

PLANAR
CHROMATOGRAPHY
AND ANALYSIS
OF ORGANIC
COMPOUNDS

I. I. EVGENYEVA

One of modern analytical methods – the method of planar chromatography – is described. The capabilities of this method are illustrated with its applications for analysis of organic compounds.

Рассмотрен один из современных аналитических методов – метод планарной хроматографии. Возможности метода иллюстрированы его применением в анализе органических веществ.

ПЛАНАРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ И АНАЛИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

И. И. ЕВГЕНЬЕВА

Казанский государственный технологический университет

Разнообразие окружающих нас объектов в основном определяется органическими соединениями, имеющими различную природу и молекулярную массу. Наиболее волнующие проблемы экологии, качества пищевых продуктов, клинической диагностики также преимущественно связаны с необходимостью получать информацию о сложных по составу смесях органических веществ. К сожалению, знакомство школьников с методами определения состава природных объектов и содержания в них отдельных компонентов ограничивается отдельными пробирочными реакциями обнаружения неорганических веществ. Это связано с тем, что большинство современных физико-химических методов анализа малодоступны для школьных лабораторий. В то же время в их арсенале есть простой и доступный по эксперименту выполнения метод – планарная хроматография. Относительная дешевизна и доступность используемых реактивов и оборудования в сочетании с высокой информативностью и чувствительностью этого метода позволяют вовлечь в школьный лабораторный практикум объекты органического происхождения, в том числе и биохимические.

Планарная хроматография – один из вариантов хроматографических методов, основанных на избирательном распределении компонентов анализируемой смеси между двумя несмешивающимися фазами. Хроматографические методы различают по агрегатному состоянию подвижной (газ или жидкость) и неподвижной (жидкость или твердое тело) фаз. Основы одного из распространенных методов хроматографии (газожидкостной хроматографии) были описаны в [1].

Планарная хроматография – способ анализа, в котором процессы разделения смеси веществ осуществляются в плоском слое сорбента (неподвижной фазе). Она разделяется на бумажную и тонкослойную хроматографии. В первой в качестве сорбента используется специальная бумага, во второй процессы разделения происходят в тонких слоях сорбента, нанесенного на инертную твердую подложку, или в пленках пористого полимерного материала. Бумажная и тонкослойная хроматографии сходны по технике выполнения анализа. Тонкослойная хроматография (ТСХ), однако, заняла особое место среди других хроматографических методов благодаря

простоте методики и доступности оборудования, широкой области применения, высокой экономичности, достаточно высокой селективности и чувствительности. ТСХ является единственным хроматографическим методом, который позволяет проводить полный анализ неизвестной смеси, поскольку исследователь может проверить, не осталось ли на старте неэлюированных (неразделенных) компонентов. Метод ТСХ был предложен в 1938 году отечественными учеными Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбер. Однако широкие возможности метода были открыты позднее благодаря работам Ю. Кирхнера [2] и Э. Шталя [3].

Общее описание метода. На результаты анализа в методе ТСХ влияет техника эксперимента. В методе ТСХ неподвижная фаза тонким слоем (100–300 мкм) наносится на стеклянную, металлическую или пластмассовую пластинку. В качестве сорбента чаще всего используют силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, полиамид, кизельгур. На линию старта (1,5–2 см от края пластинки) очень малым пятном наносятся анализируемая смесь и стандартные вещества. Для этого используют капилляры, микропипетки или микрошприцы. Затем пластинку в герметичной камере погружают в растворитель, который выполняет роль подвижной фазы. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента до финиша и с разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их разделению. Принцип разделения такой же, как в других видах хроматографии, — неодинаковое сродство разделяемых органических веществ к подвижной жидкой фазе и стационарному сорбенту. После достижения растворителем (элюентом) линии финиша пластинку высушивают и проводят идентификацию компонентов. Разделенные компоненты на пластинке или полоске бумаги образуют отдельные зоны (пятна) (рис. 1). Многие вещества не обнаруживаются в видимой области, и для их определения невидимые зоны проявляют опрыскиванием пластины ТСХ специальными реагентами. Для обнаружения пятен можно использовать УФ-излучение или термическую деструкцию веществ.

