

УДК 543.544.005

Отечественное оборудование для количественной тонкослойной хроматографии

Ю. Д. Коган, М. А. Гольцберг

ЮЛИЙ ДМИТРИЕВИЧ КОГАН — директор ЗАО «Сорбполимер» Область научных интересов химическое машиностроение, хроматография

МАРК АДЛЬФОВИЧ ГОЛЬЦБЕРГ — кандидат химических наук, инженер-исследователь ЗАО «Сорбполимер» Область научных интересов физико-химические методы анализа, органический синтез

350072 Краснодар, Тополиная аллея, 10, ЗАО «Сорбполимер», E-mail post@sorbfil.kuban.ru

Возможности тонкослойной хроматографии в количественном анализе

Тонкослойная хроматография представляет собой планарную жидкостную хроматографию, в которой процесс разделения смеси веществ осуществляется обычно на открытом тонком слое сорбента или в пленках пористого полимерного материала. Метод тонкослойной хроматографии предложен в 1938 году советскими учеными Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер. В настоящее время метод тонкослойной хроматографии занимает одно из ведущих мест в практике анализа фармацевтических, медико-биологических, химико-технологических и природных объектов.

В последнее время тонкослойная хроматография все чаще применяется в дополнение к методу высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а иногда и заменяет его. Обладая почти одинаковой с ВЭЖХ чувствительностью, тонкослойная хроматография на порядок превосходит ее по производительности. При хорошей организации работы количественный анализ методом тонкослойной хроматографии по точности не уступает ВЭЖХ, при том что затраты средств приблизительно в три раза ниже.

По сравнению с другими хроматографическими методами тонкослойная хроматография имеет также следующие преимущества

- низкий порог количественного определения,
- возможность параллельного разделения нескольких образцов на одной пластине,
- возможность гибкого варьирования условий разделения компонентов пробы,

— легкость проведения хроматографического процесса и малый расход реактивов,

— селективное детектирование веществ как с использованием проявляющих растворов, так и при облучении УФ светом,

— пригодность для препаративного разделения компонентов пробы,

— отсутствие необходимости регенерации пластин,

— возможность сохранения пластины с разделенными компонентами пробы с последующим детектированием анализируемых веществ.

Простота и экспрессность метода, высокая эффективность, наглядность результатов разделения делают тонкослойную хроматографию широко используемым и доступным методом массовых анализов веществ практически всех классов. Согласно публикациям, посвященным химическому анализу, в 40% работ используется тонкослойная хроматография, а при анализе лекарственных препаратов на долю этого метода приходится 60% работ. В России тонкослойная хроматография широко применяется в контрольно-аналитических лабораториях Минздрава, Минсельхоза, Минюста, МВД, Минэкологии, в химической и фармацевтической промышленности, во многих исследовательских институтах и вузах. По данным руководителей отраслевых контрольно-аналитических центров этот метод применяют порядка 6000 лабораторий, проводя до 10 миллионов анализов в год. В России действует около двух тысяч утвержденных в установленном порядке государственных и отраслевых методик на основе тонкослойной хроматографии.

для аналитического контроля почти полутора тысяч различных продуктов и веществ. Однако эти методики применяются в основном для качественного и полуколичественного анализа, в то время как за рубежом тонкослойная хроматография является высокопроизводительным методом количественного анализа.

Такая ситуация в значительной степени сложилась из-за того, что обычно используемое в отечественной практике оборудование для количественной тонкослойной хроматографии, выпускаемое фирмами «САМАГ» (Швейцария), «Desaga», «Biometra» (Германия), «Biomed Instruments» (США), главным образом предназначено для исследовательских программ, а не для массового пользователя. Стоимость этого оборудования достигает 30–100 тысяч долларов США, велики также расходы на его эксплуатацию и сервис.

Для обеспечения потребностей аналитической практики в России специалистами ЗАО «Сорбполимер» (г. Краснодар) создано специализированное оборудование для тонкослойной хроматографии, предназначенное для проведения массовых количественных анализов. Работа выполнена в рамках Государственного проекта «Прибор для тонкослойной хроматографии».

Ниже дано описание хроматографического комплекса производства «Сорбполимер».

