

Stanovení aromatických látek rozdělených chromatografií na papíru a na tenké vrstvě*

J. FRANC, M. HÁJKOVÁ, V. JEHLIČKA

Výzkumný ústav organických syntéz, Pardubice-Rybitví

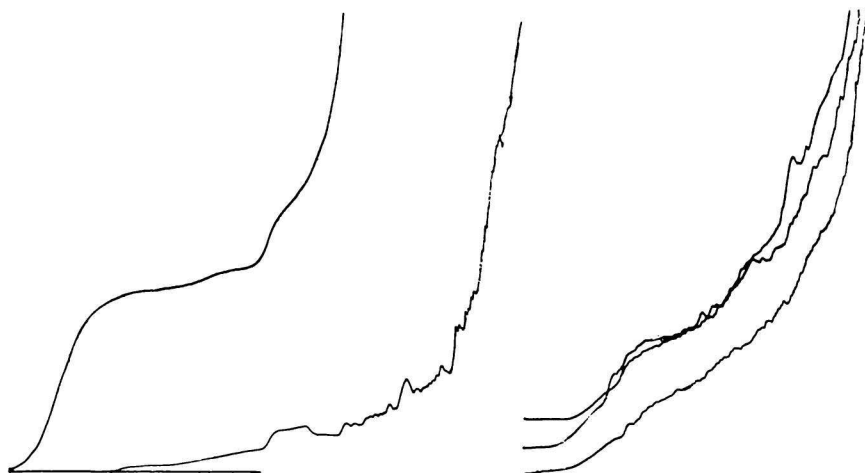
Na našem pracovišti zabývali jsme se několika způsoby vyhodnocování papírových chromatogramů.

První z nich bylo pouhé kvalitativní a semikvantitativní posuzování velikosti skvrn, a to dvojím způsobem. Prvý způsob se týkal hodnocení obsahu *p*-toluylátu methylnatého v dimethyltereftalátu [1], kde množství nanášené na papír bylo voleno tak, aby povolený obsah *p*-toluylátu odpovídal slabé skvrně. Bylo tedy prováděno hodnocení jen z hlediska obsahu hraniční koncentrace. Druhého semikvantitativního způsobu, založeného na srovnávání vzorku se současně nanesenou koncentrační hranicí, jsme použili pro stanovení malých množství fenolů [2] a kaprolaktamů [3]. Podle našich zkušeností lze tohoto způsobu použít pouze tam, kde se zjišťují malá množství nečistot v hlavním produktu, maximálně do 0,5 %, při čemž přesnost stanovení je asi $\pm 0,05$ % absol.

Prvním stupněm objektivního vyhodnocování obsahu složek vyskytujících se jako složky hlavní bylo fotometrování chromatogramů in situ na Pulfrichově fotometru opatřeném zvláštním nástavcem s posuvným zařízením. Tímto způsobem bylo třeba postupně fotometrovat skvrnu jakoby opticky rozřezanou na proužky 20 mm dlouhé a 1 mm široké. Fotometrování se děje obvyklým způsobem. Ze získaných extinkcí náležejících ke každému proužku se sestrojí křivka, jejíž plocha odpovídá koncentraci. Vzhledem k tomu, že ke vzorku (nebo jejich řadě) je třeba vždy proměřit ještě standardní stupnici, je tento způsob časově velmi náročný. Nutno však podotknout, že způsob není pro všechny druhy skvrn vhodný. Např. tímto způsobem [4] jsme stanovili vedle sebe kyselinu 2-nitrotereftalovou a 5-nitroisofthalovou po redukci s SnCl_2 a postřikem Ehrlichovým činidlem (oranžově žluté skvrny), a to se statisticky zjištěným variačním koeficientem $v = 2,9$ %. Naproti tomu, jestliže jsme fotometrovali tímto způsobem hnědočerné skvrny po postřiku thiosemikarbazonů ketonů a aldehydů dusičnanem stříbrným, nedosáhli jsme uspokojivých výsledků.

Další způsob, který se nám osvědčil, je titrace složek vystřižených z chromatografického papíru. V pokusné části je popsán postup, jak byly tímto způsobem stanoveny kyselina tereftalová, *p*-toluyllová, ftalová, benzoová, trimesinová a monomethyltereftalát. K titraci nutno použít Gorbachovy byrety

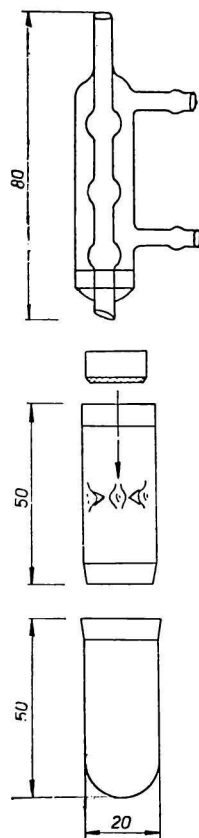
* Prednesené na Seminári o kvantitatívnych metódach v chromatografii na papieri v Bratislave 25. apríla 1963.



