

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М. В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет
Кафедра Аналитической химии
Лаборатория Спектроскопических методов.

**Изучение и определение оптимальных условий проведения
денситометрического сканирования**

Курсовая работа студентки 2XX группы
XXXXX X.X.

Научный руководитель:
асп. XXXXX X.X.

Преподаватель:
к. х. н. XXXXX X.X.

Москва - 2002

Содержание

1. Список сокращений.....	2
2. Введение.....	3
3. Обзор литературы.....	4
3.1. Методы детектирования в тонкослойной хроматографии.....	4
3. 1. 1. Электрохимические методы.....	5
3. 1. 2. Ядерно-физические методы.....	7
3. 1. 3. Оптические методы.....	7
3. 2. Объединение ТСХ с другими хроматографическими методами.....	10
4. Экспериментальная часть.....	14
4. 1. Приборы и реактивы.....	14
4. 2. Построение градуировочного графика.....	14
4. 3. Определение оптимальных значений параметров сканирования в режиме абсорбции при определении концентрации вещества в пятне.....	15
4. 3. 1. Определение оптимального значения ширины щели монохроматора.....	15
4. 3. 2. Определение оптимального значения скорости сканирования.....	16
4. 3. 3. Определение оптимального значения ширины сканирующей щели.....	16
4. 4. Определение оптимальных значений параметров сканирования в режиме абсорбция для максимального разрешения пиков на хроматограмме.....	19
4. 4. 1. Определение оптимального значения ширины щели монохроматора.....	20
4. 4. 2. Определение оптимального значения скорости сканирования.....	21
4. 4. 3. Определение оптимального значения ширины сканирующей щели.....	22
5. Выводы.....	25
6. Список литературы.....	26

1. Список сокращений

ТСХ – тонкослойная хроматография.

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография.

ГХ – газовая хроматография.

КЖХ – колоночная жидкостная хроматография.

2. Введение

Тонкослойная хроматография к настоящему времени получила всеобщее признание. Данный метод с успехом применяют в различных областях аналитической, органической, биологической химии для анализа примесей в различных смесях и материалах, в фармацевтике, криминалистике и сельском хозяйстве. Такое широкое применение и развитие этого метода обусловлено рядом его преимуществ: быстротой выполнения анализа, простотой, экономичностью и универсальностью.

Главное отличие ТСХ от других, более точных методов, заключается в том, что весь анализ может быть проведен без использования каких-либо приборов (визуальное детектирование). Такой вариант применяется при работе с большими количествами веществ, которые поглощают в УФ или видимой области, и является полуколичественным. В случае, когда требуется определять сверхнизкие – до 10^{-9} г/мкл – концентрации веществ, в тонкослойной хроматографии детектирование осуществляется с помощью сканеров. Эти оптические приборы позволяют с хорошей точностью определить количество вещества в хроматографической зоне. Сейчас существует немало различных типов сканирующих денситометров, некоторые из них управляются вручную, другие – с помощью программного обеспечения. Несомненно, все параметры сканирования (скорость сканирования, ширина щели монохроматора, размеры сканирующей щели) сильно влияют на получаемые результаты. Из-за неверно выставленных первоначальных параметров может возрасти ошибка анализа. Поэтому важной задачей является выявление оптимальных значений перечисленных параметров. В нашей работе были изучено влияние приборных характеристик на величину аналитического сигнала, на примере однолучевого сканирующего денситометра с компьютерным управлением.

3. Обзор литературы

3.1. Методы детектирования в тонкослойной хроматографии

В наши дни тонкослойная хроматография стала одним из популярных методов разделения, и широко применяется в науке, для контроля промышленных технологий и в экологическом анализе.

Популярность ТСХ объясняется рядом положительных особенностей этого метода – простотой оборудования, высокой селективностью разделения и низким пределом обнаружения химических соединений. Однако классической форме ТСХ присущи и определенные ограничения, главные из которых – трудоемкость, длительность анализа и невысокая точность при количественных определениях. Тем не менее, в последние годы наметились новые тенденции в развитии ТСХ, связанные с совершенствованием техники разделения и разработкой инструментальных методов детектирования [1].

Анализ исследуемых соединений в ТСХ складывается из нескольких этапов: введения пробы в тонкослойную хроматографическую систему, разделения компонентов на тонком слое сорбента, качественной и количественной оценки результатов анализа. Детектирование в ТСХ осуществляется или непосредственно на слое (после окончания или в ходе процесса разделения), или после извлечения анализируемых веществ из слоя сорбента в газообразную или с помощью растворителей в жидкую фазу [2].

Количественное детектирование может быть одностадийным (например, с использованием оптических, ядерно-физических, электрохимических методов) и двухстадийным. Последний случай относится к детектированию с извлечением анализируемых веществ из слоя сорбента, при этом количественная оценка осуществляется либо с помощью газовых детекторов (в случае газообразных продуктов), либо одного из инструментальных методов. Создание во второй половине шестидесятых годов фундаментальной теории оптического детектирования в ТСХ сыграло важную роль в распространении этого метода и в совершенствовании многочисленных устройств для оптического детектирования. Кремер и Кранс предложили тонкопленочную систему для хроматографического разделения и кондуктометрический детектор. Фирма “Паккард Инструментс” (Англия) разработала автоматическую установку для детектирования в ТСХ с помощью газовых детекторов, подытожив многочисленные научно-исследовательские работы, проводившиеся в разных странах в этой области. Ван Дийк описал и соответствующую конструкцию радиальной ТСХ с движением элюата от периферии к центру, что позволило объединить в единую систему разделение на тонком

слое сорбента и детектирование различными устройствами, используемыми в колоночной жидкостной хроматографии [2,3].

К началу семидесятых годов существенно улучшилось качество адсорбентов для ТСХ, расширились сведения по хроматографическому поведению многочисленных растворителей, усовершенствовались способы нанесения пробы на слой сорбента, появились теоретические обобщения по оптимальному подбору хроматографических систем для ТСХ. На базе перечисленных достижений был создан принципиально новый и исключительно перспективный метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) [2].

