



УДК 543.544

Двумерная электроосмотическая ТСХ при определении синтетических красителей и витаминов

Березкин В.Г.

РАН, Институт нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева, Москва

Карцова Л.А., Хмельницкий И.К., Алексеева А.В., Хмельницкая Т.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 11.01.2009 г

Аннотация

Обсуждается новый вариант двумерной тонкослойной хроматографии, основанный на последовательном использовании традиционной ТСХ (первое разделение) и электроосмотической ТСХ (второе разделение) для разделения сложных смесей органических соединений. Целесообразность использования предложенного варианта двумерной хроматографии продемонстрирована на примере разделения смеси синтетических пищевых красителей и водорастворимых витаминов.

Ключевые слова: Высокоэффективная тонкослойная хроматография, электроосмотическая тонкослойная хроматография, двумерная тонкослойная хроматография, водорастворимые витамины, синтетические пищевые красители, ДМСО, ДДСН, витамины В1, В2, В3, В6, В12 и С, Е 102, Е 104, Е 110, Е122, Е 124, Е 128, Е 129, Е 132, Е 133

New method of two-dimension thin-layer chromatography based on using traditional TLC (first separation) and electroosmotic TLC (second separation) for separation complicated mixtures of organic compounds was discussed. Advisability of using offered method of two-dimension thin-layer chromatography was demonstrated by example of separation of mixtures of synthetic dyes and vitamins.

Key words: High performance thin-layer chromatography, electroosmotic thin-layer chromatography, two-dimension thin-layer chromatography, water-soluble vitamins, DMSO, SDS, vitamins В1, В2, В3, В6, В12, С, Е 102, Е 104, Е 110, Е122, Е 124, Е 128, Е 129, Е 132, Е 133

Введение

Метод тонкослойной хроматографии интенсивно развивается в последние годы. Интересным новым его вариантом является электроосмотическая тонкослойная хроматография (ЭОТСХ) [1,2]. Использование ЭОТСХ позволяет значительно ускорить процесс разделения и повысить эффективность. Скорость подвижной фазы практически постоянна, что позволяет оптимизировать процесс разделения; миграция ионных соединений определяется не только электроосмотическим движением элюента, но и влиянием электрического поля.

Таким образом, для ионных соединений вариант ЭОТСХ будет существенно отличаться от традиционной ТСХ.

В классической ТСХ успешно используется вариант двумерной хроматографии для разделения многокомпонентных трудноразделяемых смесей [3-7]. Элюирование компонентов проводят на всю длину пластины, а затем после ее высушивания подвергают новому разделению. При этом пластина поворачивается относительно прежнего положения на 90°.

Нами предлагается использовать при втором элюировании режим электроосмотической хроматографии. В этом новом варианте двумерной хроматографии в зависимости от конкретно решаемой задачи возможно применение и другой по природе подвижной фазы, если это улучшает разрешающую способность.

Таким образом, целью настоящей работы явилось обоснование целесообразности использования нового варианта двумерной хроматографии (сочетание традиционной и электроосмотической ТСХ) и его практическая реализация на примере разделения пищевых красителей и витаминов группы В совместно с витамином С.

Эксперимент

В качестве исследуемых соединений использовались красители: Е 102 (тартазин), Е 104 (хинолиновый желтый), Е 110 (желтый солнечный закат), Е122 (кармуазин), Е 124 (понсо), Е 128 (красный 2G), Е 129 (красный очаровательный), Е 132 (индигокармин), Е 133 (синий блестящий), структурные формулы которых представлены на рис.1., и водорастворимые витамины (В1, В2, В3, В6, В12, С) (рис. 2).