Obr. 1. Polarografické křivky kyseliny 3-nitroftalové samotné a za přítomnosti drtě z chromatografického papíru.

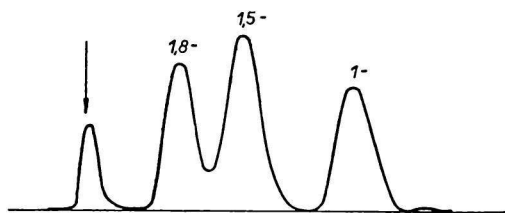
s celkovým objemem $200 \mu\text{l}$ a s možností odčítat $1 \mu\text{l}$. Při pečlivě provedené titraci lze dosáhnout dobrých výsledků. Variační koeficient zjištěný ze 100 pokusů byl v popsaném případě $2,8 \%$.

Pro některé příznivé případy (nitrolátky) byla vyzkoušena i polarografie. Zde však nutno vždy vypracovat vhodný postup eluce, a to proto, že přítomnost papírové drtě způsobuje nepravidelné odtrhávání rtuťové kapky a tím i poruchy při polarografii, které jsou takového rázu, že získané křivky jsou nepoužitelné (obr. 1). Proto pro některé případy je lépe použít extraktoru skvrn, jak je znázorněn na obr. 2. V žádném případě nelze chromatografický papír vkládat do polarografické nádoby. Naproti tomu se ukázalo, že skvrny z chromatografického dělení na tenkých vrstvách kysličníku hlinitého lze polarografovat, aniž by se kysličník hlinitý musel odstraňovat. Jestliže byla statisticky hodnocena chyba stanovení v případě nitroantrachinonů, ukázalo se, že přesnost je menší než v předcházejících případech, neboť variační koeficient je $v = 4,8 \%$.



Obr. 2. Extraktor na eluci chromatografických skvrn (chladič, kelímek s fritou, nástavec, baňka s rozpouštědlem).

V poslední době bylo třeba i kvantitativně hodnotit směsi látek dělených na tenké vrstvě kysličníku hlinitého (aminoantrachinony, viz pokusnou část). Pro tento případ jsme použili automatického vyhodnocovače papírových chromatogramů ERI-10, který pracuje s chromatogramy ve vodorovné poloze, takže lze k vyhodnocování použít i volně sypaných vrstev. Kromě toho může pracovat jak v procházejícím, tak v odraženém světle. Jistým nedostatkem je výběr pouze tří barevných filtrů. Jako v jiných případech je přesnost stanovení závislá na tom, jaké je dělení mezi jednotlivými složkami, jaké je zabarvení skvrn a do jaké míry se naruší povrch vrstvy buď vyvíjecím rozpouštědlem, nebo při postřiku detekčním činidlem. Jak vypadá záznam dělení aminoantrachinonů, je znázorněno na obr. 3. Je třeba podotknout, že přístroj ERI-10 má



Obr. 3. Chromatografický záznam aminoantrachinonů dělených na tenké vrstvě kysličníku hlinitého a zaznamenaný automatickým fotometrem ERI-10.

současně integrační zařízení a že záznam křivek trvá pouze 2 1/2 minuty. Uvážíme-li značnou rychlost chromatografie na tenkých vrstevkách, je kombinace s automatickým vyhodnocovačem velmi výhodná. Přesnost stanovení je však závislá na různých uvedených faktorech a je v případě dělení 1-aminoantrachinonu, 1,5-diaminoantrachinonu a 1,8-diaminoantrachinonu $v = 6,0\%$ (hodnoceno z 33 měření).