3. 1. 1. Электрохимические методы

Одним из основных электрохимических методов является *полярографический метод*, основанный на измерении силы тока изменяющейся в зависимости от приложенного напряжения, в условиях, когда один из электродов имеет малую поверхность (поляризующийся электрод), а другой – большую (неполяризующийся электрод). Поляризующим катодом могут быть капли ртути, вытекающие из тонкого отверстия капиллярной трубки, а так же платиновый (вращающийся), графитовый, серебряный и другие. В полярографическую ячейку для количественного детектирования зоны анализируемого вещества можно переносить, не извлекая их со слоя сорбента [4]. В этом методе сорбент не должен мешать полярографическому анализу, размер частиц подбирают такой, чтобы раствор электролита диффундировал через слой без затруднений. Недостаток этого метода – относительно высокая трудоемкость и длительность анализа; необходимость хорошего разделения анализируемых веществ и их локализации на слое сорбента.

Полярографические детекторы для ТСХ чувствительны к растворенному кислороду, в связи с чем, его удаляют, предварительно продувая анализируемую пробу азотом. Показания детектора зависят также от природы электролита, особенностей хроматографической системы, скорости потока элюата и приложенного напряжения. Поэтому необходимо выбирать оптимальные условия анализа и поддерживать их постоянными. Для получения лучших результатов необходимо минимизировать мертвый объем детектора и по возможности уменьшить расстояние между электродами. При использовании ртутного капельного электрода необходимо вводить сильное электрическое демпфирование для уменьшения шумов, вызываемых в силе тока при росте и стекании ртутной капли с электрода.

По сравнению с другими электрохимическими методами полярографический метод в ТСХ можно характеризовать как высокочувствительный, универсальный и селективный.

В качестве другого количественного электрохимического метода используют различные варианты кондуктометрии. *Кондуктометрия* основана на измерении электропроводности анализируемых растворов, зависящей от природы электролита, его температуры и концентрации. Измерения можно проводить двумя методами: при постоянном напряжении на электроде и при включении измерительной ячейки в цепь переменного тока. В последнем случае различают низко- и высокочастотный методы. Низкочастотным методом анализируют растворы электролитов и неэлектролитов, которые образуют ионизованные комплексы (например, бораты сахаров) а также непроводящих веществ в проводящих растворителях. В этом методе применяют токи частотой от 60 до 1000 гц. Чувствительность метода ограничена помехами, возникающими вследствие колебания температуры из-за изменения проводимости раствора. Подобные колебания превышают подчас изменения температуры, вызванные вариацией состава раствора.

Высокочастотный метод можно использовать для определения непроводящих, но поляризуемых веществ. Он удобен тем, что можно не осуществлять прямого контакта электродов с определяемыми веществами: определяемое вещество, проходя между электродами, играющими роль обкладок конденсатора в контуре радиочастотного осциллятора, поглощает энергию, что приводит к изменению частоты колебаний. Этот метод использовали для определения различных органических веществ, в частности карбоновых кислот [5].

Кулонометрический метод основан на измерении количества электричества, израсходованного на электролиз определяемого вещества при постоянном потенциале, который соответствует потенциалу выделения данного элемента. Для количественного определения должны отсутствовать вторичные реакции. Кулонометрические детекторы применяют в основном для детектирования состава растворов, полученных вымыванием анализируемых веществ из слоя сорбента. Метод отличается высокой точностью [2].

Потенциометрический метод основан на измерении потенциала электрода, погруженного в раствор, в зависимости от концентрации и температуры определяемой смеси. С помощью этого метода можно анализировать растворы, получающиеся после жидкостного извлечения вещества из слоя сорбента. Потенциометрия стала широко применяться после разработки ионоселективных электродов, позволяющих определять вещества с высокой селективностью и низким пределом обнаружения (до 10^{-17} М) [6].

Несмотря на все достоинства электрохимических методов, их не применяют пока широко в лабораторной практике для количественной оценки тонкослойных

хроматограмм, но со временем, по-видимому, они будут использоваться наравне с оптическими и ядерно-физическими методами детектирования.

3. 1. 2. Ядерно-физические методы

Ядерно-физические методы детектирования в ТСХ основаны на регистрации элементарных частиц, испускаемых во время самопроизвольного распада неустойчивых изотопов одних химических элементов и превращения их в изотопы других элементов. Данные методы характеризуются высокой чувствительностью и хорошей воспроизводимостью. С помощью меченых соединений можно эффективно оценивать хроматографические методики. Ядерно-физические методы детектирования можно использовать применительно к радиоактивным веществам. Для количественной оценки нерадиоактивных веществ в их состав нужно вводить радиоактивные метки или превращать эти вещества в радиоактивные. Ряд разновидностей описываемого метода требует значительных затрат времени в связи со статистическим характером радиоактивного распада. Сорбент, растворители, материалы подложек и самих детекторов не должны содержать радиоактивных веществ. В ряде случаев возможно разложение самого анализируемого вещества под воздействием элементарных частиц. Однако, указанные методы детектирования характеризуются очень низким пределом обнаружения и высокой воспроизводимостью [7]. Предел обнаружения изменяется от метода к методу и в каждом из методов зависит от энергии элементарных частиц, условий хроматографического анализа и особенностей детектирующей системы.

3. 1. 3. Оптические методы

Оптические методы детектирования в ТСХ основаны на регистрации взаимодействия электромагнитного излучения с исследуемым веществом. Это взаимодействие можно рассматривать как процесс получения сигналов, содержащих качественную и количественную информацию о свойствах исследуемого вещества. Работа аппаратуры, используемой для оптического детектирования в ТСХ, основана на следующем принципе. Монохроматическое излучение пропускают через зону анализируемого вещества на тонком слое сорбента. Соотношение интенсивностей падающего и регистрируемого (отраженного, прошедшего сквозь ТСХ-систему, флуоресцентного или получившегося в результате гашения флуоресценции) излучения фиксируется приборами. В ряде случаев также учитывается соотношение частот излучений.

Оптические методы детектирования в ТСХ характеризуются высокой чувствительностью, многообразием способов осуществления и их комбинаций, возможностью качественной и количественной определения большого числа различных веществ [2].

