальное) количеству этого вещества в водном растворе:

$$K = \frac{A}{N} \cdot 100, \quad (3)$$

где K - степень экстракции вещества, %; A - количество вещества, которое экстрагировалось органическим растворителем. N - общее (начальное) количество вещества в водном растворе.

Количество вещества A, которое экстрагируется органическим растворителем, можно определить экспериментальным путем, применив

метод количественного определения. Зная начальное количество вещества и количество этого вещества, перешедшего в органический растворитель, рассчитывают степень экстракции.

Степень экстракции вещества можно определить не только экспериментальным путем, но и путем соответствующих расчетов, зная коэффициент распределения вещества а также отношение (L) водной фазы и фазы органического растворителя. Степень экстракции с указанными величинами связана следующим соотношением:

$$K = P \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot 100$$

где K — степень экстракции; P константа распределения; V₁ - объем водной фазы, мл; V₂ - объем фазы органического растворителя, мл.

В формуле (4) отношение объема водной фазы к объему фазы органического растворителя заменяют величиной γ:

$$K = P \cdot \gamma \cdot 100, \quad (5)$$

* Объем органического растворителя, необходимого для экстракции, (рассчитывают по формуле:

$$V_0 = Y_0 / \gamma, \quad (6)$$

После соответствующего преобразования формулы (4) степень экстракции рассчитывают по уравнению

$$K = P \cdot \gamma \cdot 100$$

$$\gamma = \frac{K}{P \cdot 100}$$

метод количественного определения. Зная начальное количество вещества и количество этого вещества, перешедшего в органический растворитель, рассчитывают степень экстракции.

Степень экстракции вещества можно определить не только экспериментальным путем, но и путем соответствующих расчетов, зная коэффициент распределения вещества а также отношение (L) водной фазы и фазы органического растворителя. Степень экстракции с указанными величинами связана следующим соотношением:

$$K = P \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot 100$$

где K — степень экстракции; P константа распределения; V₁ - объем водной фазы, мл; V₂ - объем фазы органического растворителя, мл.

В формуле (4) отношение объема водной фазы к объему фазы органического растворителя заменяют величиной γ:

$$K = P \cdot \gamma \cdot 100, \quad (5)$$

* Объем органического растворителя, необходимого для экстракции, (рассчитывают по формуле:

$$V_0 = Y_0 / \gamma, \quad (6)$$

После соответствующего преобразования формулы (4) степень экстракции рассчитывают по уравнению

$$K = P \cdot \gamma \cdot 100$$

$$\gamma = \frac{K}{P \cdot 100}$$

Бели известна степень экстракции К и отношение объемов фаз г, то константу распределения P_0 можно рассчитать при помощи следующего уравнения:

$$P_0 = \frac{K \cdot \gamma}{g} \quad (9)$$

На основании числовых значений константы распределения и степени экстракции можно рассчитать ряд других количественных характеристик процессов экстракции.

Ниже мы приведем несколько примеров расчетов ряда количественных характеристик экстракционных процессов неэлектролитов, к числу которых относятся многие органические соединения, имеющие значение в фармации и токсикологии.

Механизм процесса экстракции. Согласно теории растворов, растворение вещества в воде или органических растворителях сопровождается образованием малопрочных соединений молекул этого вещества с молекулами растворителя. Если растворителем является вода, то в растворе образуются гидраты, а если растворителем является органический растворитель, то в растворах образуются сольваты молекул растворенного вещества. Гидраты и сольваты молекул являются малопрочными.

При взбалтывании водного раствора вещества с органическим растворителем, который не смешивается с водой, гидратная оболочка молекул растворенного вещества разрушается. Молекулы воды в гидратной оболочке замещаются молекулами органического растворителя, в результате чего образуются сольваты молекул растворенного вещества, которые легко переходят в органический растворитель. Хорошо экстрагируются молекулы тех веществ, сольваты которых в фазе органического растворителя являются более прочными, чем гидраты этих молекул в воде.

Более сложными являются процессы экстракции электролитов, которые в водных растворах частично или полностью распадаются на ионы. Ионы, несущие определенный заряд, хорошо гидратируются диполями воды. Связь ионов с диполями воды относительно прочная. Поэтому ионы, имеющие прочные гидратные оболочки, остаются в водной фазе и не экстрагируются органическими растворителями. Ими могут экстрагироваться только недиссоциированные молекулы соответствующего вещества. Это необходимо учитывать при экстракции органических веществ, являющихся слабыми электролитами. Степень экстракции этих веществ зависит от pH среды. С изменением pH раствора изменяется степень диссоциации молекул, следовательно, изменяется и относительное количество недиссоциированных молекул вещества. С увеличением количества недиссоциированных молекул увеличивается степень экстракции слабых электролитов и наоборот.

Экстракция органических кислот. Недиссоциированные молекулы органических кислот в водных растворах электронейтральны и слабо гидратируются молекулами воды. При контакте водных растворов с органическими растворителями электронейтральные молекулы кислоты легко сольватируются, и поэтому переходят в слой органического растворителя.

Из формулы (7) можно рассчитать величину г:

$$g = \frac{P_n \cdot (100 - Y)}{\dots}$$

Ионы, образующиеся в водных растворах при диссоциации слабых кислот, имеют

соответствующие заряды, и поэтому легко гидратируются диполями воды. Связь молекул воды с ионами кислоты относительно прочная. Поэтому такие ионы слабо сольватируются молекулами органических растворителей и не экстрагируются органическими растворителями из водных растворов.

Изменение концентрации водородных ионов в водной фазе приведет к относительному увеличению или уменьшению количества недиссоциированных молекул, следовательно, и к изменению экстрагируемости кислоты.

С повышением pH (т.е. с уменьшением концентрации водородных ионов в водном растворе) увеличивается диссоциация кислоты в растворе, что приводит к уменьшению её недиссоциированных молекул. В результате этого понижается экстрагируемость слабой кислоты органическими растворителями из таких растворов.

При повышении концентрации водородных ионов (т.е. с понижением $pH > 11$) в водном растворе увеличивается число молекул недиссоциированной кислоты, следовательно, возрастает его экстрагируемость органическими растворителями. При значительном повышении концентрации водородных ионов в одном растворе слабую кислоту практически полностью можно перевести в недиссоциированное состояние и этим повысить его экстрагируемость.

Экстракция оснований. Многие органические основания, к числу которых относятся алкалоиды и их многочисленные синтетические аналоги, являются фармацевтическими препаратами. Эти основания в нейтральной среде находятся в недиссоциированном состоянии. При действии кислот на органические основания образуются их соли, которые в водных растворах диссоциируют на ионы.

Недиссоциированные молекулы органических оснований слабо гидратируются молекулами воды, но хорошо сольватируются молекулами органических растворителей. Поэтому недиссоциированные

молекулы | органических оснований хорошо экстрагируются из водных растворов органическими растворителями.

Ионы, образующиеся при диссоциации солей органических оснований, хорошо гидратируются молекулами воды и слабо сольватируются молекулами органических растворителей. Поэтому соли органических оснований (за небольшим исключением) не экстрагируются органическими растворителями.