Experimentální část

Titrační stanovení aromatických kyselin

K dobrému rozdělení aromatických kyselin lze použít pouze papíru Schleicher & Schüll 2045 bg; jejich 2,5 % pyridinový roztok se nanese přesně v množství 3—10 μl . Vyvíjí se nejlépe přes noc (16 hodin) v systému rozpouštědel butanol—ethanol—pyridin—voda (3 : 1 : 1). Po vyjmutí z chromatografické komory se chromatogram nechá 3 hodiny sušit na vzduchu (aby vytěkal pyridin) a pak se stříká vodným, za studena nasyceným roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu. Kyseliny se objeví jako růžové skvrny na modrém pozadí. Z chromatogramu se vystřihají stejně velká políčka, ve kterých jsou příslušné skvrny, rozstříhají se na malé proužky a vloží se do 10 ml Erlenmeyerovy baňky. Současně se vystřihne stejně velké políčko bez kyselin (slepý pokus). Do Erlenmeyerovy baňky se pomocí Gorbachovy byrety přidá 200 μl 0,05 N-NaOH, pak 2 ml vody a zahřeje se asi 10 minut na 60 °C za občasného mírného protřepání. Po ochlazení se titruje Gorbachovou byretou s 0,05 N-HCl. Jako indikátor slouží 2,6-dichlorfenolindofenol obsažený v chroma-

togramu; pouze před koncem titrace přidáme ještě jednu kapku tohoto indikátoru. Při výpočtu se μl spotřebovaného roztoku 0,05 N roztoků násobí faktorem zjištěným po provedení stejného postupu se standardními látkami. Hodnoty R_F dělených kyselin jsou v tab. 1.

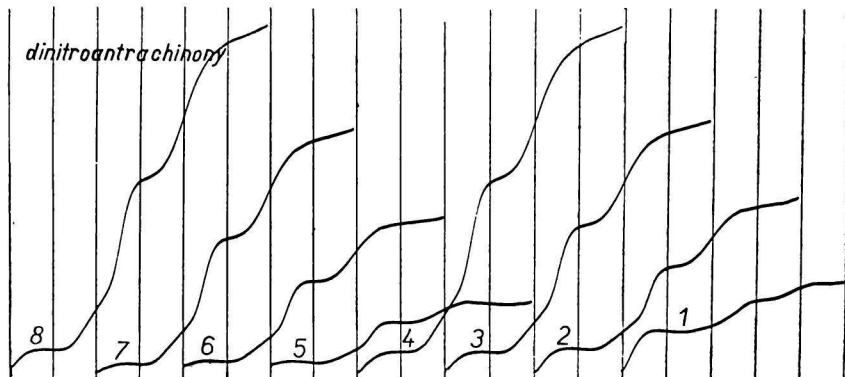
Tabulka 1

Hodnoty R_F kyselin benzenkarbonových
Soustava butanol—ethanol—pyridin—voda (3 : 1 : 1 1);
Schleicher & Schüll 2045 bgl, $t = 20^\circ\text{C}$

Kyselina	R_F
benzoová	0,58
<i>p</i> -toluylová	0,61
monomethyltereftalát	0,45
ftalová	0,30
tereftalová	0,15
trimesinová	0,06

Polarografické stanovení dinitroantrachinonů

Nitroantrachinony a dinitroantrachinony se chromatografují na papíře Schleicher & Schüll 2045/A impregnovaném 30 % dimethylformamidem metodou na přetečení směsí cyklohexan—pyridin (25 : 5). Vzorky se rozpustí v dimethylformamidu. Po uschnutí chromatogramu se skvrny (které jsou v UV-světle tmavé) vystříkají a eluují ve zkumavkách 2,5 ml dimethylformamidem přes noc. Druhý den se připipetuje 2,5 ml pufru (0,02 M kyselina octová—octan sodný, t. j. 3 ml kyseliny octové + 6,8 g octanu sodného do 250 ml dimethylformamidu), protřepe se a probublá dusíkem a polarografuje při citlivosti s 1/5. Polarogramy 1,5-diaminoantrachinonů a 1,8-diaminoantrachinonů pro rozmezí 20—80 μg jsou na obr. 4.



Obr. 4. Polarogram z chromatogramů eluovaných 1,5-dinitroantrachinonů a 1,8-dinitroantrachinonů pro koncentrace 20, 40, 60 a 80 μg .

Stanovení aminoantrachinonů automatickým přístrojem ERI-10

Aminoantrachinony a diaminoantrachinony se chromatografují na vrstvě kysličníku hlinitého směsí cyklohexan—ether. Vzorky se rozpustí v dimethylformamidu, a to na 0,04 % roztok. Po nanesení 0,02 ml na vrstvu kysličníku hlinitého a kysličník skvrn se nechá 16 hodin na vzduchu. Po rozdělení se nechá rozpouštědlo odtékat a intenzita skvrn se proměří na přístroji ERI-10 (extinkční registrační přístroj s integrátorem, Zeiss, Jena) za použití žlutozeleného filtru; R_F 1-aminoantrachinonu 0,74, 1,5-diaminoantrachinonu 0,50 a 1,8-diaminoantrachinonu 0,40.