Количественное детектирование тонкослойных хроматограмм *методом прямого фотометрического сканирования* является незаменимым инструментом в ежедневных массовых анализах, проводимых в лабораториях. В отличие от жидкостной колоночной хроматографии, которую в лабораториях целесообразно использовать для однотипных анализов, ТСХ с последующим фотометрическим детектированием можно применять для самых различных задач разделения. Несомненным достоинством этого метода является не зависимость показаний фотометрической детектирующей системы от состава элюента. В случае метода *пропускания* и *отражения*, по аналогии с фотометрией растворов количественное детектирование проводят путем измерения пропускания света. Однако соотношение между поглощением света и количеством вещества в пятне не является линейным из-за рассеивания света слоем сорбента. Поэтому для того чтобы количественно определить содержание вещества в пятне, измеряют интенсивность рассеянного и отраженного света. Чистый слой сорбента отражает практически весь падающий свет, тогда как пятна, содержащие анализируемые вещества, поглощают часть света. Интенсивность отраженного света при этом уменьшается в зависимости от количества вещества в пятне и длины волны падающего света. При измерениях по методу отражения предел обнаружения ниже, а воспроизводимость выше, чем в методе пропускания (что, в том числе, связано с влиянием на интенсивность пропущенного света толщины сорбента), и количественные измерения можно проводить в более широких пределах. Использование метода пропускания ограничено еще и тем, что материал подложки (в общем случае – стекло) и слой сорбента поглощают УФ-излучение. Поэтому измерение пропускания света с длиной волны меньше 325 нм возможно только в методе гашения флуоресценции. Измерения по методу отражения можно проводить во всей области спектра, т. е. и в области УФ-излучения, что имеет большое практическое значение [8].

Применяют также *метод прямого измерения интенсивности флуоресценции* и *гашения флуоресценции* для определения ТСХ-пятен веществ в тонком слое. В данных методах, в отличие от методов детектирования по пропусканию и отражению, измеряют излучение, длина волны которого отличается от длины волны облучающего излучения. Предел обнаружения всеми фотометрическими методами в основном определяется фоновым шумом, который определяется электрическим шумом детектора и выходной

цепи усилителя, и помехами, вызванными неоднородностью оптических свойств хроматограммы. Поэтому принципиальным преимуществом флуоресцентных методов является низкий уровень шума. Это делает флуоресцентные методы (все выше сказанное не распространяется на метод гашения флуоресценции) методы более перспективными, чем фотометрические, в связи с их простотой и отсутствием сложного оборудования [2].

Метод гашения флуоресценции, основанный на том, что анализируемые вещества в местах их локализации препятствуют возникновению флуоресценции индикатора, введенного в слой сорбента, в ряде случаев дает неудовлетворительные результаты детектирования. Флуоресцирующий слой сорбента создает дополнительные оптические помехи. Что и обуславливает увеличение предела определения и уменьшение точности анализа. По сравнению с методом отражения метод ослабления флуоресценции характеризуется более высоким уровнем фона, связанного с неоднородным распределением индикатора в слое сорбента. Данный метод проигрывает в селективности и чувствительности при определении веществ, максимум поглощения которых находится в УФ-области. Это связано с тем, что в описываемом методе возбуждающее излучение обычно не подстраивают к максимуму поглощения определяемого вещества [8]. Однако таким методом можно определить все ароматические вещества и вещества, содержащие сопряженные C=C двойные связи. Предел детектирования в зависимости от вещества составляет до 0,5 мкг на хроматографическую зону. Возможно проведение количественных измерений с использованием спектрофотометров. В этом случае явление флуоресценции представляет собой лишь косвенное измерение поглощения и этот метод может быть таким же чувствительным, как и прямое измерение поглощения вещества. Поэтому лишь в некоторых случаях предпочтение может быть отдано измерению поглощения непосредственно в максимуме поглощения [9].

С точки зрения количественного детектирования *метод прямого измерения интенсивности флуоресценции* обладает рядом существенных преимуществ по сравнению с методом ослабления флуоресценции:

- * повышенной селективностью, так как в смесях веществ детектируют только флуоресцирующие вещества; по сравнению с методами измерения интенсивности поглощения имеется более широкий выбор условий возбуждения флуоресценции и детектирования флуоресцентного излучения;

- * более высокой чувствительностью (предел обнаружения ниже в 10 – 1000 раз);

- * широким интервалом линейной зависимости между количеством вещества в пятне и интенсивностью флуоресценции;

* результаты детектирования флуоресцентного излучения не зависят от формы пятна [8].

Независимость результатов детектирования от формы зоны является важным фактором при исследовании экстрактов. В этих условиях становится возможным получение дополнительной информации за счет сравнения пятен, полученных при одномерном и двумерном разделении.

Оптимальная величина воспроизводимости зависит от метода фотометрического детектирования, точности функционирования механической системы сканирования, уровня электрических шумов в электронной схеме фотометра, воспроизводимости нанесения пробы и хроматографического разделения, включая в случае необходимости операцию проявления хроматограммы.

Исходя из этих условий, денситометр для сканирования хроматограмм должен удовлетворять ряду требований:

* в его конструкции следует предусмотреть возможность быстрого настраивания на проведение нужного метода детектирования: в отраженном свете, в отраженном и проходящем свете (одновременно), флуоресценции;

* денситометр должен иметь монохроматор для того, чтобы оператор при решении очередной задачи мог выбрать соответствующую длину волны излучения и выделить участок спектра излучения веществ, находящихся на пластинке;

* механическая система денситометра должна быть точно отлажена для получения воспроизводимого сканирования проб;

* оптическая система должна быть тщательно отрегулирована, в электронных схемах с низким уровнем шума следует предусмотреть значительное усиление измеряемого сигнала;

* управление прибором должно быть простым и занимать мало времени [8].

3. 2. Объединение ТСХ с другими хроматографическими методами

В настоящее время объединение аналитических методов является перспективным. В этом случае, благодаря сочетанию преимуществ этих методов, возможно повысить точность и чувствительность анализа. Сочетание ТСХ с другими хроматографическими методами оказывается очень результативным.

