ГОСТ 28365—89

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

РЕАКТИВЫ

МЕТОД БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2008

УДК 54-41:543.544:006.354 Группа Л59

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

РЕАКТИВЫ

Метод бумажной хроматографии

Reagents. Method of paper chromatography

ГОСТ 28365—89

МКС 71.040.30
ОКСТУ 2609

Дата введения 01.01.91

Настоящий стандарт распространяется на химические реактивы и устанавливает метод проведения испытания, основанный на бумажной хроматографии.

Термины, применяемые в стандарте, и их пояснения приведены в приложении 2. Рекомендуемые области применения метода приведены в приложении 3.

1. ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1. При проведении испытаний должны быть соблюдены требования ГОСТ 27025.

1.2. В нормативно-технической документации на испытуемый реактив должны быть указаны следующие данные:

1.2.1. Описание приготовления испытуемого раствора.

1.2.2. Предварительная обработка (при необходимости).

1.2.3. Используемые растворители (или смесь).

1.2.4. Применяемые реактивы и растворы.

1.2.5. Способ хроматографирования.

1.2.6. Тип хроматографической бумаги, необходимость предварительной пропитки бумаги, пропитывающие растворы, продолжительность сушки после пропитки (при необходимости).

1.2.7. Время насыщения хроматографической камеры парами подвижной фазы.

1.2.8. Объем испытуемого раствора, наносимый на бумагу.

1.2.9. Температура, при которой проводят хроматографирование (при необходимости).

1.2.10. Критерии окончания процесса хроматографирования.

1.2.11. Способ проявления хроматограмм и реагенты для проявления (при необходимости).

1.2.12. Способ оценки хроматограмм.

1.2.13. Вещества сравнения, используемые для оценки (при необходимости).

1.2.14. Аппаратура для количественной оценки разделенных компонентов (при необходимости).

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод заключается в разделении на хроматографической бумаге смеси веществ в потоке растворителя, основанном на различной скорости перемещения компонентов смеси.

3. АППАРАТУРА И МАТЕРИАЛЫ

3.1. Камера (сосуд) хроматографическая, закрытая герметичной крышкой.

3.2. Лампа ультрафиолетовая для обнаружения веществ с использованием флуоресценции при длине волны от 254 до 366 нм.

3.3. Микропипетка вместимостью 0,002—0,010 $см^3$ или микрошприц вместимостью не более 0,01 $см^3$.

3.4. Пульверизатор для распыления проявителя.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1990
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2008

3.5. Бумага хроматографическая.
3.6. Денситометр.
3.7. Устройство для сканирования пятен на бумаге.

4. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

4.1. Подготовка хроматографической бумаги

В зависимости от размеров хроматографической камеры из хроматографической бумаги вырезают полоски с ровной или зубчатой кромкой или кружки соответствующих размеров, на которых мягким карандашом обозначают пробу, систему растворителей, дату и линию старта с точками для нанесения пробы. Рекомендуемое расстояние между точками для нанесения пробы 20—30 мм, расстояние от линии старта до кромки бумаги — 30 мм.

При необходимости перед испытанием бумагу обрабатывают специальным раствором и высушивают при комнатной температуре в вертикальном положении стартом вниз.

4.2. В точки, отмеченные на линии старта, наносят с помощью калиброванной микропипетки или микрошприца 0,002—0,010 $см^3$ испытуемого раствора, если в нормативно-технической документации на испытуемый реактив нет других указаний. При необходимости в точки на линии старта наносят таким же образом растворы веществ, соответствующих предполагаемым компонентам смеси, для идентификации и количественной оценки этих примесей. Допускается наносить пробу не в виде точки, а чертой с применением микропипетки или капилляра. После нанесения пробы на непропитанную бумагу растворителю дают свободно испариться. Если проба не содержит летучих компонентов, а бумага не пропитана органической неподвижной фазой, испарение растворителя можно ускорить струей горячего воздуха. Бумагу с нанесенной пробой помещают в хроматографическую камеру (пропитанные бумаги помещают в камеру сразу после нанесения раствора пробы).

При круговой хроматографии пробы наносят на окружность, описанную на расстоянии нескольких сантиметров от центра хроматограммы.