Diskuse

Při hodnocení tohoto výběru kvantitativních metod chromatografie na papíru a chromatografie na tenké vrstvě možno učinit několik závěrů.

Předně jde-li o stopové nebo v malém množství (do 0,5 %) se vyskytující nečistoty, vystačíme se semikvantitativním vyhodnocením, které je samozřejmě zatíženo poměrně vysokou relativní chybou (10—15 %). Ale vzhledem k malé koncentraci stanovené složky bývá absolutní chyba přijatelná.

Fotometrie na Pulfrichově fotometru je v mnoha případech značně přesná ($v = 2,9$ %), nevýhodou však je její poměrná zdoluhavost, kterou možno odstranit použitím automaticky vyhodnocujících přístrojů.

Titrační metody jsou rovněž velmi přesné ($v = 2,8$ % v případě dělení aromatických kyselin), nelze se však obejít bez speciálního titračního zařízení, t. j. Gorbachovy byrety. Těchto byret je však zapotřebí více kusů, jednak pro nanášení, jednak pro zpětnou titraci. Také samo provedení titrace vyžaduje jistou zručnost, uvážíme-li, že se titrují množství řádově v 10 μg .

Polarografie bývá ztížena někdy tím, že ne vždycky je vhodné rozpouštědlo eluující složku z papíru vhodným polarografickým prostředím. Přesto lze i zde v mnohých případech dosáhnout přijatelné přesnosti ($v = 4,8$ %).

Z hlediska provozních potřeb zdá se velmi výhodné automatické vyhodnocení chromatogramů se současně integrujícím zařízením. I když chyba v uváděném příkladě aminoantrachinonů je poměrně veliká ($v = 6,0$ %), je to převážně způsobeno nerovnoměrností nulové linie a omezenou délkou chromatogramu. Povrch kysličníku hlinitého se mírně porušuje vzlínajícím rozpouštědlem a tím dochází i k nepravidelnému odrážení světelné energie. Při fotometrickom vyhodnocení, ať již na Pulfrichově fotometru, nebo na automatickém přístroji, nutno dbát toho, aby bylo k dělení nanášeno minimální množství vzorku, neboť jinak dochází ke značným odchýlkám od Lambert—Beerova zákona a tím k snížení přesnosti stanovení.

Závěrem lze říci, že kvantitativní metody chromatografie na papíru i chromatografie na tenkých vrstvách se budou podle našich zkušeností pohybovat v rozmezí standardní chyby 3—6 %, což je přesnost, se kterou se obvykle

setkáváme též u plynové chromatografie. Pouze ve výjimečných, zvláště příznivých případech bude u organických látek možno dosáhnout větší přesnosti. Domníváme se rovněž, že nelze dávat přednost té které metodě, neboť její výběr se řídí mnoha faktory zahrnujícími dělení, detekci, eluci, dobu potřebnou k vyhodnocení a požadavek přesnosti.

Lze tedy chromatografii na papíru i chromatografii na tenkých vrstvách pokládat za vhodnou metodu pro stanovení složek směsi, i když její přesnost nedosahuje přesnosti některých klasických analytických metod.

Souhrn

Při kvantitativním vyhodnocování chromatogramů různých aromatických látek na papíru nebo na tenké vrstvě jsme použili několik způsobů a porovnávali jejich přesnost na základě variačního koeficientu (v).

Vizuální hodnocení, prováděné metodou hraničního zředění nebo porovnáním se známými koncentracemi látek v standardní směsi, je zatíženo značnou chybou ($v = 10 - 50 \%$). Tato semikvantitativní metoda je však použitelná pro zjišťování malého množství (do $0,5 \%$) nečistot v hlavním produktu.

Poměrně velmi přesných výsledků bylo dosaženo ($v = 2,9 \%$) fotometrováním skvrn aromatických nitrokyselin po provedené barevné detekci in situ s pomocí upraveného Pulfrichova fotometru a mikrotitrací eluátů aromatických kyselin s pomocí Gorbachovy byrety ($v = 2,8 \%$).

Polarografického stanovení v eluátech skvrn chromatogramů bylo použito u aminoantrachinonů ($v = 4,8 \%$).

Nejrychlejší metodou byla chromatografie aminoantrachinonů na tenké vrstvě kysličníku hlinitého s následujícím měřením chromatogramů s pomocí denzitometru ERI-10 (Zeiss, Jena), i když dosáhnutá přesnost byla menší ($v = 6 \%$).