В связи с многообразием аналитических задач перспективны методы сочетания газовой хроматографии, колоночной хроматографии и ТСХ для разделения, идентификации и количественного определения состава анализируемых веществ.

При сочетании ТСХ и ГХ производят термическую десорбцию анализируемых веществ и детектируют образовавшиеся газовые смеси детекторами, используемыми в ГХ. Однако переводить анализируемые вещества в газовую фазу можно и в процессе проведения разделения. Был предложен оригинальный метод непрерывного отбора элюата из ТСХ-систем и одновременного его испарения за счет создания разрежения.

При анализе некоторых смесей веществ в случае изменения экспериментальной установки сочетанием ТСХ - ГХ можно не только окончательно детектировать вещества, но и дополнительно разделять их. Сочетанием ТСХ – ГХ можно количественно детектировать, а также идентифицировать и подтверждать присутствие в смесях определенных компонентов [2,3].

Эффективность газохроматографического разделения подчас снижается, когда в анализируемых смесях присутствуют компоненты с близкими свойствами, что приводит к наложению ГХ-пиков. В ТСХ, электрофорезе и хроматографии на бумаге часто используют двумерное разделение, позволяющее эффективно разделить большинство веществ. Использование в ГХ двух или более стационарных фаз в одном определении также можно рассматривать, как дву- или многомерное разделение.

Разделение методом ТСХ анализируемых веществ слабо зависит от давления их паров. Следует учитывать, также, что полярность адсорбентов намного выше, чем полярность большинства стационарных жидких фаз, используемых в ГХ. Поэтому разделение на тонком слое зависит в основном от типа функциональных групп, стерических затруднений, а молекулярный вес играет второстепенную роль. В ГЖХ при использовании неполярных стационарных фаз разделение в первом приближении основывается на различии в молекулярном весе и на дисперсионном взаимодействии молекул [6].

Использование ГЖХ в качестве подготовительной стадии для ТСХ открывает дополнительные возможности для разделения и идентификации сложных смесей разнородных веществ. После этого комплексного разделения можно извлекать определяемые соединения из слоя сорбента и, случае необходимости, дальше разделять на ГХ-колонках с другой системой селективных стационарных фаз. В дополнение к обычным методикам детектирования в описываемом сочетании возможно использование кристаллографического определения природы того или иного выделенного компонента смеси.

Одной из сложных проблем, возникающих при сочетании двух методов, является количественный перевод вещества из парообразного состояния в адсорбированное при комнатной температуре в условиях значительного перепада температур. При сочетании КЖХ с ТСХ также возникает проблема, связанная с малой емкостью ТСХ-пластины по отношению к объему элюата, выходящего из колонки; эту проблему пытаются разрешить, нанося на ТСХ-пластину только часть потока элюата или оперативно испаряя элюент. Соединительные линии между двумя системами должны иметь минимальный объем для уменьшения размывания. Поэтому используют капиллярные трубки, по которым с большой скоростью движется элюат. Температура коммуникации должна быть такой, чтобы в ней не происходило фазовых переходов низко- или высококипящих веществ. Должны отсутствовать также местные перегревы, ведущие к разложению определяемых соединений. Материал капилляра должен быть инертным по отношению к веществам, проходящим через него[2,8].

ТСХ также используют для быстрого подбора состава элюента и сорбирующего материала применительно к КЖХ или для дополнительного разделения фракций анализируемых веществ, отбираемых из колонки. Однако эти два метода могут сочетаться в плане взаимного использования детектирующих систем. Методы детектирования ТСХ органически сочетаются с предварительным колоночным разделением. Такое сочетание представляется перспективным в связи с широкими аналитическими возможностями детектирующих систем в ТСХ. Во многих случаях тонкий слой сорбента является идеальным транспортным средством для объединения колонки с детектором, именно этим способом наиболее просто решаются проблемы сочетания двух систем в одну[2].

Соединение методов ТСХ и КЖХ позволяет использовать преимущества обоих методов (экспрессивность и четкость колоночного разделения и возможности непосредственного воздействия на разделенные соединения в методе ТСХ) для количественного определения веществ и их идентификации [3].

При сочетании ТСХ и последующих ГХ или ЖХ основными отрицательными чертами являются: возможные потери веществ; высокая температура анализа; часто не количественный перевод вещества из слоя сорбента в газовую фазу или раствор. Человеческий глаз может обнаружить на ТСХ-пластинке в лучшем случае около 1 – 10 мкг окрашенных компонентов с воспроизводимостью не более чем 10 – 30 %. Удаление с пластинки разделенных пятен, содержащих анализируемые вещества, элюирование их с сорбента и определение при помощи фотометрии раствора требуют много времени и не обеспечивают достаточной правильности. Свой вклад в проблему вносят также трудность точного определения края пятна при визуальном наблюдении, неполное элюирование

пробы с сорбента и неспецифическое фоновое поглощение из-за присутствия коллоидных частиц сорбента в анализируемом растворе. Кроме того, описанный выше процесс слишком не удобен для того, чтобы рассматривать его в качестве приемлемого способа детектирования при высокоскоростном хроматографическом методе. Аппаратура для определения веществ непосредственно на ТСХ-хроматограммах впервые появилась в 1967 г. и в настоящее время считается необходимой для правильного определения размеров и положения пятна, точного измерения разрешения, быстрого и правильного количественного анализа [2,8].

4. Экспериментальная часть

4. 1. Приборы и реактивы

В качестве исследуемого соединения нами был выбран лекарственный препарат Анафранил (химическое название 3-Хлор-5-[3-(диметиламино)пропил]-10,11-дигидро-5Н-дибензо(b, f)-азепин).

Концентрация стандартного раствора Анафранила в гексане была 4.9 мкг/мкл. Растворы с меньшими концентрациями готовили последующим разбавлением.

В качестве подвижной фазы для элюирования использовали смесь ацетон-хлороформ-метанол-третбутиламин (2:7:1:0.2) [10]. Для нанесения пробы на ТСХ-пластины использовали микрошприцы объемом 1 и 10 мкл (Hamilton, США). Хроматографическое разделение проводили в вертикальной камере (Ленхром, Россия) на пластинах Merck F-254 с зоной концентрирования (Merck, Германия). Размер пластин 10×20 см, подложка стеклянная. Денситометрические измерения проводились на денситометре Camage TLC Scanner 3 с использованием программного обеспечения “Cats 4” (Camage, Швейцария). Измерения проводились в абсорбционном режиме сканирования ($\lambda = 254$ и 400 нм) с использованием дейтериевой и ртутной ламп в качестве источников излучения.