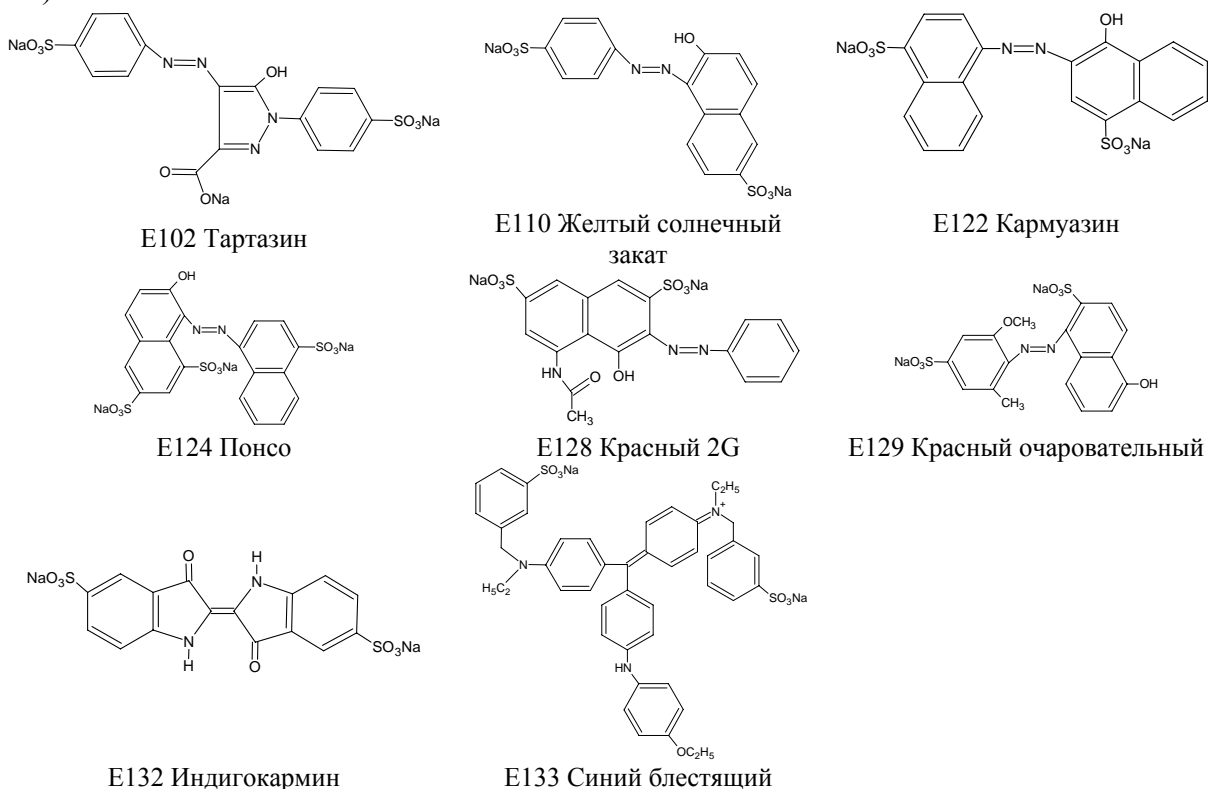
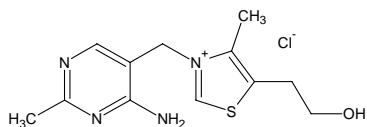
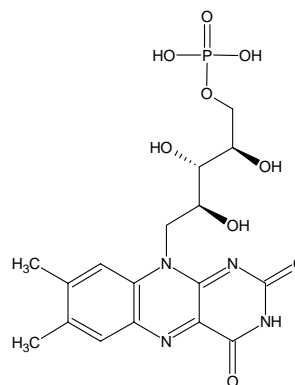


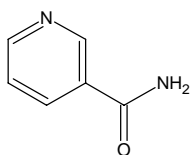
Рис. 1. Структурные формулы красителей



Витамин В1 (тиамин хлорид)



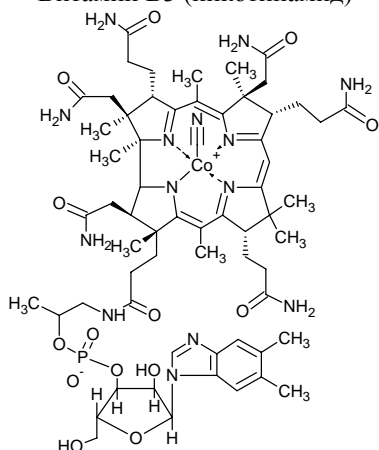
Витамин В2 (рибофлавин мононуклеотид)