Органические основания являются слабыми электролитами. Степень диссоциации их зависит от pH среды. От прибавления кислот к органическим основаниям они переходят в соли. При этом увеличивается количество ионов и уменьшается количество недиссоциированных молекул, следовательно, уменьшается степень экстракции (эти) веществ органическими растворителями. От прибавления щелочей солям органических оснований уменьшается количество ионов и увеличивается количество недиссоциированных молекул этих оснований. В результате этого, в щелочной среде увеличивается степень экстракции органических оснований.

Экстракция амфотерных соединений. К числу амфотерных соединений, имеющих токсикологическое значение, относятся вещества в молекулах которых содержится аминный азот и фенольные группы (морфин, соли и др.), а также соединения, содержащие аминный азот и карбоксильную группу (аминокислоты и др.). Эти соединения м зависимость от pH среды диссоциируют как основания (в кислой среде) и как кислоты (в щелочной среде). Экстракция амфотерных соединений зависит от pH среды, так как при изменении pH изменяется количество ионов и недиссоциированных молекул амфотерных соединений. Амфотерные соединения, находящиеся в молекулярном состоянии, экстрагируются органическими растворителями. Ионы амфотерных соединений хорошо гидратируются молекулами воды и почти не экстрагируются органическими растворителями.

Наибольшее количество амфотерных соединений экстрагируются при pH, соответствующем изоэлектрической точке этих веществ. Это объясняется тем, что в изоэлектрической точке молекулы амфотерных соединений не имеют электрического заряда.

4.1.3. Влияние различных факторов на экстракцию.

На экстракцию веществ органическими растворителями оказывают влияние различные факторы (природа экстрагируемого вещества, природа экстрагента, температура, pH среды, присутствие электролитов в водных растворах, скорость взбалтывания и др.).

Влияние температуры на экстракцию. Изменение температуры влияет на константу распределения экстрагируемого вещества. Экстракция объясняется тем, что при изменении температуры изменяется растворимость экстрагируемых веществ в каждой фазе, а также изменяется взаимная растворимость органической и водной фаз. Причем с изменением температуры растворимость вещества в каждой фазе изменяется неодинаково. Это является одной из причин изменения константы! распределения вещества при изменении температуры

При изменении температуры может изменяться диссоциация и сольватация вещества в соответствующей фазе. Поэтому при изменении температуры изменяется гидратация (сольватация) и экстрагируемость химических соединений.

Влияние pH среды на экстракцию. Экстрагируемость органических веществ зависит от ряда факторов, в том числе и от pH среды. Количество экстрагированного вещества зависит от диссоциации его в **миной** фазе. Это связано с тем, что недиссоциированные молекулы вещества и его ионы неодинаково экстрагируются с органическими растворителями из водных растворов. При экстракции недиссоциированные молекулы переходят в органическую фазу, а ионы, которые хорошо гидратированы молекулами воды, остаются в водной фазе. Поэтому сильные электролиты, хорошо диссоциирующие в воде на ионы, не экстрагируются органическими растворителями.

Влияние электролитов на экстракцию. Прибавление хорошо растворимых солей к водному раствору другого вещества может понизить или повышать его растворимость в воде. Понижение растворимости веществ в водных растворах под влиянием электролитов называется *высаливанием*, а повышение растворимости - *всаживанием*.

Высаливание является фактором, понижающим растворимость веществ в воде и повышающим их экстрагируемость органическими ра-

- торителями из водных растворов.

Высаливающее действие электролитов зависит от природы и свойств высаливаемого вещества, от природы и свойств высаливателя. Концентрация и радиуса ионов высаливателя и т.д. Ионы высаливателя с малым радиусом имеют большую плотность заряда, чем ионы с большим радиусом. Поэтому ионы с малым радиусом гидратируются лучше, чем ионы с большим радиусом. В связи с этим высаливающее действие ионов с малым радиусом больше, чем высаливающее действие

- тис крупных ионов. Однако это правило имеет ряд исключений.

Установлено, что высаливающим действием обладают и некоторые широко растворимые в воде неэлектролиты. Так, например, этиловый

- спирт хорошо высаливает уксусную кислоту из ее водных растворов при экстракции этой кислоты этилацетатом и т.д.

Вещества, проявляющие свойства высаливателей, применяются для повышения растворимости слабо-растворимых веществ в воде. Известны несколько теорий, объясняющих процесс высаливания. Согласно одной из них, высаливание объясняется химическим взаимодействием высаливателей и высаливаемых веществ в экстракционных системах. В результате этого могут образовываться соединения или комплексы, широко растворимые в воде, которые не экстрагируются органическими растворителями.

Требования, предъявляемые к органическим растворителям для экстракции. К органическим растворителям, применяемым для экстракции, предъявляется ряд требований.

- Органический растворитель должен хорошо извлекать исследуемое вещество из водной фазы.

• Желательно, чтобы применяемый растворитель был избирательным или селективным. Он должен извлекать из растворов только одно вещество или группу родственных соединений.

- Растворитель должен иметь незначительную растворимость в воде, а вода не должна заметно растворяться в этом растворителе.

При использовании для экстракции органических растворителей. [Растворяющихся в воде или растворяющих воду, конечные объемы фаз] после взбалтывания не будут равны начальным объемам этих фаз. Это может быть источником ошибок при расчетах константы и коэффициента распределения, а также при вычислении степени экстракции. Чтобы исключить возможные ошибки при расчетах, органический растворитель насыщают водой, а воду - органическим растворителем. Только

- Органический растворитель по возможности не должен быть низкотемпературным. Температура кипения растворителя должна быть выше 50°C. Низкотемпературные органические растворители даже при комнатной температуре быстро улетучиваются. Поэтому при экстракции их объемы уменьшаются, а концентрация экстрагированных веществ в их растворителях увеличивается. Это может быть одним из источников ошибок

- При расчетах константы или коэффициента распределения экстрагируемого вещества. Однако низкая температура кипения органических растворителя является положительным фактором с точки зрения удаления и регенерации их после экстракции.

- Плотность органических растворителей по возможности должна отличаться от плотности воды и водных растворов. Если иметь большую разность плотностей указанных жидкостей, то разделение фаз происходит быстро.

- Растворители не должны быть огнеопасными и ядовитыми.

Есть и другие требования, предъявляемые к растворителям.

4.2.1. Методы хроматографии

Методы хроматографии широко используются в научных и практических лабораториях для разделения смесей веществ, очистки, идентификации и количественного определения различных химических соединений.

Под термином *хроматография* понимают совокупность методов разделения веществ между двумя фазами, из которых одна фаза является подвижной, а другая - неподвижной. Разделение веществ при помощи методов хроматографии достигается благодаря тому, что компоненты смесей вместе с подвижной фазой перемещаются через слой неподвижной фазы со скоростью, зависящей от сил взаимодействия каждого компонента с одной и

другой фазы. Различие в величинах этих взаимодействий приводит к разности в скоростях движения компонентов через слой неподвижной фазы, в результате чего достигается их разделение.