4. 2. Построение градуировочного графика

Измерения в тонком слое, необходимые для построения градуировочного графика, проводили в следующих условиях: ширина щели монохроматора 5 нм, размеры сканирующей щели 6.0×0.45 мм, скорость сканирования 5 мм/с, разрешение 100 мкм. Эти параметры автоматически устанавливает программа денситометра при начале сканирования в УФ-области. В качестве источника излучения использовали дейтериевую лампу, хроматографические зоны сканировали в режиме абсорбция/отражение.

На стартовую линию тонкослойной хроматографической пластинки наносили аликвоты ($V = 3 - 4$ мкл с концентрацией $C = 4.9 \cdot 10^{-8}$ г/мкл и $V = 1 - 5$ мкл с концентрацией $C = 4.9 \cdot 10^{-7}$ г/мкл). Элюирование проводили в указанной подвижной фазе, затем пластины сушили в потоке теплого воздуха и сканировали хроматограммы в условиях, указанных выше. Результаты измерений приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Данные для построения градуировочного графика Анафранила

C, мкг/зона	S пика, AU.
0,0147	151,5
0,0196	268,5
0,049	1305,6
0,098	726,0
0,147	1717,0
0,196	5880,3
0,245	75850,1

Полученные результаты аппроксимируются к прямой, задающейся уравнением $S = 31950 \cdot C - 319.05$, с коэффициентом сходимости равным $R^2 = 0.9998$. Градуировочный график представлен на Рис. 1.

4. 3. Определение оптимальных значений параметров сканирования в режиме абсорбции при определении концентрации вещества в пятне

На стартовую линию тонкослойной хроматографической пластинки нанесли аликвоту раствора Анафранила определенной концентрации. Затем, после хроматографирования в подвижной фазе, провели денситометрическое сканирование, изменяя значения параметров сканирования.

4. 3 .1. Определение оптимальной ширины щели монохроматора

Сканирование проводили при постоянных значениях скорости сканирования (5 мм/с) и размеров сканирующей щели (3.0×0.1 мм). Результаты сканирования приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Зависимость определяемого количества вещества в хроматографической зоне от ширины щели монохроматора

Ширина щели монохроматора, нм	S _{пика} , AU	C, мкг/зона
5	4808,2	0,1605
20	4652,1	0,1556

На основании полученных результатов, был сделан вывод, что оптимальным значением ширины щели монохроматора является 5 нм.

4. 3. 2. Определение оптимального значения скорости сканирования

Сканирование проводили при постоянных значениях ширины щели монохроматора (5 нм) и размеров сканирующей щели (3.0×0.1 мм). Результаты сканирования приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Зависимость определяемого количества вещества в хроматографической зоне от скорости сканирования

Скорость сканирования, мм/с	S _{пика} , AU	C, мкг/зона
0.5	5153,0	0,1713
1	5103,1	0,1697
5	5061,6	0,1684
10	5047,0	0,1680
20	5060,1	0,1684
40	5053,4	0,1682
80	5153,9	0,1713
100	5226,2	0,1736

Полученные данные свидетельствуют о наличии зависимости между значением площади пика (следовательно, и определяемого количества вещества) и скорости сканирования. Данная зависимость представлена на Рис. 2. Из рисунка видно, что кривая имеет два максимума при минимальном и максимальном значениях скорости сканирования. Наиболее оптимальным из них является 100 мм/с. Однако в случае, если необходимо не только провести количественное определение, но и добиться максимального разрешения близлежащих пиков, значение 0.5 мм/с оказывается более предпочтительным (вывод сделан на основе нижеследующих экспериментов, см. Часть 4.4).

4. 3. 3. Определение оптимальных значений размеров сканирующей щели

Сканирование проводилось при постоянных оптимальных значениях скорости сканирования (100 мм/с) и ширины щели монохроматора (5 нм). Результаты приведены в Таблице 4.

Таблица 4. Зависимость определяемого количества вещества в хроматографической зоне от размеров сканирующей щели

№ группы	Размеры сканирующей щели, мм	S _{пика} , AU	C, мкг/зона
1	12,0×0,9	1363,4	0,0527
	12,0×0,6	1386,3	0,0534
	12,0×0,4	1349,5	0,0522
	12,0×0,2	1406,9	0,0540
2	10,0×0,9	1512,2	0,0573
	10,0×0,6	1599,9	0,0601
	10,0×0,4	1529,5	0,0579
	10,0×0,2	1649,1	0,0616
3	8,0×0,9	1876,2	0,0687
	8,0×0,6	1955,8	0,0712
	8,0×0,4	1929,8	0,0704
	8,0×0,2	1951,7	0,0711
4	6,0×0,9	2526,8	0,0891
	6,0×0,6	2580,8	0,0885
	6,0×0,45	2679,4	0,0938
	6,0×0,4	2452,7	0,0868
	6,0×0,3	2557,0	0,0900
	6,0×0,2	2578,7	0,0907
	6,0×0,1	2614,1	0,0918
5	5,0×0,45	3243,2	0,1115
	5,0×0,3	3296,9	0,1113
	5,0×0,2	3067,0	0,1060
	5,0×0,1	3112,6	0,1074
6	4,0×0,45	3933,5	0,1331
	4,0×0,3	3852,4	0,1306
	4,0×0,2	3821,4	0,1296
	4,0×0,1	3854,0	0,1306
7	3,0×0,45	4775,3	0,1594
	3,0×0,3	4779,9	0,1596
	3,0×0,2	4661,5	0,1559
	3,0×0,1	4691,9	0,1568
8	2,0×0,2	5206,0	0,1729
	2,0×0,1	5577,0	0,1845
9	1,0×0,2	5459,3	0,1809
	1,0×0,1	6322,3	0,2079
10	0,5×0,2	5962,3	0,1966
	0,5×0,1	6263,7	0,2060
11	0,25×0,1	6365,0	0,2092