Пластины для тонкослойной хроматографии

Одним из главных условий хорошего разделения веществ на хроматографической пластине является рациональная подготовка пробы, обеспечивающая удаление посторонних веществ. Эта задача требует применения таких методов очистки и обогащения пробы, как жидкостная экстракция жидких и твердых веществ, твердофазная экстракция, равновесный паровый анализ, гель-хроматография, использование предколонок и пластин с концентрационными зонами.

Вместе с тем успешное разделение напрямую зависит от сорбционных свойств хроматографической пластины. Пластина для тонкослойной хроматографии, как известно, состоит из инертной подложки (стекло, металл, полимер), сорбционного слоя, инертного связующего и проявляющих веществ (обычно это люминофоры, реже индикаторы, образующие окрашенные соединения с анализируемым веществом). Хроматографические свойства пластин зависят в основном от применяемого сорбента. В качестве сорбентов для приготовления пластин обычно используют силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, силикат магния, ионообменные смолы, полиамид, а также смеси этих и других сорбентов.

Для разработок ЗАО «Сорбполимер» был выбран силикагель как наиболее дешевый универ-

сальный и доступный сорбент, пригодный для решения большинства аналитических задач. В основу промышленной технологии приготовления хроматографических пластин был положен метод, разработанный в Институте высокомолекулярных соединений АН СССР Б.Г. Беленьким и Э.С. Ганкиной. С 1989 года ЗАО «Сорбполимер» выпускает пластины марки «Sorbfil» (рис. 1) с сорбционным слоем из молотого и фракционированного по размерам частиц крупнопористого силикагеля марки КСК. Чтобы получить прочно закрепленный слой сорбента, на подложку наносится золь кремниевой кислоты, который при нагревании превращается в силикагель. Производство полностью механизировано, что позволяет выпускать более 6 миллионов пластин в год.

На основании результатов испытаний в 12-ти ведущих ведомственных лабораториях производимые в промышленном масштабе пластины «Sorbfil» рекомендованы для применения в аналитических лабораториях России. Эти пластины в основном удовлетворяют требованиям отечественных потребителей, однако по ряду показателей они все же уступают пластинам зарубежных производителей.

В июне 1991 года специалистами фирмы «Merck» было проведено сравнение пластин «Merck» с аналогичными пластинами «Sorbfil». В протоколе исследования было записано, что пластины «Sorbfil» в случае применения их для качественных и полуколичественных анализов по своим качествам соответствуют зарубежным пластинам. Однако для стандартизованного количественного определения они не обеспечивают достаточной эффективности разделения (на ~10–18% меньше, чем у пластин «Merck»). В протоколе было отмечено, что это связано с различием свойств используемого силикагеля (фракционный состав, размер пор и удельная поверхность).

С целью повышения точности и достоверности количественных анализов специалисты ЗАО «Сорбполимер» провели работы по Госконтракту с целью



Рис. 1. Пластины «Sorbfil»

улучшения хроматографических характеристик пластин с применением прежнего сорбента. В результате этих работ удалось повысить показатели качества выпускаемых в промышленном масштабе пластин за счет сужения фракционного состава сорбента и совершенствования технологии их производства на имеющемся промышленном оборудовании. В декабре 2000 года фирма «САМАГ» признала возможность использования пластин «Sorbfil» (вместо пластин «Merck») ввиду того, что они обладают более высокой механической прочностью при незначительных отличиях основных хроматографических характеристик.

Расширение области применения тонкослойной хроматографии и переход к количественному ее варианту требуют дальнейшей модернизации старых и создания новых методик анализа. Дело в том, что различие свойств сорбента, используемого разными производителями, не допускает автоматический перенос хроматографических методик, разработанных для одних пластин на другие. Многие действующие сегодня в России методики хроматографического анализа предусматривают использование пластин «Silufof» (производства «Cavalier», ЧССР), которые в настоящее время уже не выпускаются. Они готовились с применением очень широкой фракции силикагеля и по основным характеристикам уступают пластинам «Sorbfil». В связи с этим в ЗАО «Сорбполимер» проводится большая работа по переводу существующих методик на использование пластин «Sorbfil».