В настоящее время известно множество модификаций методов хроматографии. Эти методы подразделяются в зависимости от природы сил взаимодействия компонентов смеси с подвижной и не подвижной фазами, от агрегатного состояния фаз, от способа проявления хрома- ГОГрамм и т.д.

В зависимости от природы сил взаимодействия разделяемых веществ с подвижной и неподвижной фазами, хроматография подразделяется на адсорбционную, распределительную, ионообменную, осадочную и т.д.

Учитывая агрегатное состояние фаз, принимающих участие в разнесении веществ, хроматографию подразделяют на жидкостно-адсорбционную (неподвижная фаза - твердое вещество, подвижная - жидкость), жидкость-жидкостную (обе фазы-жидкости), газо-адсорбционную (неподвижная фаза - твердое вещество, подвижная - газ) и газожидкостную (неподвижная фаза - жидкость, подвижная - газ)

В зависимости от способа проявления (способа перемещения разделяемой смеси вдоль сорбента) хроматография подразделяется на пропускную (элюиционную), фронтальную и вытеснительную

Существуют другие классификации методов хроматографии. Рассмотрим более подробно классификацию, которая базируется на учете природы явлений, вызывающих разделение веществ

Молекулярная адсорбционная хроматография разработана М. С. Целиным в 1903 г. и базируется на избирательной адсорбции (поглощении) компонентов смеси определенным адсорбентом.

Распределительная хроматография впервые предложена А. Мар- Ином и Р Сингом в 1941 г. С помощью этого метода они успешно разделяли смесь ацетилированных аминокислот на компоненты.

Метод распределительной хроматографии основан на различном распределении компонентов смеси между двумя несмешивающимися растворителями. Один из этих растворителей (чаще всего вода) находится в порах твердого носителя и является неподвижной жидкой фазой, а другой - подвижной фазой. Чтобы произошло разделение веществ компоненты смеси должны различаться по величине коэффициента распределения (O) между двумя несмешивающимися (подвижной и неподвижной) жидкими фазами (см. метод экстракции). Числовые значения этих коэффициентов можно определить по формуле:

$$O = \frac{C_{\text{неподв}}}{C_{\text{подв}}}$$

где O - коэффициент распределения; C

подвижной фазе, моль/л, C

подвижной фазе, моль/л.

Поскольку компоненты смеси имеют разные коэффициенты распределения, то скорость передвижения их при разделении тоже будет неодинаковой. Наибольшей подвижностью обладает компонент, имеющий наибольший коэффициент распределения.

С помощью метода распределительной хроматографии успешно разделяются вещества, не адсорбируемые носителем и коэффициенты распределения которых существенно отличаются друг от друга. Если с распределением компонентов смеси между подвижной и неподвижной фазами происходит взаимодействие разделяемых веществ с носителем, то зоны этих веществ на хроматограммах перекрываются, и полнота разделения не достигается.

Известно несколько вариантов метода распределительной хроматографии. Разделение веществ можно производить в колонках, на бумаге и т. д. Варианты метода разделения отличаются друг от друга выбором носителя для неподвижной фазы и техникой эксперимента.

В аналитической практике широко используется метод хроматографии на бумаге, предложенный Консденом, Гордоном и Мартином в 1944 г. При разделении веществ этим методом в качестве твердого носителя применяют листы или полоски фильтровальной бумаги.

Ионообменная хроматография основана на использовании ионообменных процессов, протекающих между ионами сорбента и ионами исследуемых веществ, находящихся в растворах. Сорбенты, которые содержат подвижные ионы, легко обмениваются на ионы электролитов. называются *ионообменными*.

Осадочная хроматография. Метод осадочной хроматографии предложили советские ученые Е. Н. Гапон и Т. Б. Гапон в 1948 г. Метод основан на последовательном (фракционном) осаждении исследуемых веществ, находящихся в смесях, реактивами, которые в хроматографической колонке смешаны с носителем.

Приведенная краткая характеристика отдельных методов хрома-

ГОГрафии показывает что механизм процессов разделения веществ с НЧ помощью может быть различным. Следует отметить, что в ряде случаев разделение веществ методом хроматографии достигается в (НМультате не одного, а нескольких процессов (механизм). Это приводит к образованию хроматограмм смешанного типа.

Несмотря на образование хроматограмм смешанного типа один МП механизмов разделения веществ на хроматограммах остается доминирующим

4.2.2. Метод хроматографии в тонком слое сорбента

В химико-токсикологическом и фармацевтическом анализах наиболее часто применяется метод хроматографии в тонком слое сорбента, «Первые предложенный советскими учеными Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер в 1938 г. С помощью этого метода Н. А. Измайлов и М. С. Шрайбер разделили ряд физиологически активных соединений, еодсржащихся в настойках из лекарственных растений.

Разделение веществ осуществляется на пластинках, покрытых тонким слоем сорбента (силикагель, оксид алюминия и др.). На пластинку нпносят каплю смеси исследуемых веществ и помещают ее в камеру, МИ дно которой (или в отдельный лоток) налита система растворителей. Под влиянием капиллярных сил система растворителей поднимается **НО** пластинке. При этом нанесенные на пластинку вещества перемещаются через тонкий слой сорбента с различной скоростью, в результате чего происходит разделение их на компоненты.

Механизм процесса разделения веществ методом тонкослойной хроматографии может быть различным. В зависимости от природы разделяемых веществ, состава тонкого слоя и свойств применяемых растворителей разделение может происходить в результате адсорбции или же рис пределения компонентов смеси между двумя несмешивающимися А ид костями. В некоторых случаях разделение веществ на пластинках, покрытых тонким слоем сорбента, достигается в результате ионного обмена и т.д. Поэтому метод тонкослойной хроматографии в зависимости н механизма разделения веществ в ряде случаев можно рассматривать как один из вариантов адсорбционной хроматографии, а иногда - как вариант распределительной или ионообменной хроматографии.

По технике выполнения опытов метод хроматографии в тонких слоях сорбента аналогичен методу хроматографии на бумаге. Однако метод тонкослойной хроматографии имеет некоторые особенности и ряд преимуществ перед методом хроматографии на бумаге.

Разделение веществ методом хроматографии в гонких слоях сорбентов происходит быстрее, чем методом хроматографии на бумаге. Тонкий слой сорбента устойчив к агрессивным средам; и нагреванию. Увеличение ассортимента материалов, применяемых для приготовления тонких слоев, расширяет возможности использования метода хроматографии в тонких слоях сорбентов в различных областях науки и техники.

Разделение веществ на пластинках, покрытых тонким слоем сорбента, можно проводить несколькими способами.

Восходящее хроматографирование. При этом методе растворитель под действием капиллярных сил поступает на пластинку (из лотка или из дна камеры) снизу вверх и увлекает разделяемые вещества.

Нисходящее хроматографирование. Метод состоит в том, что растворитель или система растворителей подаются к верхнему краю пластинки с помощью фитиля (жгута), погруженного в камеру с растворителем. По эффективности эта методика не имеет преимуществ перед восходящим хроматографированием. Аппаратура, применяемая для нисходящего хроматографирования, более громоздкая, нежели используемая при восходящем хроматографировании.