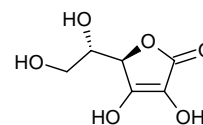
Витамин В3 (никотинамид)



В6 (пиридоксин)



Витамин В12 (цианокобаламин)



Витамин С (аскорбиновая кислота)

Рис. 2. Структурные формулы водорастворимых витаминов

Для ТСХ-разделения использовали высокоэффективные пластины «Сорбфил» пластины (силикагель по СТХ-1А, зернение: 5-17 мкм, толщина слоя 110 мкм, УФ индикатор – 254, алюминиевая и полимерная подложки (производство ООО «Имид», Краснодар)..

В качестве подвижных фаз для разделения красителей в режиме ЭОТСХ были испытаны: этиловый спирт, диметилсульфоксид (ДМСО), ДМСО/метилловый спирт (1:1), ДМСО/изопропиловый спирт (1:1), растворы додецилсульфата натрия (ДДСН) в ДМСО различных концентраций (5, 10, 20, 30 и 50 мМ) и метилловый спирт/изопропиловый спирт/этилацетат/вода (1:1:2:2), а для разделения водорастворимых витаминов – системы $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (0:1, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 9:1, 1:0, по объему) и $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (0:1, 1:2, 1:1, 2:1, 1:0, по объему).

Установка, применяемая для ЭОТСХ, состояла из 2-х блоков – горизонтальной камеры для проведения электроосмотической планарной хроматографии с двумя электродами (материал электродов – нержавеющая сталь, толщина 1 мм) и высоковольтного выпрямителя типа ВВ (0-30 кВ, максимальный ток 1000 мкА). Горизонтальная камера (Люблин, Польша) (см. рис.1), используемая нами для проведения экспериментов, закрывалась для уменьшения испарения растворителя крышкой из полимерного материала. В целях техники безопасности

(высокое напряжение) камера была изготовлена из полимерных электроизоляционных материалов.

Разделение в первом измерении проводилось в режиме ВЭТСХ. Затем пластинка высушивалась, опрыскивалась подвижной фазой для электроосмотического разделения и герметизировалась. Разделение во втором измерении (пластинка повернута на 90° относительно разделения в ВЭТСХ при первом элюировании) проводилось в режиме ЭОТСХ.

Результаты и их обсуждение

В режиме адсорбционной ВЭТСХ оптимизированы условия разделения модельной смеси красителей: тартразин, желтый солнечный закат, кармуазин, понсо, красный 2G, красный очаровательный, синий блестящий.

Наличие в молекулах всех определяемых соединений сульфогрупп, имеющих ионогенную природу, позволяет, изменяя рН элюента, заметно влиять на параметры удерживания (R_f) аналитов. На рис. 2. представлена зависимость параметров удерживания (R_f) определяемых красителей при изменении концентрации аммиака в составе п.ф.

Оптимальный состав подвижной фазы: метанол, изопропиловый спирт, этилацетат, аммиак (25 %) в объемном соотношении 1:1:2:2 (рис.3).