Строго говоря, существует основное правило выбора сканирующей щели при точечном нанесении раствора на хроматографическую пластину. Ее длина должна быть

чуть больше диаметра пятна с тем, чтобы закрывать его целиком. При Сканирующая щель изменяется следующим образом. Существует 11 предлагаемых длин щелей: значения 12, 10 и 8 мм относятся к макро-группе, значения 6 – 1, 0.5 и 0.25 мм – к микро-группе. Для каждой длины щели имеется несколько (от одного до семи) вариантов ширины. Как видно из Таблицы 4, внутри каждой группы размеров происходят изменения определяемой площади пика в зависимости от ширины щели. Так, например, в группах № 1 – 3 максимальная площадь пика достигается при значениях ширины щели 0.6 и 0.2 мм. В самой большой группе – № 4 – наблюдается резкий максимум определяемой площади при щели с параметрами 6.0×0.45 мм. Щель с такими параметрами выставляется программой по умолчанию. В группах № 5 – 7 различия не столь заметны, однако увеличение определяемой площади пика наблюдается при значениях ширины щели 0.45 и 0.3 мм. В предпоследних трех группах закономерность меняется: чем уже щель, тем больше площадь пика. В группу № 11 входит только один вариант параметров сканирующей щели, равный 0.25×0.1 мм. Он и является наиболее оптимальным для определения количества вещества в хроматографической зоне. Следует отметить, что при значениях данного параметра в диапазоне 2.0×0.1 – 0.25×0.1 мм колебания базовой линии на денситограмме резко увеличиваются.

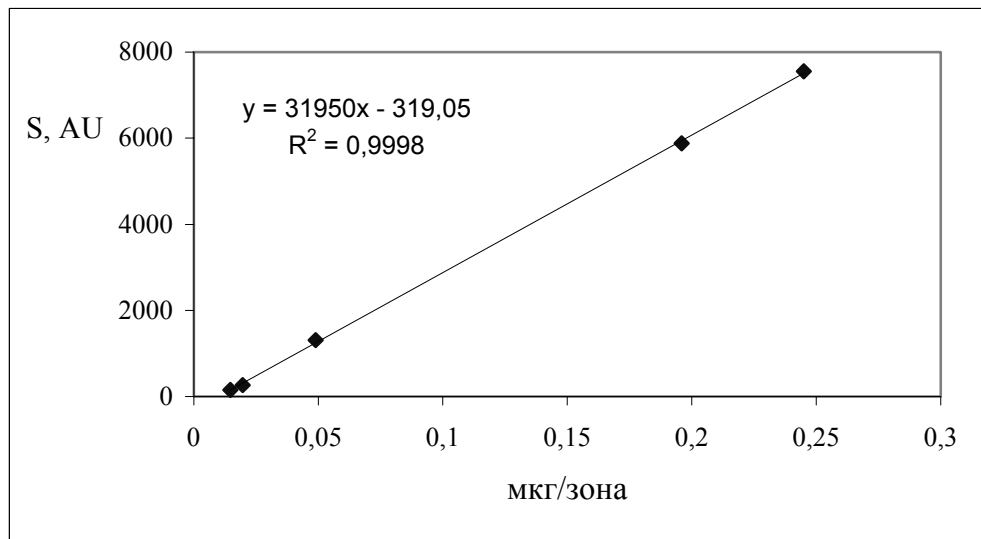


Рис. 1. Зависимость площади пика от количества Анафранила в хроматографической зоне

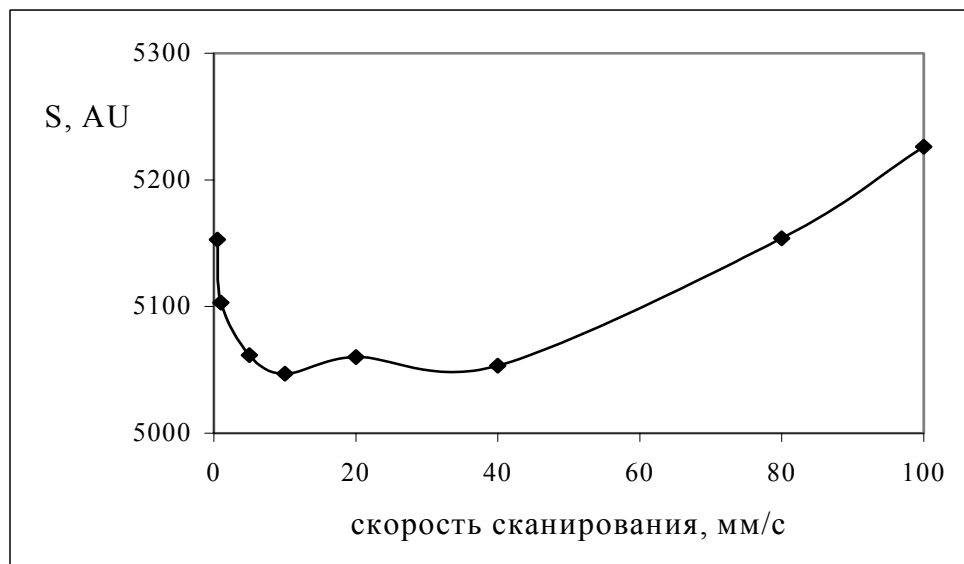


Рис. 2. Зависимость площади пика от скорости сканирования

4. 4. Определение оптимальных значений параметров сканирования в режиме абсорбции для максимального разрешения пиков на хроматограмме

При определении оптимальных значений параметров сканирования для разрешения близколежащих пиков выводы делали на основании результатов сканирования бумажного листа с нанесенными на него черными линиями различной толщины, расположенными на определенном расстоянии друг от друга. Четыре линии толщиной 0,2 мм на расстоянии 1 мм друг от друга, две линии толщиной 0,5 мм на расстоянии 2 мм и две линии толщиной 1 мм на расстоянии 5 мм. Внешний вид листа представлен на Рис. 3. Денситометрическое сканирование проводили при различных значениях параметров прибора с использованием в качестве источника излучения ртутную лампу ($\lambda = 400$ нм).