Круговое хроматографирование. Для круговой (радиальной) хроматографирования на пластинках, покрытых тонким слоем сорбента, используют горизонтальный способ передвижения растворителя, который подается из чашки в центре пластинки с помощью фитиля. Во время разделения вещества движутся из центра пятна к периферии в виде концентрических колец.

Одномерное хроматографирование. При этом методе растворитель или система растворителей передвигаются на пластинке с разделяемыми веществами один раз, как в случаях нисходящей или восходящей хроматографии.

Двумерная хроматография применяется для разделения смесей, содержащих большое число компонентов. При однократном хроматографировании таких смесей, как правило, не достигается полнота их разделения. На

пластинке образуется пятен меньше, чем было компонентов в исходной смеси. В одном пятне может находиться несколько компонентов с близкими свойствами.

Для более полного разделения веществ производят повторное хроматографирование. С этой целью пластинки с частично разделенными веществами при первом хроматографировании устанавливают в камеру в направлении, перпендикулярном первоначальному. При повторном хроматографировании применяют систему растворителей другого состава. При двумерном хроматографировании используют пластинки шириной и длиной около 20 см.

г Многократное хроматографирование веществ Медленно перемещающиеся на пластинке вещества характеризуются малыми числами R_f («близкими значениями R_f). Для обнаружения и разделения таких веществ в ряде случаев производят многократные хроматографирования. Пластинку с нанесенным раствором исследуемого вещества помещают в камеру. После того как растворитель поднимется до линии фронта растворителя, пластинку вынимают из камеры, высушивают при комнатной температуре и снова помещают в камеру с той же системой растворителей. Такой способ многократного хроматографирования в некоторой степени улучшает разделение веществ на хроматограмме. Однако этот способ применяется редко. Вместо многократного лучше производить однократное хроматографирование в другой, более подходящей системе растворителей.

В аналитической практике чаще всего применяется метод восходящего одномерного хроматографирования. Поэтому в дальнейшем остановимся на описании только этого метода.

4.2.3. Сорбенты, применяемые для приготовления хроматографических пластинок

Результаты разделения и обнаружения веществ методом хроматографии в тонких слоях сорбентов в значительной мере зависят от химического состава и свойств сорбентов, их предварительной обработки, способа приготовления хроматографических пластинок и т.д. Для приготовления тонких слоев применяются силикагель, кремневая кислота, кизельгур, оксид алюминия и ряд других сорбентов. Краткая характеристика отдельных сорбентов приводится ниже.

Силикагель SiO_2 получают при взаимодействии концентрированных растворов растворимых силикатов с минеральными кислотами. Силикагель представляет собой полярный гидрофильный сорбент с высоко развитой капиллярной структурой.

Поступающие в продажу сорта силикагеля почти всегда содержат определенное количество влаги, из-за чего на поверхности силикагеля образуются соединения, содержащие группы $-\text{OH}$. За счет этих групп могут образовываться водородные связи со многими веществами, что играет большую роль при идентификации и разделении веществ методом хроматографирования в тонких слоях силикагеля.

Разделение веществ с помощью силикагеля зависит от его структуры, пористости, размера частиц, величины поверхности, наличия активных центров на поверхности и т.д. На разделение большое влияние оказывает активность силикагеля, зависящая от содержания в нем влаги, величины частиц и т.д. Повышение содержания влаги и приводит к дезактивации (снижению активности) силикагеля.

Для повышения активности силикагеля его нагревают при высокой температуре, а для понижения активности к высушенному силикагелю прибавляют небольшое, но известное количество воды. В отдельных случаях используют нелетучий органический растворитель.

Силикагель I степени активности - безводный, силикагель II степени активности содержит 10% воды, а силикагель III степени активности - 12% воды.

При выборе силикагеля для аналитических целей необходимо учитывать его структуру, пористость, величину зерен и т.д. Перечисленные характеристики изменяются в зависимости от марки силикагеля, способа обработки его перед анализом и т.д.

Силикагель Г В ряде зарубежных стран выпускается смесь силикагеля с гипсом под названием «Силикагель Г». При отсутствии готового силикагеля Г его можно заменить смесью, состоящей из 25 г силикагеля и 5 г гипса.

Кремневая кислота. Для приготовления хроматографических пластинок в ряде случаев применяют водную кремневую кислоту. Известно несколько кремневых кислот: H_2SiO_3 - мета кремневая кислота, H_4SiO_4 - ортокремневая кислота, $\text{H}_6\text{Si}_2\text{O}_7$ - метади кремневая кислота и др., которые отличаются друг от друга количеством молекул воды, связанной с молекулой SiO_2 .

В хроматографическом анализе для приготовления пластинок, покрытых тонким слоем сорбента, применяется водная кремневая кислота H_2SiO_3 , pH 0, содержание воды, в которой точно не установлено.

Кизельгур. Основной составной частью кизельгура является оксид кремния (IV). Кизельгур получают из остатков кремневых панцирей инфузорий и диатомовых водорослей, живших в глубокой древности. Кизельгур встречается в виде залежей на дне бывших водоемов. Кроме оксида кремния (IV) кизельгур содержит определенное количество воды, оксидов металлов, глинистых веществ и других примесей. В литературе кизельгур встречается под названиями «инфузорная земля», «диатомитовая земля» и др.

Оксид алюминия. Одним из полярных сорбентов, широко используемых в хроматографии, является оксид алюминия. В зависимости от места получения и термической обработки оксид алюминия может находиться в нескольких кристаллических формах.

Применяемый в хроматографии оксид алюминия в основном содержит иго-форму и небольшое количество других кристаллических форм, которые обладают близкими сорбционными свойствами. Если нагреть оксид алюминия до 1100°C и выше, то все модификации переходят в α-форму; которая хроматографически инертна. Это, по-видимому, объясняется изменением структуры кристаллической решетки оксида алюминия и уменьшением удельной поверхности.

В зависимости от природы разделяемых веществ для хроматографии применяют нейтральный, основной и кислый оксиды алюминия. Кислый оксид алюминия готовится из основного путем обработки его азотной кислотой.

Разделительная способность тонких слоев сорбента, содержащих оксид алюминия, зависит от величины частиц, способа активирования, приготовления тонкого слоя и т.д. Активность оксида алюминия для хроматографии зависит от содержания в нем воды. Уменьшение содержания воды в оксиде алюминия повышает его активность, увеличение же, наоборот, приводит к снижению ее (деактивации).

Согласно Брокману, прокаленный оксид алюминия, содержащий воды, имеет I степень активности, оксид алюминия с содержанием 3% воды - II степень активности, 6% воды - III степень, 1.0% - IV степень активности и т.д.

Для приготовления тонкого слоя в основном применяются силикагель КСК и оксид алюминия. Эти сорбенты доступны, недороги, обладают хорошей и разделительной способностью, активность их можно легко регулировать. Силикагель КСК легко подвергается очистке.