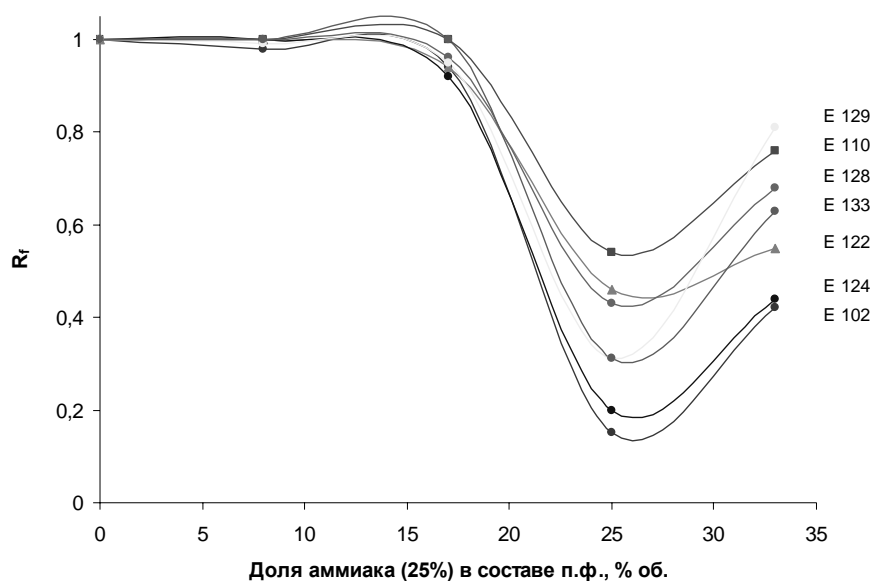


Рис. 3. Зависимость параметров удерживания (R_f) от концентрации аммиака в п.ф. (метанол, изопропиловый спирт, этилацетат, в объемном соотношении 1:1:2)

При ЭОТСХ-разделении зоны красителей движутся с различной скоростью в направлении, противоположном электроосмотическому потоку (в сторону анода). Использование ДМСО и его смеси со спиртами позволяет отделить только E133 от всех остальных красителей. При добавлении додецилсульфата натрия в ДМСО селективность разделения увеличивалась.

Изучена зависимость скорости миграции аналитов от концентрации ДДСН в подвижной фазе. Концентрация ДДСН варьировалась от 0 до 50 мМ ДДСН (рис 4). Наилучшее разделение получено при использовании подвижной фазы, содержащей

20мМ ДДСН в ДМСО (0,5 кВ; 1000 мкА). При более высоких концентрациях ДДСН заметно снижалась скорость разделения из-за высокой проводимости элюента. Низкая селективность разделения в зоне низких концентраций, по-видимому, связана с неполной ионизацией аналитов.

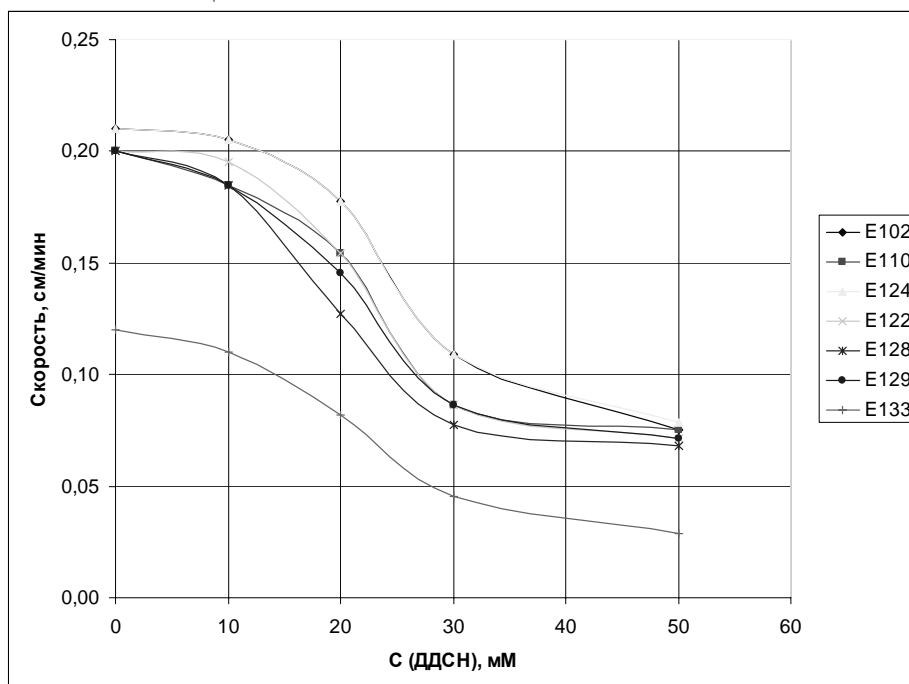


Рис. 4. Зависимость скорости движения веществ от концентрации ДДСН в подвижной фазе (ДМСО)

При использовании подвижной фазы метиловый спирт/изопропиловый спирт/этилацетат/вода (1:1:2:2, объемн.) наблюдалась та же селективность разделения, что и в случае ДДСН в ДМСО, что, по-видимому, объясняется доминирующей ролью электрофореза в разделении красителей.