Оборудование для нанесения проб

Количественный вариант тонкослойной хроматографии предъявляет повышенные метрологические требования ко всем стадиям анализа. Особенно велик вклад погрешностей, возникающих при нанесении пробы на пластину. Здесь приходится решать две задачи: правильно разместить на пластине максимальное число стартовых пятен и добиться минимального их размера. Диаметры стартовых пятен, нанесенных вручную, неизбежно имеют большой разброс, а это ухудшает качество разделения и искажает градуировочную кривую. Необходимую точность нанесения пятен и минимизацию их диаметра обеспечивают механические и автоматические аппликаторы.

Механический аппликатор «Сорбфил» (рис. 2), разработанный и внедренный ЗАО «Сорбполимер», обеспечивает дозированное точечное нанесение проб с заданным шагом. Его конструкция обладает рядом преимуществ перед наиболее близким аналогом — аппликатором Nanomat фирмы «САМАГ». В аппликаторе Nanomat микрокапилляры, сочетающие в себе высокую точность и простоту в использовании, не допускают

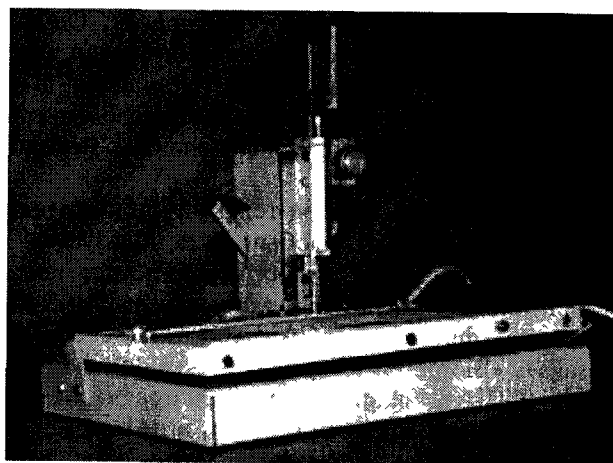


Рис. 2. Механический аппликатор «Сорбфил»

нанесения части пробы из капилляра, что затрудняет минимизацию диаметра стартового пятна. В аппликаторе «Сорбфил» используется микрошприц МШ-10Н, который обеспечивает нанесение любого объема пробы с высокой точностью и позволяет при дискретном дозировании получать стартовые пятна диаметром не более 1—2 мм. Применение нагревательного устройства УСП-1М для подсушивания нанесенных пятен дает возможность еще более минимизировать диаметр стартового пятна и тем самым увеличить точность количественного определения. Аппликатор «Сорбфил» прост и удобен в использовании, конструкция аппликатора исключает повреждение слоя сорбента на пластине иглой шприца.

Механические аппликаторы являются полуавтоматическими приборами. Погрешность, вносимая оператором, мала, но все же присутствует. Полностью автоматические аппликаторы, управляемые с помощью встроенного микропроцессора или компьютера, не требуют специального наблюдения после задания программы. Их отличает высокая точность нанесения пробы и воспроизводимость результатов. Но поскольку стоимость существующих в настоящее время автоматических аппликаторов (фирмы «Вагон», «САМАГ») слишком велика, они малодоступны для российских потребителей.

Специалисты ЗАО «Сорбполимер» разработали автоматический аппликатор, не уступающий по качеству зарубежным аналогам, при стоимости его на порядок ниже. Он позволяет наносить пробы не только в виде пятен, но и в виде тонких штрихов. Штриховое нанесение особенно удобно в практике препаративного разделения, так как можно наносить большие объемы пробы и соответственно увеличивать количество вещества на

пластине. При этом повышается эффективность разделения за счет уменьшения размывания пробы вдоль фронта подвижной фазы. Раствор подвижной фазы наносится под действием сжатого воздуха, что полностью исключает повреждение сорбционного слоя. Управление автоматическим аппликатором осуществляется с помощью компьютерной программы, в которой задаются длина и число штрихов (пятен), порядок отбора и количество наносимых проб. Применение автоматического аппликатора несомненно дает новый импульс развитию практики тонкослойной хроматографии в России, позволяя существенно повысить точность количественных расчетов.