Важной характеристикой степени разделения определяемых соединений в планарной хроматографии является величина R_f — отношение расстояния от центра пятна на пластинке до линии старта (x) к расстоянию (y), пройденному растворителем от линии старта до финиша. Величина R_f является характеристикой природы определяемого соединения и зависит от сорбента, растворителя, используемых для разделения. Для надежности идентификации веществ при определении R_f часто используют “свидетели”. Для этого на пластинке вместе с разделяемой смесью веществ хроматографируют стандартные вещества (“свидетели”).

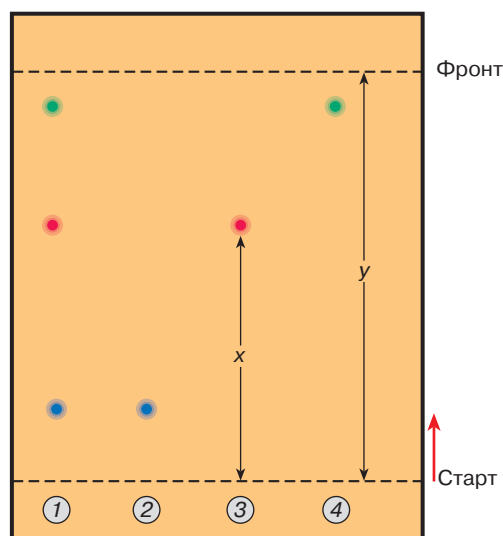


Рис. 1. Схема анализа методом ТСХ: 1 – анализируемая смесь, 2–4 – стандартные вещества (“свидетели”)

Правильный выбор сорбента и растворителя (смеси растворителей) определяет эффективность (полноту) разделения. Выбор хроматографической системы определяется природой анализируемой смеси. Например, насыщенные углеводороды сорбируются в очень малой степени и поэтому движутся в нем с более высокой скоростью. Ненасыщенные углеводороды сорбируются тем сильнее, чем больше в них содержится двойных связей. Для их разделения следует использовать наиболее активные сорбенты и малополярные растворители. Для органических веществ, содержащих разные функциональные группы, адсорбционное сродство повышается в следующем ряду: $-\text{CH}_3$, $-\text{O}-\text{alk}$, $>\text{C}=\text{O}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$. Это приводит к тому, что на слоях силикагеля или окиси алюминия при применении в качестве растворителя, например бензола, простые или сложные эфиры располагаются в верхней части хроматограммы, кетоны и альдегиды — примерно в середине, спирты — ближе к линии старта, а кислоты остаются на старте.

Растворители разной природы, используемые в ТСХ, различаются по их элюирующему (вытеснительному) действию, и их можно расположить в так называемые элюотропные ряды. Наблюдается очевидная зависимость между полярностью и элюирующим действием растворителя. Например, элюотропный ряд для силикагеля по мере возрастания элюирующей способности выглядит следующим образом: *n*-гексан, пентан, циклогексан, четыреххлористый углерод, толуол, хлороформ, дихлорметан, диэтиловый эфир, уксусная кислота, этанол, метанол, пиридин, вода.

Методы обработки хроматограмм. Для получения информации о качественном и количественном составе анализируемой смеси используют различные методы детектирования – как химические, так и физические. В последние годы значительно возросло использование ферментативных методов, особенно в клинической диагностике, при определении пестицидов. Пластинки ТСХ выполняют роль дискет, с которых химическая, физическая или ферментативная информация может быть считана в любом месте и в любое время. Все это в отличие от других вариантов хроматографии происходит отдельно от процесса разделения, и этим устраняется влияние подвижной фазы. Отсюда следует, что селективность (избирательность) метода ТСХ складывается из селективности процесса разделения и специфичности детектирования, взятых вместе (рис. 2). Это преимущество присуще только ТСХ.