Разделение в классической ТСХ проводилось с подвижной фазой метанол:изопропиловый спирт: этилацетат:аммиак (25%) (1:1:2:2). В режиме ЭОТСХ в качестве подвижной фазы использовался 20мМ ДДСН в ДМСО и MeOH:iPrOH:EtAc:H₂O (1:1:2:1) (перед проведением анализа методом ЭОТСХ пластинка обрезалась до размера 5*10 см), и скорость разделения в последнем случае MeOH:iPrOH:EtAc:H₂O (1:1:2:1) была быстрее (рис 5).

В специальных экспериментах проверялась возможность использования двумерной ТСХ-ЭОТСХ без замены подвижной фазы. Раствор додецилсульфата натрия в ДМСО для этой цели не подходил, поскольку не обеспечивал достаточной селективности: аналиты двигаются с фронтом элюента; а подвижная фаза состава метанол/изопропиловый спирт/этилацетат/аммиак (25%) (1:1:2:2) не могла быть использована в режиме ЭОТСХ из-за высокой проводимости, обусловленной высокой концентрацией аммиака.

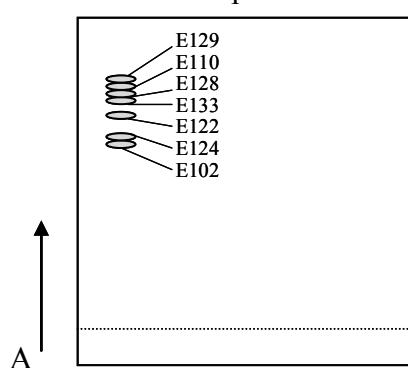
Для снижения проводимости изучена возможность замены аммиака в подвижной фазе на раствор щелочи низкой концентрации. Концентрацию NaOH варьировали в диапазоне от 0 до 10 % (0; 0,1; 1; 5; 10 %).

Лучшего разделения удалось добиться при предварительном модифицировании ТСХ-пластины 1 %-ным раствором NaOH. В качестве подвижной фазы использовали систему MeOH:iPrOH:EtAc:H₂O (1:1:2:1).

Таблица 1. Зависимость значений параметров R_f от концентрации NaOH в воде при модифицировании пластины (подвижная фаза метанол/изопропиловый спирт/этилацетат/ вода (1:1:2:1))

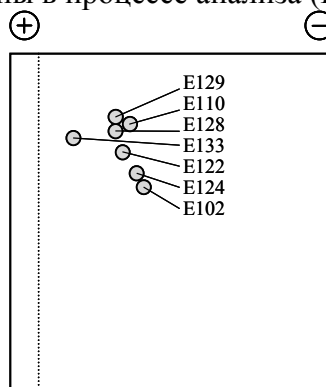
C (NaOH), %	R_f						
	E102	E110	E124	E122	E128	E129	E133
0,00	0,78	0,87	0,76	0,87	0,83	0,83	0,76
0,20	0,75	0,81	0,71	0,83	0,77	0,77	0,75
1,00	0,61	0,79	0,59	0,81	0,73	0,73	0,66

Полученные в режиме классической ТСХ результаты оказались полезны при разделении этой же смеси красителей методом двумерной ТСХ-ЭОТСХ и с использованием выбранного элюента без его замены в процессе анализа (Рис 5).