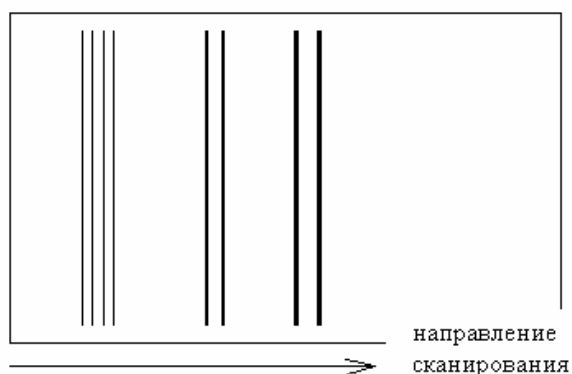


Рис. 3. Внешний вид листа, используемого для определения оптимальных условий разрешения соседних хроматографических пиков

4. 4. 1. Определение оптимального значения ширины щели монохроматора

Сканирование проводили при постоянных значениях размеров сканирующей щели (6.0×0.45 мм) и скорости сканирования (100 мм/с). Последняя (дальняя) группа из 2-х полос разделялась при всех условиях, поэтому в таблицах под названием «последние два пика» подразумевалась средняя группа полос (см. Рис. 3). Результаты сканирования приведены в Таблице 5.

Таблица 5. Зависимость разрешения соседних пиков на хроматограмме от ширины щели монохроматора

Ширина щели монохроматора, нм	Разрешение, %.	
	первые четыре пика	последние два пика
5	40	85
20	40	85

Из полученных данных следует, что изменение ширины щели монохроматора существенно не влияет на разрешение, так как видимых изменений нет. Для дальнейших исследований было выбрано значение 5 нм, поскольку это значение автоматически выставляет программа денситометра.

4. 4. 2. Определение оптимального значения скорости сканирования

Сканирование проводили при постоянных значениях размеров сканирующей щели (6.0×0.45 мм) и ширины щели монохроматора (5 нм). Результаты сканирования приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Зависимость разрешения соседних пиков на хроматограмме от скорости сканирования

Скорость сканирования, мм/с	Разрешение, %	
	первые четыре пика	последние два пика
0.5	95	100
1	95	100
5	93	98
10	90	98
20	85	98
40	80	98
80	60	95
100	40	85

Из Таблицы 6 видно, что чем выше скорость сканирования, тем хуже разрешение хроматографических пиков. Поэтому оптимальной скоростью сканирования в данном случае является 0.5 – 1 мм/с.

4. 4. 3. Определение оптимального значения размеров сканирующей щели

Сканирование проводили при постоянных значениях ширины щели монохроматора (5 нм) и скорости сканирования (0.5 мм/с). Результаты сканирования приведены в Таблице 7.

Таблица 7. Зависимость разрешения соседних пиков на хроматограмме от размеров сканирующей щели

№ группы	Размеры сканирующей щели, мм	Разрешение, %	
		первые четыре пика	последние два пика
1	12,0×0,9	70	98
	12,0×0,6	85	98
	12,0×0,4	95	99
	12,0×0,2	95	99
2	10,0×0,9	70	98
	10,0×0,6	85	98
	10,0×0,4	95	98
	10,0×0,2	95	98
3	8,0×0,9	70	98
	8,0×0,6	80	97
	8,0×0,4	95	97
	8,0×0,2	95	97
4	6,0×0,9	65	95
	6,0×0,6	80	97
	6,0×0,45	90	95
	6,0×0,4	93	97
	6,0×0,3	93	97
	6,0×0,2	95	97
	6,0×0,1	95	98
5	5,0×0,45	92	97
	5,0×0,3	95	97
	5,0×0,2	95	98
	5,0×0,1	97	95
6	4,0×0,45	93	97
	4,0×0,3	93	95
	4,0×0,2	93	95
	4,0×0,1	95	98
7	3,0×0,45	92	96
	3,0×0,3	92	94
	3,0×0,2	93	95
	3,0×0,1	95	97
8	2,0×0,2	92	97
	2,0×0,1	95	97
9	1,0×0,2	92	96

№ группы	Размеры сканирующей щели, мм	Разрешение, %	
		первые четыре пика	последние два пика
9	1,0×0,1	92	95
10	0,5×0,2	90	95
	0,5×0,1	90	92
11	0,25×0,1	88	93

На основании полученных данных можно сделать вывод, что при изменении длины сканирующей щели разрешение практически не изменяется, но изменение ширины влияет на разрешение. Чем уже сканирующая щель, тем лучше разрешение пиков. Следует отметить, что, при уменьшении ширины щели, пики, соответствующие линиям толщиной 0,2 мм, расположенным на расстоянии 1 мм, становятся более отчетливыми, а соответствующие линиям толщиной 0,5 мм, расположенным на расстоянии 2 мм – более размытыми. При размерах щели, находящихся в диапазоне 2.0×0.2 – 0.25×0.1 мм, достаточно велика погрешность фона (наблюдаются большие отклонения базовой линии), однако все пики выражены четко. Результаты сканирования полос при автоматически выставленных параметрах и выбранных оптимальных значениях представлены на Рис. 4 и 5.

Таким образом, при определении концентрации вещества в пятне, денситометрическое сканирование следует проводить при ширине щели монохроматора 5 нм, ширине сканирующей щели 3.0×0.1 мм и скорости сканирования 100 мм/с. Для максимального разрешения близлежащих пиков, значения первых двух параметров следует оставить такими же, а значение скорости сканирования изменить на минимальное.