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

5.1. Хроматографирование

Хроматографическое разделение веществ проводят в хроматографической камере, в замкнутой системе, насыщенной парами подвижной фазы, при температуре, указанной в нормативно-технической документации на испытуемый реактив, поместив эту фазу в чашку на дно камеры. Если в нормативно-технической документации на испытуемый реактив нет других указаний, хроматографирование заканчивают, когда фронт подвижной фазы достигнет определенного расстояния от старта, например 250 мм. Хроматографирование проводят одним из указанных ниже способов.

5.1.1. Нисходящая хроматография

В камере для нисходящей хроматографии должен быть желобок или лодочка. Конец листа хроматографической бумаги с нанесенными пробами, ближний к линии старта, дважды перегибают, помещают в желобок или лодочку, закрепляют стеклянной палочкой, как показано на черт. 5 приложения 1. Затем в желобок помещают подвижную фазу.

5.1.2. Восходящая хроматография

Хроматографическую бумагу подвешивают в хроматографической камере так, чтобы ее нижний конец был погружен в слой подвижной фазы на дне сосуда, как показано на черт. 4 приложения 1, а уровень подвижной фазы находился на 10 мм ниже линии старта.

5.1.3. Горизонтальная хроматография

Испытания проводят, как показано на черт. 2 приложения 1.

5.1.4. Круговая хроматография

При круговой хроматографии подвижную фазу помещают в середину хроматограммы, откуда она передвигается к периферийной части, как показано на черт. 3 приложения 1. В качестве хроматографической камеры допускается использовать две чашки Петри или эксикатор.

5.1.5. Проточная хроматография

Если хроматографируемые вещества имеют в определенной системе низкие значения R_f, нижнюю кромку нисходящей хроматограммы делают зубчатой. Когда подвижная фаза достигнет конца хроматограммы, разделение продолжают так, чтобы элюирующий растворитель стекал по каплям на дно камеры.

5.1.6. Повторная хроматография

Метод, при котором по завершении первого продвижения подвижной фазы хроматограмму высушивают и хроматографирование повторяют (возможно несколько раз).

5.1.7. Многомерная хроматография

Метод, при котором по завершении первого продвижения подвижной фазы хроматограмму поворачивают (например, под углом 90°) и снова проводят хроматографирование. Перед повторным хроматографированием испаряют подвижную фазу.

5.2. Сушка хроматограмм

По окончании разделения хроматограмму вынимают из камеры и отмечают фронт мягким карандашом, после чего сушат при комнатной температуре в вертикальном положении, стартом вниз. Продолжительность сушки зависит от скорости испарения подвижной фазы и химической стабильности хроматографируемых веществ.

5.3. Проявление хроматограмм

Проявление компонентов на хроматограмме проводят одним из способов, приведенных ниже.

5.3.1. Физические методы

Визуально, при дневном свете, отмечают на хроматограмме положение пятен — цветных веществ. При наличии флуоресцирующих веществ проявление проводят в УФ-свете.

5.3.2. Химические методы

Хроматограммы проявляют жидкими и газообразными проявителями, используя реакцию имеющихся на хроматограмме соединений с подходящим реагентом-проявителем с образованием окрашенного или флуоресцирующего вещества. Жидкие проявители наносят пульверизатором или используют реагенты в аэрозольной упаковке, газообразные применяют, поместив хроматограмму в пары проявителя.

5.3.2.1. Хроматограмму кладут горизонтально на лист фильтровальной бумаги или оставляют подвешенной на стеклянной палочке и опрыскивают как можно более мелкими каплями (туманом) проявителя всю площадь хроматограммы вначале с одной, а потом с другой стороны.

5.3.2.2. При проявлении газообразным проявителем хроматограмму подвешивают в камере, в которую помещен летучий реагент (например, кристаллы йода), или на дне которой проявитель получают химическим путем (например, оксиды азота получают путем добавления твердого нитрита натрия к раствору соляной кислоты).

5.3.3. Биологические методы

Хроматограммы проявляют, используя биологическую активность хроматографируемых веществ.

6. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ

6.1. Качественная оценка хроматограммы заключается в определении положения пятна или полосы, которое характеризуется значением R_f.

$$R_f = \frac{a}{b},$$

где a — расстояние от центра пятна пробы до стартовой линии, мм;

b — расстояние от фронта растворителя до стартовой линии, мм,

или значением R_x:

$$R_x = \frac{a}{c},$$

где c — расстояние от центра пятна вещества сравнения до стартовой линии, мм.