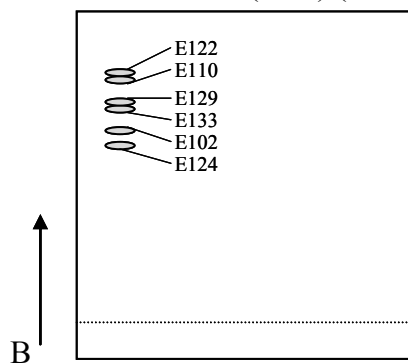
Двумерная -ТСХ

1. ВЭТСХ, п.ф.: метанол:изопропанол: этилацетат:аммиак (25%) (1:1:2:2)

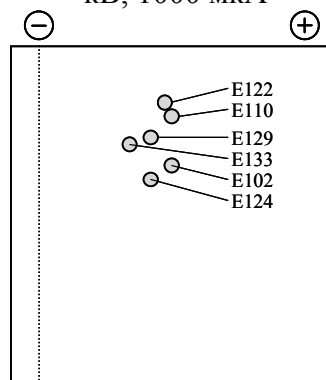


Двумерная -ТСХ

2. ЭО-ТСХ, п.ф.: ДМСО+20мМ ДДСН, 0,5 кВ, 1000 мкА



1. ВЭТСХ, п.ф.: метанол:изопропанол: этилацетат:вода (1:1:2:1)



Двумерная -ТСХ

2. ЭО-ТСХ, п.ф.: метанол:изопропанол: этилацетат:вода (1:1:2:1), 1 кВ, 2000 мкА

Рис. 5. Разделение синтетических пищевых красителей в режиме двумерной электроосмотической тонкослойной хроматографии

При разделении в режиме ЭОТСХ зоны витаминов группы В движутся с различной скоростью в сторону катода, а витамин С – в противоположную электроосмотическому потоку (к аноду). Была исследована зависимость селективности разделения витаминов от содержания органического модификатора (метанол, ацетонитрил) в подвижной фазе.

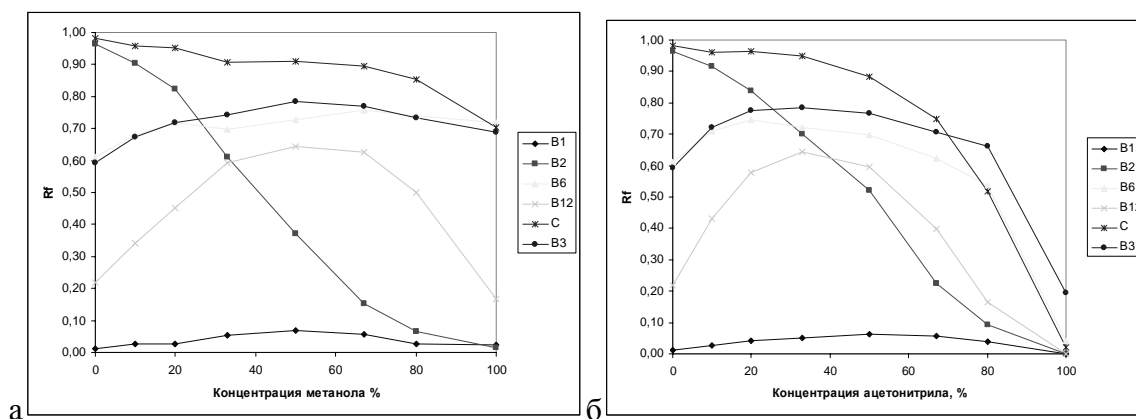
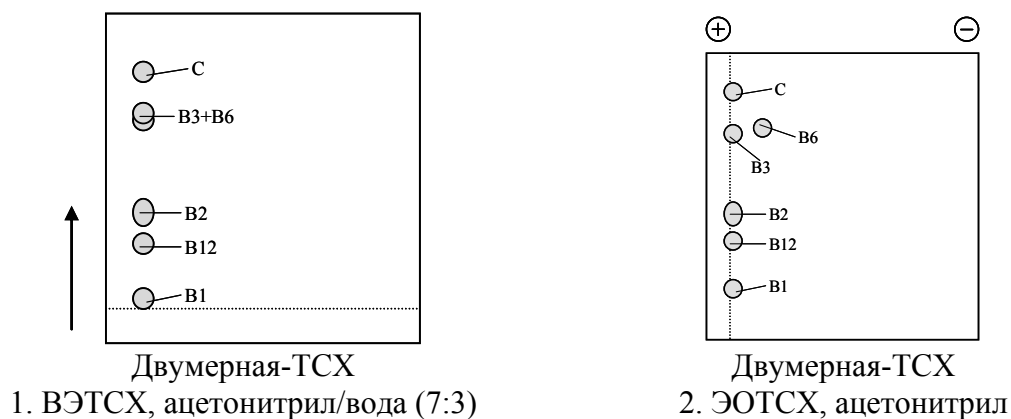