Идентификацию веществ (качественный анализ) можно проводить по равенству значений R_f анализируемого вещества и стандарта (“свидетеля”). Если на хроматограмме образуются окрашенные зоны, то это значительно упрощает ее обработку. Невидимые хроматограммы проявляют (находят зоны разделенных веществ) химическими и физическими способами.

При химическом способе пленку или бумагу опрыскивают раствором или держат в парах взаимодействующего с компонентами анализируемой смеси реагента. Эти реактивы разделяют на два типа: 1) реактивы общего назначения, позволяющие обнаружить большое число соединений различных классов; 2) более специфичные реактивы, позволяющие обнаружить соединения определенного класса или с определенной функциональной группой. К реагентам общего назначения относятся концентрированная серная кислота, раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте, 1%-ный спиртовой раствор иода, фосфорно-молибденовая кислота, родамин. Одно из существенных преимуществ

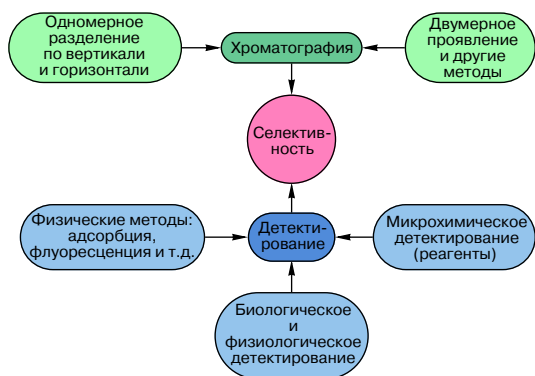


Рис. 2. Повышение селективности за счет сочетания методов

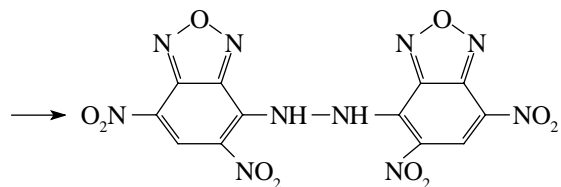
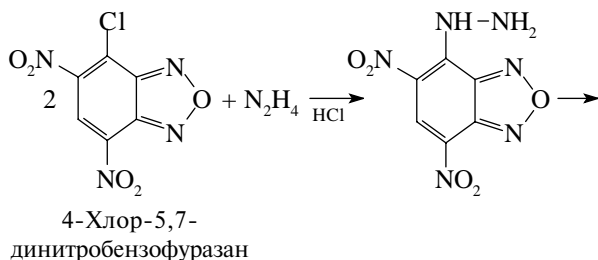
Таблица 1. Реагенты для обнаружения некоторых органических соединений

Класс соединений	Реагент	Окраска пятен
Кислоты	Бромкрезоловый зеленый	Зеленое пятно на зеленом фоне
Спирты	Церийаммонийнитрат 8-Оксихинолилат ванадия(V)	Коричневое пятно на зеленом фоне Красное пятно на зеленом фоне
Альдегиды	2,4-Динитрофенилгидразин	От желтого до красного на бледно-оранжевом фоне
Амины	Тиоцианат кобальта 4-Хлор-5,7-динитробензофуразан	Голубое пятно на розово-белом фоне Оранжево-красные, зеленые, синие пятна
Фенолы	Хлорид железа (III)	Красно-фиолетовое

существ ТСХ по сравнению с бумажной хроматографией – возможность использования агрессивных проявителей.

Примеры специфичных реагентов-проявителей для обнаружения различных классов органических соединений приведены в табл. 1.

Примером селективного реагента, позволяющего визуально по окраске пятен обнаруживать присутствие аминосоединений различной природы в смесях, является 4-хлор-5,7-динитробензофуразан (рис. 3) [4]:



При физическом способе проявления зон пластинку облучают УФ-лучами. Сорбент обычно содержит флуоресцентные индикаторы (силикаты цинка, сульфиды цинка или кадмия, вольфраматы щелочноземельных металлов), и пластина при облучении светится бледно-голубым светом. Если на пластинке есть вещества, способные поглощать УФ-излучение (ароматические и содержащие сопряженные С=C-связи вещества), то происходит ингибирование