4.2.4. Очистка сорбентов от примесей

Большинство сорбентов, применяемых для приготовления хроматографических пластинок, выпускается промышленностью в достаточно чистом виде. Такие сорбенты можно использовать для аналитических целей без специальной очистки. Однако в ряде случаев в них содержатся примеси. Моратории поступают недостаточно очищенные силикагель и некоторые другие сорбенты. Применение подобных сорбентов может сказываться при идентификации и разделении веществ в ходе хроматографии. Поэтому недостаточно чистые сорбенты требуют специальной очистки. Для примера приведем способ очистки силикагеля КСК от примесей.

1) (лежащий на поверхности) силикагеля КСК растирают в ступке и отсеивают мелкие частички. Просеянный силикагель вносят в колбу, заливают разбавленной соляной кислотой (1:1) и оставляют на 18-20 ч, периодически взбалтывая. Затем соляную кислоту сливают, силикагель промывают дистиллированной водой, заливают разбавленной азотной кислотой (1:1) и кипятят в течение 2-3 ч. После охлаждения азотную кислоту сливают, силикагель несколько раз промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции (по лакмусу) промывных вод и отсутствия в них ионов хлора и железа. Промытый дистиллированной водой силикагель высушивают в сушильном шкафу при 130°C в течение 4-6 ч, затем растирают в ступке и просеивают через сито с заданным количеством отверстий. Полученный таким образом силикагель сохраняют в склянках с притертой пробкой.

Величина частиц сорбента. Результаты идентификации и разделения веществ методом тонкослойной хроматографии зависят от величины частиц применяемого сорбента. Выбор размера частиц сорбента зависит от целей исследования. Для получения частиц сорбентов определенных размеров применяют специальные сита. Размер частиц (зерен) сорбента определяют по их диаметру и числу отверстий в сите.

Сита, применяемые для просеивания сорбентов, должны иметь соответствующее число меш. (число отверстий в сите на 1 линейный дюйм, равный 2,54 см). В шкале сит в качестве стандарта принято сито 200 меш. с отверстиями диаметром 0,074 мм и нитью диаметром 0,056 мм. В большинстве случаев для приготовления тонкого слоя используются сорбенты, просеянные через сита, имеющие 100, 150 и 200 меш.

Для примера опишем способ подбора сит, обеспечивающих получение частиц сорбента с диапазоном 0,10-0,25 мм. Измельченный сорбент просеивают через сито 100 меш., а затем через сито 150 меш. После просеивания сорбента собирают частицы, которые прошли через сито 100 меш. и задержались ситом 150 меш.

4.2.5. Приготовление пластинок для хроматографирования

Пластинки, применяемые для исследования веществ методом хроматографии в тонких слоях сорбента, состоят из основы (подложки) и нанесенного на нее слоя сорбента. В качестве основы могут быть использованы пластинки из стекла, алюминиевой фольги или пластмассы. В химико-токсикологических лабораториях в качестве подложки применяют, главным образом, стеклянные пластинки. Пластинки для хроматографирования должны отвечать ряду требований.

- Стекло для приготовления хроматографических пластинок должно быть ровным, без выступов и впадин на поверхности. Толщина стеклянных пластинок на всех участках должна быть одинаковой.

- Слой сорбента на пластинках должен быть однородным, без комков» пузырьков воздуха и т.д.
- На всех участках пластинки тонкий слой сорбента должен иметь одинаковую толщину, которая зависит от назначения пластинок. Для аналитических целей применяют пластинки с нанесенным слоем толщиной 0,15-0,25 мм, а для препаративных целей - 0,50 -0,75 мм Тонкий слой сорбента не должен иметь трещин и других механических повреждений

- Пластинки, применяемые для хроматографии, должны иметь определенные размеры Для идентификации веществ применяют пластики длиной 12 см и шириной 9 см, для препаративных целей - длиной 40 -50 см и шириной 30-40 см. В качестве «микропластинок» для хро- чагографирования применяют предметные стекла, покрытые тонким слоем сорбента.

Пластинки для хроматографирования должны быть тщательно очищены от загрязнений и хорошо промыты Вначале их промывают раствором соды, водой, затем хромовой смесью и дистиллированной во- »ой. Промытые пластинки устанавливают в вертикальном положении и высушивают. Перед нанесением тонкого слоя сорбента пластинки протирают кусочком бинта или марли, смоченные этиловым спиртом или диэтиловым эфиром.

В аналитической практике применяются пластинки с незакрепленным и закрепленным тонким слоем сорбента, а также пластинки с мо- (ифицированным и готовым слоем.

4.2.6. Пластинки с незакрепленным слоем сорбента

На стеклянную пластинку или другую подложку наносят сорбент.)исравнивают его на пластинке и равномерно укатывают валиком нержавеющей стали, на концах которого имеются утолщения (0,5-1,0 мм), Гостояние между утолщенными концами валика должно быть на 10- I м м меньше ширины пластинки. При использовании таких валиков им укатывания сорбентов края пластинки (5-6 мм) получают сво- Поцными от сорбента.

Для уплотнения незакрепленного слоя сорбента вместо валика из нержавеющей стали можно пользоваться стеклянной трубкой, на которую

обеих сторон надеты кусочки резиновой трубки. Расстояние между ними кусочками должно быть на 10-12 мм меньше ширины пластинки.

Для приготовления пластинок, покрытых незакрепленным слоем сорбента, в качестве подложки лучше применять пластинки из мато-| вого стекла.

При использовании пластинок с тонким незакрепленным слоем сорбента процесс хроматографирования происходит быстрее, чем на пла| стинках с закреп ленным тонким слоем. Однако незакрепленный слой сорбента менее прочный, чем закрепленный.

4.2.7. Пластинки с закрепленным слоем сорбента

В аналитической практике такие пластинки применяются значительно чаще, чем пластинки с тонким незакрепленным слоем. Для пригоп» ления закрепленного тонкого слоя применяют суспензию, состоящую из сорбента, связывающего вещества (фиксатора) и воды.

Для приготовления хроматографических пластинок с одинаковой толМ щинной слоя предложено несколько способов. Один из способов состоите том, что суспензию, содержащую сорбент, разбавляют соответствуй!» жидкостью и наносят на пластинку при помощи пульверизатора. <1

Согласно другому способу, пластинку опускают в суспензию, а Щ тем разравнивают ее на пластинках при помощи специальных приспо! соблений. Для приготовления пластинок с одинаковой толщиной слш применяют специальную аппаратуру с подвижным или неподвижны устройством.

Один из наиболее распространенных способов нанесения тонков слоя, который широко используется в лабораторной практике, состсЯ в следующем: стеклянную пластинку устанавливают на ровную гор! зонтальну ю поверхность и наносят необходимое количество суспензЛ затем равномерно распределяют ее поверхность при помощи шпате* часто наклоняя пластинку в разные стороны. После нанесения тонко! слоя сорбента пластинку высушивают при комнатной температуре.Я

В случае необходимости перед хроматографированием тонкий слЯ сорбента активируют нагреванием пластинки в сушильном шкафу ПЯ этом пластинку предварительно высушивают на воздухе во избежаД образования в тонком слое трещин. Приготовленные пластинки сохД няют в эксикаторе. |

Во время приготовления суспензии, содержащий гипс, необходимо избегать «схватывания» гипса, который после прибавления воды <1 рез некоторое время превращается в твердую массу. Поэтому се пензию, в состав которой входит гипс, необходимо наносить на пля тинку не позднее чем через 4 мин после прибавления воды к смЛ сорбента и гипса. ||

Закрепленный тонкий слой сорбента более прочный, чем незакрепленный. Однако из-за наличия связывающих веществ в закрепленном

- те сорбента изменяются его сорбционные свойства Поэтому развитие хроматограммы в закрепленном тонком слое происходит медленнее, чем в незакрепленном слое.