Рис. 6. Зависимость факторов удерживания водорастворимых витаминов от концентрации органического растворителя в элюенте в режиме ВЭТСХ. (А) метанол, (Б) ацетонитрил

В системе метанол/вода удалось разделить пять витаминов. Наилучшее разделение смеси витаминов В₁, В₂, В₃ (В₆), В₁₂ и С получено при соотношении метанол/вода 7:3 по объему, при напряжении 0,2 кВ и токе 2000 мкА. Однако добиться разрешения витаминов В₃ и В₆ в этой подвижной фазе не удалось (рис. 6).

В системе ацетонитрил/вода при соотношении ацетонитрил/вода 8:2 удастся разделить все 6 витаминов.

Для улучшения разрешения при разделении водорастворимых витаминов был предложен метод двумерной электроосмотической тонкослойной хроматографии. Разделение в первом измерении проводилось в режиме ВЭТСХ с подвижной фазой ацетонитрил/вода (7:3). Затем пластинка высушивалась, опрыскивалась ацетонитрилом для электроосмотического разделения и герметизировалась. Разделение во втором измерении проводилось в режиме ЭОТСХ (Рис 7.).



Двумерная-ТСХ

1. ВЭТСХ, ацетонитрил/вода (7:3)

Двумерная-ТСХ

2. ЭОТСХ, ацетонитрил

Рис. 7. Разделение витаминов методом двумерной электроосмотической тонкослойной хроматографии

Таким образом, для разделения сложных смесей предложен новый вариант двумерной тонкослойной хроматографии, основанный на последовательном использовании традиционной ТСХ (первое разделение) и электроосмотической ТСХ (второе разделение), проиллюстрированный на примере разделения синтетических пищевых красителей и водорастворимых витаминов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-03-01001-а «Совершенствование методов концентрирования в капиллярном электрофорезе».

Список литературы

1. Berezkin V.G., Litvin.E.F., Balushkin A.O., Rozylo J.K. Mainovska I. Chem. Fnal. (Warsaw), 2005, V. 50, P. 359.
2. Nurok D., Koers J.M., Nyman D.A., Liao W. J. Planar Chromatogr., 2001, V. 14, P. 409.
3. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М., Мир, 1981, 1981, т.1 и т.2, 1100 с.
4. Гейс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. Москва, Научный совет РАН по хроматографии, 1999. т.1 и 2, 753 с.
5. Poole C.F. The Essence of Chromatography. Amsterdam, Elsevier, 2003 9235 p.
6. Красиков В.Д Основы планарной хроматографии. Санкт-Петербург, Химиздат, 2005, 231 с.
7. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение. Саратов, Изд-во Саратовского университета, 2006, 112 с.
8. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Основы модифицирующего действия поверхностно активных веществ в жидкостной хроматографии. Саратов, Изд-во Саратовского университета, 2006, 135 с.

Карцова Людмила Алексеевна - д.х.н. профессор кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

Хмельницкий Иван Константинович - аспирант кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

Хмельницкая Тамара Викторовна - студент кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

Березкин Виктор Григорьевич - д.х.н., зав. лабораторией хроматографии Института нефтехимического синтеза имени А.В.Топчиева РАН, тел: (095) 955-42-74

Алексеева Анна Владимировна - аспирант кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

Kartsova Ludmila A. - Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: kartsova@gmail.com

Khmelnitsky Ivan K. - the post-graduate student of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: khmelnitskiy@gmail.com

Khmelnitskaya Tamara V. - the student of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: hemulka@gmail.com

Berezkin Victor G. - Dr.Sc.Chem. chief of laboratory of chromatography, A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis RAS, tel. (095) 955-42-74, e-mail: berezkin@ips.ac.ru

Alekseeva Anna V. - the post-graduate student of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university