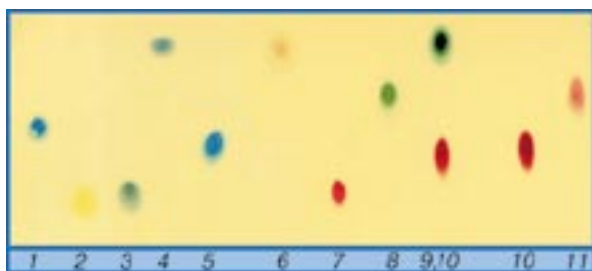


Рис. 3. ТС-хроматограмма аминсоединений. Проявитель – 4-хлор-5,7-динитробензофуразан; 1 – диметиланилин, 2 – анилин, 3 – 2,2,4-триметилдигидрохиолин, 4 – дифениламин, 5 – фенол- α -нафтиламин, 6 – α -нафтиламин, 7 – гидразид салициловой кислоты, 8 – гидразин солянокислый, 9 – гидразин, 10 – изониазид, 11 – фосфабензид

флуоресценции. Поэтому на ярком фоне пластинок появляются темные зоны, соответствующие определяемому соединению.

Более информативная идентификация веществ достигается при использовании спектральных методов детектирования (спектрофотометрия, флуориметрия, ИК-спектроскопия). Совпадения спектральных характеристик анализируемых и эталонных веществ является подтверждением их идентичности. Реакции ингибирования ферментативных реакций на хроматографической пластинке также используются для идентификации веществ.

Количественный анализ осуществляют непосредственно на хроматограмме (на слое сорбента или бумаге). Часто анализируемое вещество вымывают из слоя сорбента и полученный раствор анализируют каким-либо методом. В обоих случаях используют перечисленные выше спектральные, а также радиометрические методы. Предпочтение отдается первому способу, так как при этом значительно повышаются экспрессность и чувствительность определения. Следует отметить, что чувствительность определения зависит не только от условий разделения. Например, чем меньше R_f анализируемого вещества, тем менее размыта зона. Для рутинных количественных определений в ТСХ широко используют денситометры, которые измеряют интенсивность поглощения электромагнитного излучения при сканировании хроматографической пластинки. В результате регистрируется хроматограмма, которая имеет форму, аналогичную для газовой и других видов жидкостной хроматографии [1].

Во многих случаях для определения содержания веществ после разделения на пластинках ТСХ используют полуколичественный метод, применимый и в школьной лаборатории. Он заключается в визуальном сравнении размера пятна (а также сопоставлении их интенсивностей) с размерами серии пятен этого же вещества с известными концен-

трациями (стандартные растворы). Несмотря на простоту подхода, он обеспечивает правильность определения 5–10% при содержании 1–5 мкг.

Современное состояние и перспективы планарной хроматографии. Как это часто бывает в истории развития любого инструментального метода, после бурного развития в 60–70-х годах планарную хроматографию потеснил новый метод – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Однако в последние годы тонкослойный вариант планарной хроматографии получил новый импульс для развития и наблюдается возрастание его роли в хроматографических методах. Это связано с меньшей стоимостью оборудования для ТСХ, разработкой двумерного и радиального вариантов разделения, внедрением пластинок для высокоэффективной хроматографии, появлением систем автоматизированного многократного хроматографического проявления (АМХП). В двумерной хроматографии анализируемую смесь элюируют одним растворителем (или смесью), затем пластинку сушат и под углом 90° элюируют вторым растворителем. В радиальной хроматографии растворитель с регулируемой скоростью подается в центр пластинки, заставляя зоны перемещаться от центра к периферии. Это позволяет существенно ускорить процесс разделения.

Особенно перспективной является методика АМХП. Она удобна для определения пестицидов и продуктов их метаболизма в почвах, грязевых шламах и почвенных водах, а также в питьевой воде и водах минеральных источников. Хроматографическое разделение проводят в АМХП-системе, работа которой управляется и контролируется при помощи компьютера. Проводят многократное хроматографическое проявление (прогон растворителя). При таких многоступенчатых проявлениях (до 25 шагов) с возрастающей длиной полосы разделения и градиентным ступенчатым уменьшением полярности растворителя возможно разделение до 40 веществ на разделительной полосе длиной 8 см.