4.2.8. Пластинки с модифицированным слоем сорбента,

В отдельных случаях используются пластинки с модифицированным слоем сорбента. Для приготовления сорбционной массы, из которой получают модифицированный сорбционный слой, берут смесь сорбента и связывающего вещества (гипс, крахмал). К этой смеси вместо йоды прибавляют растворы кислот, щелочей, буферные растворы или растворы соответствующих реактивов. Иногда к смеси сорбента и связывающего вещества прибавляют определенное количество воды, а затем один из указанных растворов.

4.2.9. Пластинки с готовым тонким слоем сорбента.

В некоторых странах выпускается пластинки с готовым тонким слоем сорбента. В качестве подложек для приготовления таких пластинок применяют листы от пластмассы, металлическую фольгу, стеклянные пластинки и т.д. В состав готового, тонкого слоя входят соответствующие сорбент и связывающее вещество. Иногда к сорбенту прибавляют флуоресцентные индикаторы и ряд других веществ.

В отдельных лабораториях используются пластинки с готовым, тонким слоем под названием «Силуфол». Эти пластинки изготавливаются из органической подложки в них является алюминиевая фольга. В состав тонкого слоя входят порошки - силикагель и крахмал, иногда тонкий слой содержит флуоресцентный индикатор.

Пластинки с готовым слоем удобны в работе. Они имеют равномерное нанесенный слой сорбента определенной толщины. Однако эти пластинки имеют и некоторые недостатки. С них довольно трудно снять сорбент, следовательно, затрудняется элюирование веществ из пятен. Различные добавки, содержащиеся в тонком готовом

- в сорбента, могут давать окраску с проявляющими реактивами. Кроме того добавки могут искажать результаты спектрофотометрического определения исследуемых веществ в элюатах. Пластинки с готовым слоем, нанесенным на пластмассовую подложку; нельзя нагревать выше 130-150°C и т.д.

- хромографирования

4.2.10. Камеры для хрома

- I

■ Результаты разделения веществ методом хроматографии в тонких слоях сорбента зависят от размера и конструкции камер. От объема камеры зависит быстрота насыщения ее парами растворителей, при этом изменяется для развития хроматограммы.

■ Камеры для хромографирования изготавливают из стекла, иногда из стали и пластмассы. Камеры из пластмассы применяются редко так как она может частично или полностью растворяться некоторыми растворителями, применяемыми для развития хроматограммы.

■ Камеры, применяемые для хроматографии в тонких слоях сорбента, должны быть герметичными, крышки их - хорошо шлифованными. При работе с камерами, не обеспечивающими герметичность, нельзя добиться насыщения их пространства парами растворителей, вследствие чего получаются не воспроизводимые результаты разделения и идентификации веществ. Величина камер зависит от размера помещаемых в них пластинок.

- 4.2.11. Нанесение растворов исследуемых веществ на пластинки

■ Растворы исследуемых веществ наносят на хромографические пластинки в виде пятен или полос. Для этой цели применяют капилляры, пипетки или шприцы. Если исследуемые вещества после разделения методом хроматографии определяют количественно, то для нанесения растворов этих веществ на пластинку применяют хорошо калиброванные микропипетки (удобно пользоваться микропипетками объемом 10 мм³ с делением в 1 мм³) или микрометрические шприцы (шприцы, снабженные специальным дозирующим устройством). При идентификации веществ или при очистке их от примесей для нанесения растворов на пластинки применяют капилляры, микропипетки и микрометрические шприцы.

■ Способ нанесения растворов исследуемых веществ на пластинки с тонким слоем сорбента зависит от цели исследования. Для идентификации веществ их растворы (приблизительно по 5 мм³) наносят на хромографическую пластинку на линию старта, при этом пятна должны располагаться на расстоянии 1,5- 2,0 см друг от друга. Пластинку подсушивают на воздухе, а затем помещают в камеру; насыщенную парами растворителей.

■ Для очистки веществ, находящихся в относительно больших объемах, растворы наносят на пластинки в виде полос. При этом на линию старта на пластинке наносят исследуемый раствор в виде ряда расположенных друг другу точек. При нанесении растворов на пластинку таким способом после развития хроматограммы получают широкие неровные полосы. Для элюирования веществ из тонкого слоя необходимо снимать сорбент с большого участка пластинки, поэтому

приводит к ухудшению эффективности элюирования. ¹ Дим нанесения растворов исследуемых веществ на пластинки в виде **НМпо** лучше пользоваться специальным устройством, при помощи ко- Мпго можно регулировать ширину полос и объем растворов, наносимы ч ил пластинки.

Рас твор, который наносят на пластинку в виде точек или полос, дол- 40М быть прозрачным, в нем не должно содержаться взвешенных чае- ГИЦ Пельзя допускать высыхания раствора, нанесенного на пластинку, •ЛИРЫ не происходила кристаллизация находящихся в нем веществ. Если ЙМле высыхания пятен на пластинке образуются кристаллические осад- ИИ, го на хроматограммах появляются пятна с длинными «хвостами».

4.2.12. Разделение веществ на пластинках

При разделении смесей веществ методом хроматографии в тонких

I >нжч сорбента каждый компонент смеси, независимо от присутствия цругих веществ, под влиянием потока подвижной фазы движется на МЯАстинке вдоль неподвижной фазы. В процессе движения вещества **непрерывно** распределяются между подвижной и неподвижной фазами Для перехода каждого вещества из подвижной фазы в неподвижную, и наоборот требуется определенное время, причем это время для икждого компонента разделяемой смеси различно. Если время переходи **двух** веществ из одной фазы в другую неодинаково, то и скорости щнжения этих веществ на пластинке будут различны. Этим и объясня- | 1С и разделение смесей веществ на компоненты методом хроматографии в тонких слоях сорбента.

Для успешного разделения веществ растворы, наносимые на пластики с тонким слоем сорбента, не должны быть концентрированными.

II **них** должно содержаться 0,1-1.0 % исследуемых веществ.

Растворители, применяемые для растворения исследуемых веществ, ншжны хорошо растворять эти вещества. Если вещество плохо раство- (штгтс в растворителе, то оно может выкристаллизовываться на пластике еще до внесения ее в камеру для хроматографирования.

Для каждого хроматографирования следует применять свежую пор цию растворителя или системы растворителей (смесь растворителей, предназначенную для развития хроматограммы, называют *системой растворителей*). Это обусловлено тем, что после каждого хроматографирования изменяется состав смеси растворителей; одна часть их переходит на пластинки, другая испаряется (причем одни растворы гели улетучиваются в больших количествах, чем другие).