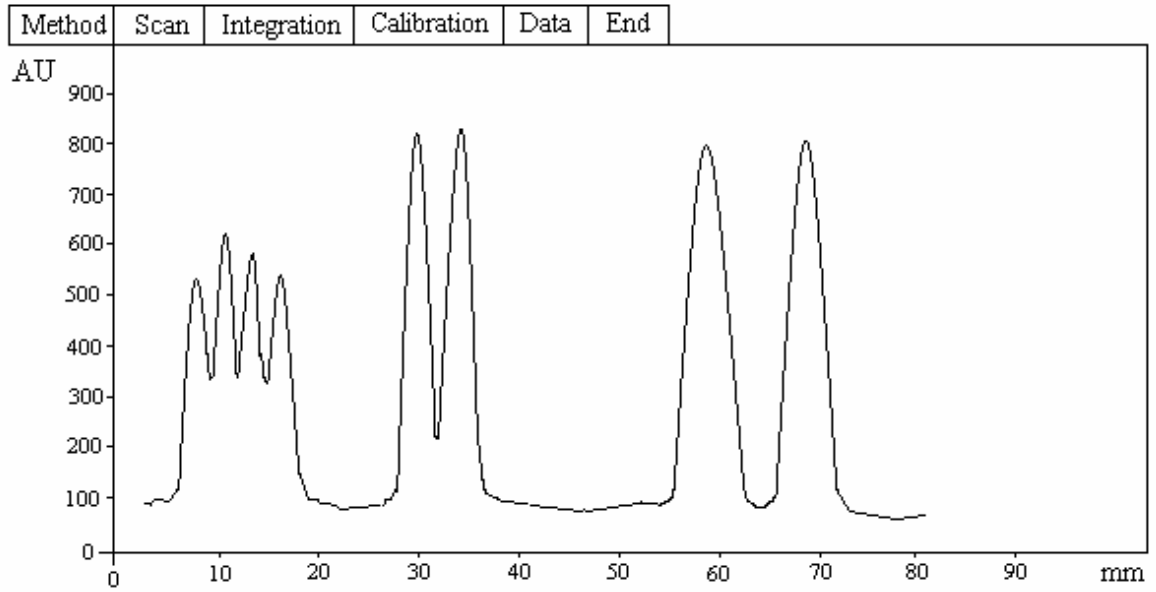


Рис. 4. Денситограмма бумажного листа с черными линиями при автоматически выставленных параметрах сканирования

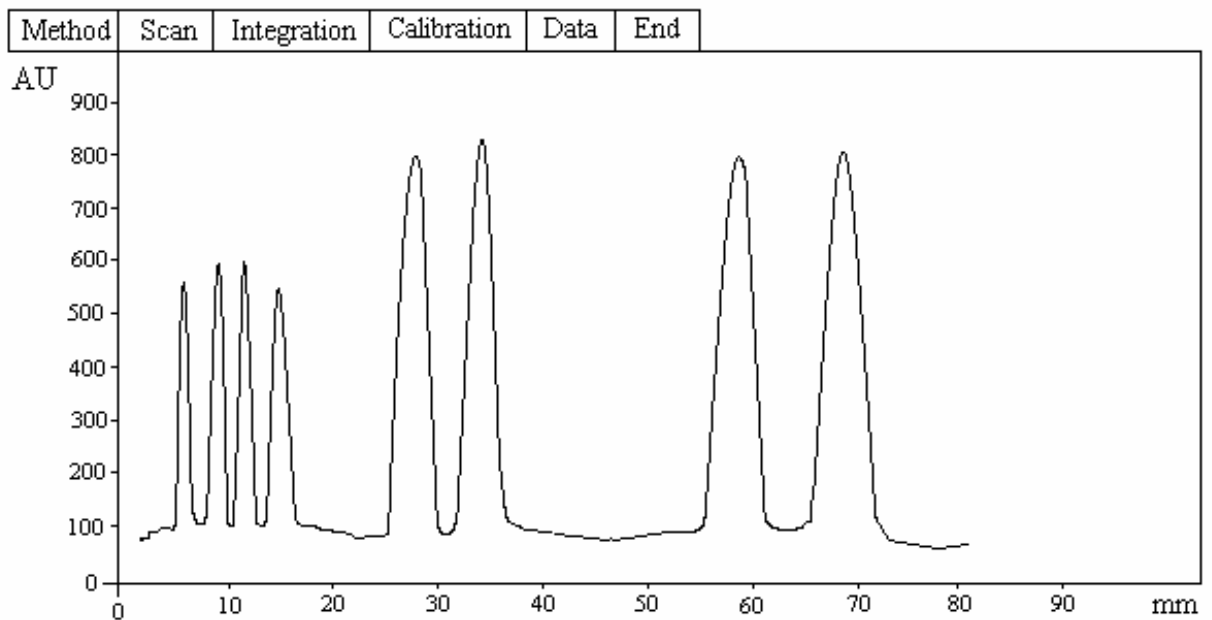


Рис. 5. Денситограмма бумажного листа с черными линиями при определенной оптимальной скорости сканирования

5. Выводы

1. Построена градуировочная зависимость концентрации вещества в зоне от площади пика на хроматограмме.
2. Изучено влияние изменения параметров прибора при проведении денситометрического сканирования на величину определяемой концентрации и разрешение.
3. Определены оптимальные значения параметров прибора, при которых следует проводить денситометрическое сканирование хроматографических пластин в случаях: определения концентрации вещества, максимального разрешения близлежащих пиков на хроматограмме.

6. Список литературы

-
- [1] Другов Ю. С., Экологическая аналитическая химия, М.: 2000, 432 с.
- [2] Березкин В. Г., Бочков А. С., Количественная тонкослойная хроматография, М.: Наука, 1980, 183 с.
- [3] Фридрих Гейсс, Основы тонкослойной хроматографии, М.: 1999, т.1, 403 с, т.2 ,348 с.
- [4] Oelschlager H., Lumbantoruan S., Volke J., Kraft G. – Z, Anal. Chem, 1976, vol. 23, p. 279.
- [5] Mangravite R. V., Anal. Chem., 1968, vol. 40, p.250.
- [6] Polesuk J., Howery D. G., J. Chromatogr. Sci., 1973, vol. 11, p. 230.
- [7] Шеллард Э., Количественная хроматография на бумаге и тонком слое, М.: Мир, 1971, с. 174.
- [8] Златкис А., Кайзер Р., Высокоэффективная тонкослойная хроматография, М.: Мир, 1979, с. 173 – 216.
- [9] Под редакцией проф. Ларионова О. Г., Руководство по современной тонкослойной хроматографии, М.:1994, 311 с.
- [10]. A., Chromatogr. Sci., vol. 39, p. 293-296.