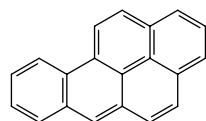
Важное значение имеет развитие высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). За счет создания принудительного движения подвижной фазы с регулируемой скоростью, уменьшения размера частиц сорбента (до 5–7 мкм) и насыщения пространства над пластиной парами растворителя удается существенно ускорить процесс и повысить четкость разделения.

Широко используется сочетание ТСХ с другими методами, в частности с высокоэффективной жидкостной хроматографией. Например, такой прием применяют при анализе сточных вод. Первоначально анализируемый образец можно разделить на колонках ВЭЖХ. После этого отдельные фракции наносят на пластинки ТСХ и проводят разделение с использованием методики АМХП. Таким образом в анализируемой смеси разделяется до 30 отдельных фракций. В каждой из этих фракций, в

свою очередь, на пластинке ТСХ определяется до десяти соединений. В отдельных случаях в образцах таким образом обнаруживали присутствие до 300 веществ. Такой прием продемонстрировал эффективность совместного использования двух методов при определении веществ в диапазоне концентраций от нанограммов до пикограммов.

Применение планарной хроматографии в анализе сложных смесей органических соединений. Возможности тонкослойной хроматографии в анализе различных объектов можно проиллюстрировать на примере анализа полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), гербицидов на основе фенилмочевины и стеролов в пищевых продуктах.

Хорошо известно, что некоторые ПАУ обладают канцерогенной активностью. Их анализ актуален с экологической точки зрения: они присутствуют в следовых количествах в минеральном масле, воздухе, воде, выхлопных газах, а также в пищевых продуктах. Нормы по питьевой воде устанавливают их граничную концентрацию в 0,2 мкг/л для шести ПАУ, одним из которых является бензо(а)пирен



Для разделения ПАУ и количественного определения их в питьевой воде была использована ВЭТСХ с флуориметрическим детектированием. Специфичность флуориметрического определения достигалась очень тонким выбором длин волн возбуждения и регистрации, что позволило детектировать каждый отдельный компонент на пикограммовом уровне даже при неполном разделении веществ. На рис. 4 по-

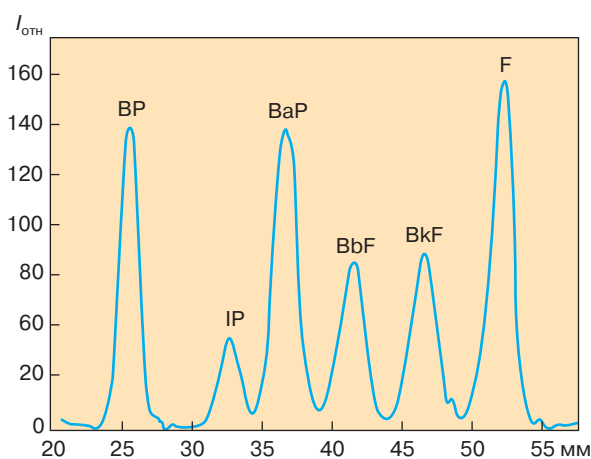
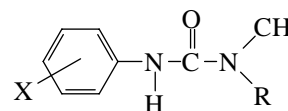


Рис. 4. Хроматограмма шести ПАУ: BP – бенз-(ghi)перилен, IP – индено(1,2,3-сd)пирен; BaP – бенз(а)пирен; BbF – бенз(б)флюорантен; BkF – бенз(к)флюорантен; F – флюорантен