Перед началом хроматографирования готовят пластинку, по крытую тонким слоем сорбента и камеру, в которую помещают под» ставку из нержавеющей стали, стеклянных трубок или другого материала, предназначенную для установки хроматографических пластинок I необходимом положении (под углом 80-85°). После этого в камеру наливают слой растворителя или системы растворителей толщиной 0,5- 1.0 см. Иногда растворители наливают не на дно камеры, а в лоток, установленный в камере.

Подготовленную для хроматографирования камеру плотно закрывают крышкой и оставляют на время, необходимое для насыщения пространства камеры парами растворителей. После этого переносят плао| тнику в камеру и с этого момента начинается процесс хроматографирования.

Методика хроматографирования. На линию старта на хроматограф фической пластинке наносят раствор исследуемого вещества в виде круглого пятна или полоски. Затем пластинку высу шивают при комнатной температуре или в токе воздуха, помещают в камеру для хроматографирования, предварительно насыщенную парами растворителей При помощи подставки пластинку устанавливают в камере вертикально или под углом 80-85°. Нижний край пластинки должен погружаться в растворитель или в систему растворителей на 0,5-0,7 см. Во избежание размывания растворителями нанесенных пятен, они должны быть выше (приблизительно на 1 см) уровня жидкости в камере После этого камеру плотно закрывают крышкой и оставляют до тех пор, пока жидкость не поднимется до линии фронта растворителя.

После достижения жидкостью линии фронта растворителей пластинку вынимают из камеры, высушивают при комнатной температуре и проявляют зоны нахождения соответствующих веществ на пластинке. С этой целью пластинку опрыскивают растворами реактивов, которые с разделяемыми веществами дают окраску. Вещества, которые флуоресцируют, можно проявить путем облучения пластинок УФ-све- том. На проявленных хроматограммах измеряют фронт вещества (расстояние от линии старта до центра пятен) и фронт растворителей. На основании результатов измерений вычисляют отношение этих величин (К.) для каждого вещества по формуле:

$K = \frac{\text{Фронт вещества, см}}{\text{Фронт растворителя, см}}$ А, >то сокращенная запись слов гаТе йасбоп, что означает «скорость **фрикции**». Величина К.,, является важной качественной характеристики- мЫП каждого разделяемого вещества и зависит от многих факторов.

Иногда в литературе приводятся не числовые значения величин К.,, а |М 1\ иьтат умножения этих величин на 100 (К,-100). Этот результат обо- Жичают буквами БКг

4.2.13. Выбор сорбентов и систем растворителей

, Успех разделения веществ методом хроматографии в тонком слое сорбента зависит от ряда факторов, важнейшими из которых являются **природа** и свойства сорбентов и растворителей.

Выбор сорбентов. Сорбция органических соединений кислородсо- /Иржащими сорбентами (силикагелем, оксидом, алюминия, кизельгуром и др.) зависит от природы функциональных групп, содержащихся в МОНеулах разделяемых веществ. Сорбируемость органических соединений указанными сорбентами уменьшается при наличии в молекулах **н их** соединений следующих функциональных групп: ($^{\circ}00N>C0NH_2>0H>NH_2>C00CH_3>N(CH_3)_2>N0_2>0CH_3>H>Cl$). Это подтверждается следующими примерами. Если в качестве растворителя для развития хроматограммы применяют бензол, то на пла- 11 пиках, покрытых тонким слоем силикагеля или оксида алюминия, про- 11'ус и сложные эфиры адсорбируются слабо. Поэтому их пятна распоем аются в верхней части хроматограммы. Кетоны и альдегиды обнаруживаются на середине хроматограммы. спирты располагаются ниже истоков и альдегидов, а органические кислоты, которые хорошо адсор- Ону руются указанными сорбентами, остаются на линии старта или око- |п нее В тех случаях, когда в молекулах органических соединений со- юржится несколько указанных выше функциональных групп, отмечен- нич шеономерность может не соблюдаться.

(орбируемость химических соединений из растворов зависит от природы и активности сорбента. Активность сорбента зависит от велич**ны** частиц и содержания в нем воды По данным ряда авторов, плас- тики. тонкий слой которых активирован путем нагревания до 110°C. \ «и: через несколько минут после активирования поглощают из воздуха "мределенное количество влаги, в связи с чем активность тонкого слоя н «меняется. Поэтому условия активирования сорбентов в тонких слоях и условия хранения пластинок должны быть стандартизированы.

Выбор системы растворителей. Согласно данным литературы, наиболее точные результаты идентификации и разделения смесей вещеети методом хроматографии в тонком слое сорбента имеют места тогда, когда K_r исследуемых веществ равно приблизительно 0.50. По мере отклонения величины K_r от 0,50 достоверность результатов хроматографического анализа уменьшается. Поэтому при выборе условий хрома тографирования необходимо подбирать системы растворителей и сорбенты таким образом, чтобы значения K_r полученных пятен (зон) от* дельных компонентов на хроматограмме были близкими к 0,50.

При выборе растворителей для хроматографирования учитывают их полярность и некоторые другие свойства, от которых зависит разделяющая способность этих растворителей. Ряд авторов (Траппе, Стрейн. Негер и др.) составили так называемые элюотропные ряды раствд« рителей. Эти ряды почти совпадают друг с другом.

Приводим элюотропный ряд растворителей, расположенных в порядке возрастания их полярности: н- гексан < гептан < циклогексан < чета реххлористый углерод < бензол < хлороформ < диэтиловый эфир < этила- цетат < пиридин < ацетон < этиловый спирт < метиловый спирт < вода.

Учитывая свойства разделяемых веществ (наличие в их молекулах определенных функциональных групп), активность сорбентов и элюи- рующую способность растворителей, можно выбрать оптимальные условия разделения смесей методом хроматографии в тонких слоях сорбента. Вещества, обладающие слабым сродством к сорбенту, разделяются с помощью активных слоев сорбентов и слабополярных растворителей. Для разделения веществ, хорошо сорбируемых соответствующими сорбентами, применяют слабоактивные сорбенты и сильнополярные растворители. Насыщенные углеводороды слабо сорбируются большинством сорбентов, поэтому они очень быстро движутся на пластинках с тонким слоем сорбента и при выборе условий их хроматографирования возникают затруднения.

4.2.14. Насыщение камер парами растворителей

Результаты разделения веществ методом хроматографии в тонком слое сорбента в значительной мере зависят от степени насыщения камер парами растворителей, которые применяются для развития хроматографы.

В камерах? не насыщенных парами растворителей, во время разделения веществ происходит испарение этих растворителей с поверхяое-

ги гонкого слоя сорбента, что приводит к у увеличению времени перемещения разделяемых веществ на пластинках. Испарение по краям пластики происходит быстрее, чем в центре. Это явление называется краевым эффектом.

Неравномерность испарения жидкости по краям и в центре пластинки является причиной искривления линии фронта растворителей. В результате этот,о величины K_r , на краях хроматографических пластинок

((сличаются от K_1 , пятен этих веществ, находящихся в центре пластинок. Воспроизводимость величин K_1 на пластинках, внесенных в камеры, не насыщенные парами растворителей, меньше, чем, при хроматографировании в насыщенных парами камерах. Краевые эффекты особенно заметно проявляются тогда, когда в камере, не насыщенной парами, содержится смесь растворителей, отличающихся друг от друга летучестью.