Tyto metody byly s úspěchem použity při laboratorní práci a při analýzách průmyslových surovin a výrobků.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ РАЗДЕЛЕННЫХ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА БУМАГЕ И НА ТОНКОМ СЛОЕ

Я. Франц, М. Гайкова, В. Егличка

Исследовательский институт органических синтезов, Пардубице-Рибитви

При количественной оценке хроматограмм различных ароматических веществ на бумаге или на тонком слое мы применили несколько способов и сравнили их точность на основании вариационного коэффициента (v).

Визуальная оценка, проведенная методом минимальных обнаруживаемых количеств или сравнением с известными концентрациями веществ в стандартной смеси, подвержена очень большой ошибке ($v = 10\text{--}50\%$). Этот полуколичественный метод применим при определении незначительного количества (до $0,5\%$) загрязнений в главном продукте.

Сравнительно хороших результатов достиглось ($v = 2,9\%$) определением пятен ароматических нитроислот после проявления окраски методом прямого фотометрирования с помощью, к этой цели приспособленного фотометра Пульфриха и микротитрованием элюата ароматических кислот применением бюретки Горбаха ($v = 2,8\%$).

Полярнографический метод был применен для определения аминокантрахинона после элюации пятен хроматограмм ($v = 4,8\%$).

Быстрейшим методом оказалась хроматография аминокантрахинона на тонком слое окиси алюминия с последующим измерением хроматограмм с помощью денситометра ERI-10 (Цейсс, Иена), хотя полученная точность оказалась меньшей ($v = 6\%$).

Приведенные методы с успехом применились при лабораторных работах и при анализах промышленного сырья и продуктов.

BESTIMMUNG DER DURCH PAPIERCHROMATOGRAPHIE UND DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE GETRENNTEN AROMATISCHEN STOFFE

J. Franc, M. Hájková, V. Jehlička

Forschungsinstitut für organische Synthesen, Pardubice-Rybitví

Bei der quantitativen Auswertung der Chromatogramme verschiedener aromatischer Stoffe auf Papier oder auf der Dünnschicht haben die Autoren einige Verfahren angewandt und deren Genauigkeit auf der Grundlage des Variationskoeffizienten (v) verglichen.

Eine visuelle Bewertung, die mittels der Methode der Grenzverdünnung oder durch einen Vergleich mit bekannten Konzentrationen der Stoffe in einem Standardgemisch durchgeführt wird, ist mit einem beträchtlichen Fehler belastet ($v = 10\text{--}50\%$). Diese semiquantitative Methode ist jedoch für die Feststellung einer kleinen Menge (bis $0,5\%$) von Verunreinigungen im Hauptprodukt brauchbar.

Verhältnismässig sehr genaue Ergebnisse ($v = 2,9\%$) wurden durch das Photometrieren der Flecke aromatischer Nitrosäuren nach einer durchgeführten farbigen Sichtbarmachung in situ mit Hilfe des Pulfrichschen Photometers und durch Mikrotitration der Eluate der aromatischen Säuren mittels der Gorbachschen Bürette ($v = 2,8\%$) erzielt.

Die polarographische Bestimmung in den Eluaten der Flecke der Chromatogramme wurde bei den Aminoanthrachinonen ($v = 4,8\%$) angewandt.

Die rascheste Methode war die Chromatographie der Aminoanthrachinone auf der Dünnschicht aus Aluminiumoxyd mit einer anschließenden Messung der Chromatogramme unter Verwendung des Densitometers ERI-10 (Zeiss, Jena), auch wenn die erzielte Genauigkeit eine geringere war ($v = 6\%$).

Diese Methoden wurden bei der Laboratoriumsarbeit und bei Analysen von Industrie-rohstoffen und Erzeugnissen mit Erfolg benutzt.

LITERATURA

1. Franc J., *Chem. listy* **52**, 2004 (1958); *Collection* **24**, 310 (1959).
2. Franc J., *Chem. listy* **52**, 55 (1958); *Collection* **23**, 1231 (1958).
3. Franc J., *Chem. listy* **50**, 1246 (1956); *Collection* **22**, 218 (1957).
4. Franc J., *Chem. listy* **51**, 2041 (1957); *Collection* **23**, 655 (1958).

Do redakcie došlo 28. 4. 1963

Adresa autorů:

Inž. Jaroslav Franc, Marie Hájková, Vladimír Jehlička, Výzkumný ústav organických syntéz, Pardubice-Rybitví.