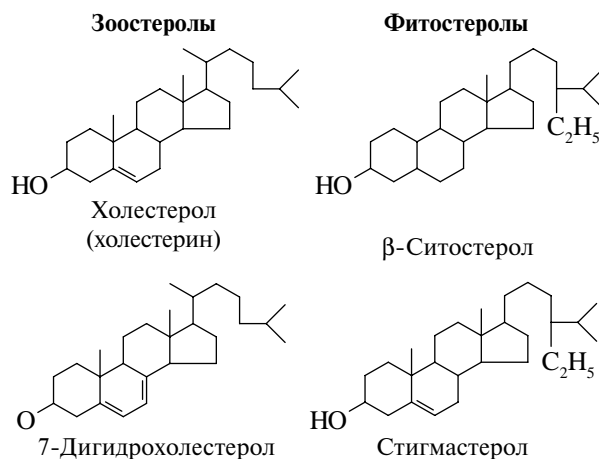
казана флуориметрическая денситограмма шести ПАУ в образце питьевой воды.

Определение гербицидов на основе фенилмочевины



используемых для обработки растений, по одной из нормированных методик проводится методом ТСХ. Скорость перемещения веществ на пластинках определяется природой заместителей в них. На рис. 5 приведены результаты фотометрического детектирования ($\lambda = 254$ нм) определяемых соединений после одно- и двукратного элюирования.

Стероиды – производные углеводорода стерана, имеющего гидроксильную группу в третьей позиции. Они широко распространены в природе и (в зависимости от происхождения) подразделяются на зоостеролы и фитостеролы. Наиболее важными из них являются холестерол (в русской литературе холестерин), 7-дигидрохолестерол, β -ситостерол, стигмастерол и эргостерол



Стероиды имеют важное значение для характеристики жиров (растительные и животные), а холестерол, как известно, при определенных условиях может повышать риск появления инфаркта. Растительные жиры содержат большей частью полиненасыщенные жирные кислоты и лишь следы холестерола. На основании физиологических аспектов питания рекомендуется употреблять больше растительных жиров, в частности маргарина, и определение стеролов в маргарине является важной характеристикой его качества. Для контроля его содержания можно использовать разные виды хроматографии, в том числе и ТСХ. После экстракции стеролы можно разделить в ВЭТСХ камере на пластинке импрегнированной нитратом серебра. Для детектирования используется флуоресцентный детектор. Предел обнаружения при этом составляет 3 нг/зону.

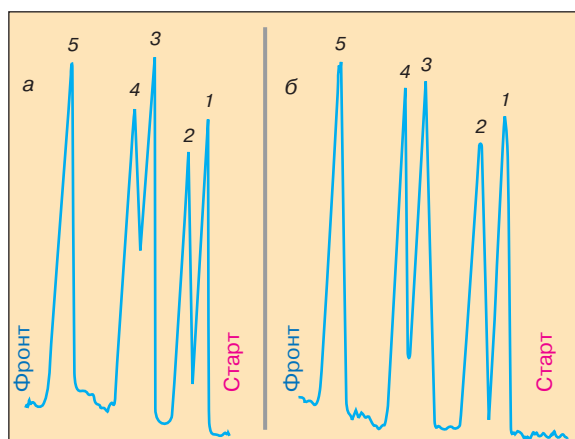


Рис. 5. Хроматограммы пяти гербицидов: небу- рона (1), диурона (2), хлортолурина (3), хлороксу- рона (4) и метоксурина (5) после однократного (а) и двукратного (б) элюирования

Таким образом, относительно простые аналити- ческие методы, которые можно использовать даже в школьных лабораториях, являются мощным инст-

рументом контроля содержания важных для орга- низма соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зеленин К.Н. Газовая хроматография в медицине // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 11. С. 20–25.
2. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981.
3. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Штала. М.: Мир, 1965.
4. Евгеньев М.И., Евгеньева И.И., Москва Н.А., Левин- сон Ф.С. 5-Хлор-4,6-динитробензофуразан как реа- гент в тонкослойной хроматографии ароматических аминов // Завод. лаб. 1992. Т. 58, № 4. С. 11–13.

* * *

Ирина Ивановна Евгеньева, кандидат химичес- ких наук, доцент кафедры аналитической химии Ка- занского государственного технологического уни- верситета. Соавтор более 100 работ по анализу органических соединений, методических пособий, изобретений.