Устранения краевого эффекта добиваются равномерным насыщением камер парами растворителей до начала хроматографирования.

Ускорить насыщение камер парами растворителей можно следующим способом. Лист гладкой обезжиренной фильтрованной бумаги (размер листа зависит от величины и формы камеры) предварительно смачивают отдельной порцией системы растворителей, применяемой для развития хроматограммы. Бумагу плотно прижимают к внутренней гонимой камере, используя для этого, при необходимости, упругое кольцо из тонкой стальной проволоки.

После этого в камеру вносят систему растворителей, плотно закрывают ее крышкой и оставляют на 30-40 мин до насыщения пространств парами растворителей. В подготовленную таким образом камеру помещают пластинку с нанесенными на нее растворами разделяемых веществ.

Насыщение парами растворителей ускоряется также при уменьшении размера камер для хроматографирования.

4.2.15. Влияние количества вещества на разделение методом хроматографии

На полноту разделения и величины K_1 разделяемых веществ могут влиять количества (массы) компонентов в пробах, нанесенных на пластинки с тонким слоем сорбента.

При наличии в смесях больших количеств веществ, имеющих близкие значения R_f , на хроматографических пластинках несколько пятен может сливаться в одно. Если в пробе содержится большое количество

вещества, то величина K_1 на хроматограммах в ряде случаев может быть заниженной.

При использовании метода хроматографии в тонком слое сорбент для аналитических целей на пластинки наносят от 0,1 до 50 мкг смеси двух веществ. Если же этот метод применяют для препаративных целей, то для разделения берут смеси, содержащие от 0,1 до 0,5 г соответствующих веществ. В этих случаях лучше использовать пластинки большого размера с незакрепленным, тонким слоем сорбента.

4.2.16. Характеристики разделения

В работе возникают моменты, когда нужно решать степень разрешения веществ в полученных хроматограммах, следовательно, имеет возможность оценить достоверность результата. К сожалению, в доступной литературе критерии оценки хроматограмм приводятся не всегда. Более системно этот материал приводится в «Справочнике по газовой хроматографии» (Н. Г. Тецев, Н. Коцев, перевод доктора химических наук В. М. Муллера, М. «Мир», 1987 г.). Согласно этому справочнику степень разделения оценивается по величине разрешения, которое рассчитывается по формуле:

$$R = 2(a_2 - a_1) / (a_1 + a_2), \text{ где } R - \text{ величина разрешения;}$$

a_1, a_2 (ЕЛО - неисправленное время удерживания (или, соответственно, расстояние, объем) двух соединений);

a_1, a_2 - ширина пиков этих соединений при основании, измеренная между точками пересечения касательных к их сторонам с нулевой линией и выраженная в тех же единицах, что и числитель.

По другому варианту величина разрешения рассчитывается по формуле:

$$R = 2(a_2 - a_1) / (a_1 + a_2), \text{ где } R - \text{ величина разрешения;}$$

a_1, a_2 - расстояние между максимумами двух пиков; a_1, a_2 - ширина первого и второго пика, на половине его высоты. Этот вариант расчета считается более удобным, т. к. ширина пиков измеряется непосредственно на половине его. а ширина пиков у основания может быть измерена после выполнения дополнительной операции экспансии.

Считаем, что приведенные расчетные формулы пригодны и для плоскостной хроматографии, независимо от того, является ли она бумажной

ИЛИ тонкослойной.

В случае использования первого расчета, видимо, формулу нужно изменить следующим образом

$$K = 2(\rho - \rho_0)/(a_1 + a_2)$$

В): расстояние от стартовой линии до середины проявленной Юны первого и второго вещества;

a_1, a_2 - диаметр соответствующих проявленных зон.

В случае использования второго расчета, принимают расстояния. Намеренные от центров проявленных зон первого и второго вещества. А при возможности использования денситометров для обработки плоских хроматограмм, расчеты с целью его характеристики нужно производить с денситограммой без изменения расчетных формул

Зависимость степени разделения от значения величины разрешения приведены в таблице.

Помня о задачах судебно-химической

Величина разрешения	Степень 1 разделения, %
0,50	0,0
0,75	50,0
1,00	98,0
1,25	99,0
1,50	99,7

ОЛужбы. видимо, нужно добиваться, что- (бы величины разделения для двух близлежащих зон достигали единицы, в про- | И ином случае не может быть полноты Разделения. Например, при выполнении (Воматографического разделения двух ве- ществ на хроматограмме были получе-

ИМ значения - 0,75 и 0,80: высота подня- тии фронта растворителей составила 10 см, а диаметр пятен ир см. Определим степень разделения:

$$2 \frac{(8,0 - 7,5)}{0,5 + 0,5} = 2 \frac{(0,5)}{1} = 1$$

Величина разрешения, равная единице, соответствует степени раз- деления приближенно к 100 %.

Математический анализ показывает, что при описанных условиях достоверные результаты будут получаться тогда, когда числовое значе- ние числителя больше единицы, что возможно, когда разница значений K_1 и K_2 близлежащих зон не менее 0,05, и наоборот, когда $R_s < 0,05$, досто- верность результата у эксперта-химика должна вызывать сомнение.

4.2.17. Применение метода для обнаружения химических соединений

На линию старта, находящуюся на расстоянии 1,5 см от нижнего края пластинки с тонким слоем сорбента, наносят 1-2 капли исследуемого раствора (объем капли около 5 мм³) Правее, на линию старт] (через 1.5-2,0 см) наносят такой же объем рабочего раствора стандарт та (PCO) или как его часто называют - «свидетеля». Пластинку высушивают на воздухе или в токе воздуха, а затем помещают в камеру для хроматографирования, насыщенную парами растворителей. После того, как жидкость поднимется до линии фронта растворителей, пластинку вынимают из камеры и высушивают на воздухе. Пятна на пластинке проявляют соответствующим реактивом или облучают УФ-лучами. Определяют с помощью линейки расстояние фронта растворителя и расстояние от линии старта до центра проявленных пятен. Вычисляют значение R_s . Совпадение числовых значений K_1 и K_2 пятна, содержащего исследуемое вещество и пятна вещества, содержащегося в растворе «свидетеля», указывает на идентичность веществ, нанесенных на пластинку. Некоторые вещества, содержащиеся в смесях, после разделения имеют несколько большее числовое значение K , чем K эквивалентного количества того же вещества, взятого в чистом виде. В литературе приводятся величины K , для многих веществ. Однако для аналитиков эти данные могут быть только ориентировочными, поскольку не всегда можно провести эксперимент в точно таких же условиях, в которых его проводил автор опубликованных данных. Поэтому при идентификации веществ с помощью метода хроматографии в тонком слое сорбента необходимо пользоваться растворами «свидетелей»

При правильном выборе условий хроматографирования вещества должны разделяться на пластинках в области величин K , от 0,15 до 0,85. Величины K , ниже 0,15 и выше 0,85 являются ненадежными при иден- тификации веществ методом хроматографии в тонком слое сорбента