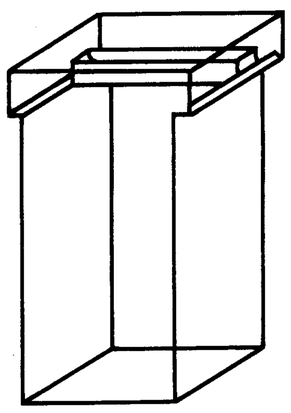
6.2. Определение количества искомого компонента в пробе проводят путем сравнения размеров и интенсивности окраски его пятна с пятнами вещества сравнения, нанесенными на бумагу в интервале значений концентрации, указанных в нормативно-технической документации на испытуемый реактив, и обработанными в условиях испытания. Оценку проводят визуально или с помощью аппаратуры (например, денситометра, устройства для сканирования пятен компонентов на бумаге), или путем элюирования пятен и последующего фотометрического определения оптической плотности растворов.

6.3. Хроматограммы хранят в условиях, препятствующих появлению взаимных оттисков хроматограмм (например, с прокладками из фильтровальной бумаги). Если характер пятен позволяет, то на хроматограммы наносят слой быстросохнущего лака. В случае необходимости проводят зарисовку контура хроматограммы или фотографирование.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Справочное

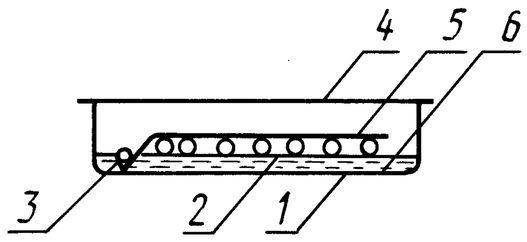
ПРИМЕРЫ ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И СПОСОБОВ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Камера для восходящей и нисходящей хроматографии



Черт. 1

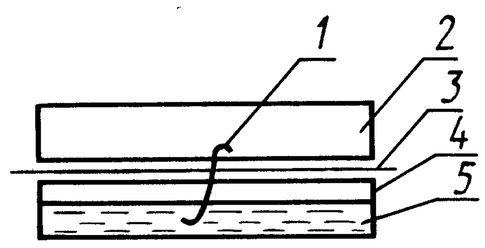
Камера для горизонтальной хроматографии



1 — камера; *2* — решетка из стеклянных палочек; *3* — стеклянная палочка для прижатия конца хроматограммы; *4* — крышка; *5* — хроматограмма; *6* — растворитель

Черт. 2

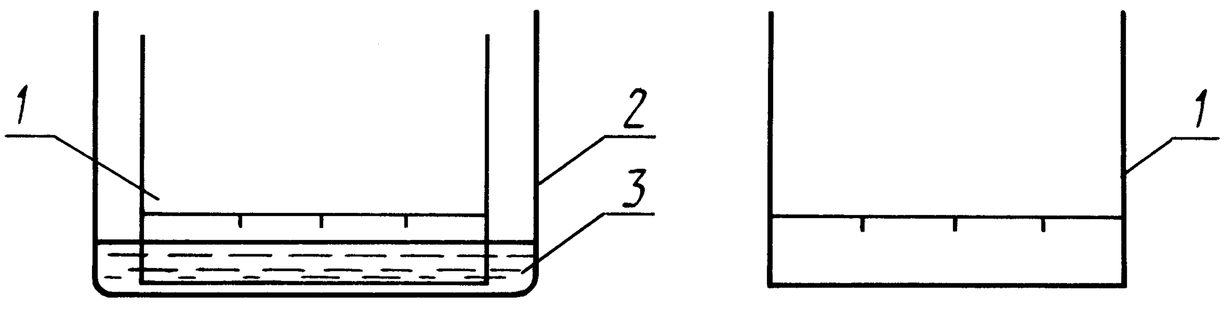
Камера для круговой хроматограммы (две чашки Петри)



1 — бумажный фитиль; *2*, *4* — чашки Петри; *3* — круговая хроматограмма; *5* — растворитель

Черт. 3

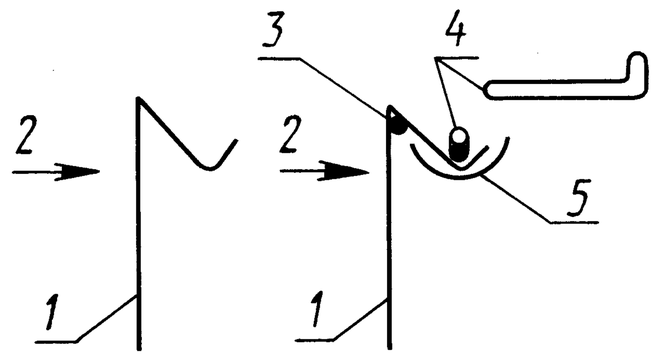
Способы расположения хроматограммы при восходящей хроматографии



1 — хроматограмма; *2* — хроматографическая камера; *3* — растворитель

Черт. 4

Способ вкладывания бумажной хроматограммы в желобок



1 — хроматограмма; *2* — старт; *3* — стеклянная палочка; *4* — загнутая палочка для прижатия хроматограммы в желобке; *5* — желобок

Черт. 5

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
Справочное

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термин	Пояснение
Бумажная хроматография	Физико-химический метод разделения на хроматографической бумаге смеси веществ между неподвижной фазой на носителе и подвижной фазой
Носитель	Хроматографическая бумага
Неподвижная (стационарная) фаза	Фаза, закрепленная на носителе
Подвижная (мобильная) фаза	Фаза, обеспечивающая перемещение разделяемых веществ по носителю с неподвижной фазой
Старт	Место, на которое наносится испытуемая проба
Хроматографирование	Прохождение подвижной фазы через носитель с неподвижной фазой и нанесенной пробой
Нисходящая хроматография	Метод, при котором подвижная фаза движется вниз
Восходящая хроматография	Метод, при котором подвижная фаза движется вверх
Горизонтальная хроматография	Метод, при котором подвижная фаза движется горизонтально
Круговая хроматография	Метод, при котором подвижная фаза движется из середины круга к его окружности
Проточная хроматография	Метод, при котором продвижение подвижной фазы продолжается и после достижения фронтом конца бумаги
Повторная хроматография	Метод, при котором по завершении первого продвижения подвижной фазы хроматограмму высушивают и хроматографирование повторяют (иногда несколько раз)
Проявление	Способ обнаружения веществ на хроматограмме
R_f	Величина, определяемая отношением расстояния от центра (концентрационного максимума) пятна или полосы до старта к расстоянию от фронта до старта
R_x	Величина, определяемая отношением расстояния от центра пятна или полосы испытуемого вещества до старта к расстоянию от центра пятна или полосы вещества сравнения до старта
Константа распределения (K_D)	Отношение концентрации вещества в неподвижной фазе к концентрации вещества в подвижной фазе: $$K_D = \frac{A_s}{A_m},$$ где A_s — концентрация вещества в неподвижной фазе; A_m — концентрация вещества в подвижной фазе

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
Рекомендуемое

ПРИМЕНЕНИЕ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. Доказательство присутствия ожидаемого вещества или его примеси, оценка хроматографической однородности, проводимая в сопоставлении с известным веществом сравнения.

2. Идентификация вещества, подтверждение идентичности испытуемого вещества с известным веществом.

При данных условиях для каждого соединения характерно определенное местонахождение на хроматограмме (R_f) и определенное поведение при проявлении (окраска, флуоресценция). Идентификацию проводят непосредственным сравнением пятен известного и испытуемого вещества на одной хроматограмме или элюированием вещества из хроматограммы и последующей идентификацией, например измерением соответствующего спектра.

3. Определение одного или более веществ в смеси, проводимое одним из следующих методов:

а) субъективной оценкой хроматограммы (например, с помощью калибровочной хроматограммы);

б) объективной оценкой хроматограммы;

в) последующим определением некоторых компонентов физико-химическим методом (например, по элюировании вещества с хроматограммы его определяют спектрофотометрически).

4. Установление структуры органических соединений. Сочетанием реакций разложения с хроматографической идентификацией продуктов этих реакций можно установить структуру молекулы.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. ВНЕСЕН Министерством химической промышленности СССР

2. Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 13.12.89 № 3708 стандарт Совета Экономической Взаимопомощи СТ СЭВ 6397—88 введен в действие непосредственно в качестве государственного стандарта СССР с 01.01.91

3. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 27025—86	1.1

5. ПЕРЕИЗДАНИЕ. Май 2008 г.