Оборудование для детектирования хроматограмм

Следующей очень важной операцией, существенно влияющей на количественные результаты тонкослойной хроматографии, является визуализация разделенных при элюировании пятен. Для детектирования веществ по флуоресценции или поглощению УФ излучения на пластинах с УФ-индикатором применяются облучатели, работающие на длинах волн 254 и 365 нм. Современные хроматографические облучатели, как правило, работают на обеих длинах волн. Они монтируются в открытом или в закрытом корпусе. Наибольшей универсальностью обладает закрытая камера, не требующая для наблюдения затемненного помещения. ЗАО «Сорбполимер» производит хроматографический облучатель УФС 254/365 (рис. 3) с размещением ламп в закрытом корпусе прибора. Пластины наблюдают через тубус, позволяющий проводить работу в незатемненном помещении.

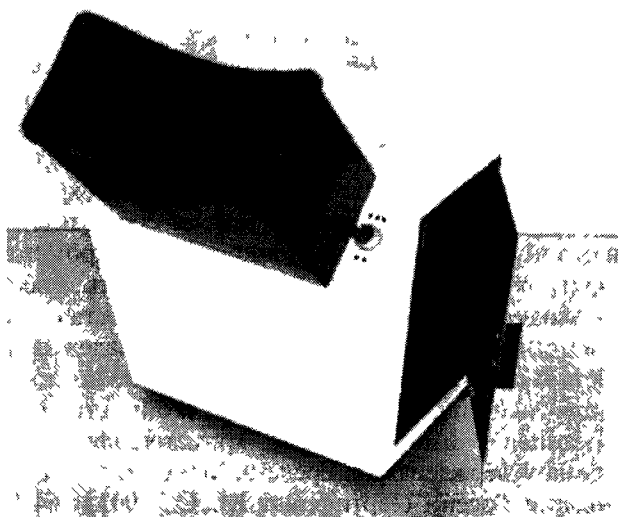


Рис. 3. Хроматографический облучатель УФС 254/365

Если вещества на хроматографической пластине невозможно обнаружить в видимом или УФ свете, то проводится обработка пластины проявляющими веществами, делающими пятна анализируемых веществ видимыми. Поскольку для проявления применяются в основном растворы веществ, обработка пластин осуществляется мелкокапельным опрыскиванием или погружением в детектирующий раствор.

Очевидно, что в случае процедуры опрыскивания, проводимой даже одним и тем же человеком, очень трудно добиться равномерности нанесения проявляющего вещества на пластину. Этот метод практически не поддается автоматизации и не обеспечивает в полной мере воспроизводимость результатов. Для целей количественной тонкослойной хроматографии предпочтительной является обработка детектирующими растворами методом погружения.

Автоматизация процесса обработки и использование кювет малого объема позволяет сократить расход реагентов, уменьшить негативное воздействие агрессивных веществ на оператора и снизить неравномерность нанесения раствора на пластину. Недаром крупнейшие производители хроматографического оборудования (фирмы «Desaga», «Varon», «SAMAG») постоянно совершенствуют механическое оборудование для обработки пластин этим методом.

Прибор для обработки пластин, разработанный и внедренный ЗАО «Сорбполимер» (рис. 4), позволяет автоматически производить вертикальное погружение пластины в раствор с заданной скоростью, выдержку в погруженном положении и извлечение пластины. Постоянство скорости и точное задание времени обработки обеспечивает существенно более равномерное нанесение раствора на пластину, и тем самым снижается погрешность количественных результатов.



Рис. 4. Прибор для обработки пластин проявляющими реагентами методом погружения

Оборудование для проведения количественных расчетов

В тонкослойной хроматографии применяется два принципиально различных метода количественной оценки: прямой — непосредственно на пластинах и косвенный — удаление разделенных веществ с пластин и анализ подходящими физико-химическими методами. К прямым методам измерения относится денситометрия. Она базируется на том положении, что размер и интенсивность окраски пятна есть функция количества вещества в пятне.

Уже в 1970-е годы существовало порядка 15-ти моделей механических денситометров, производивших прямую фотометрическую оценку хроматограммы. В конструктивном отношении все они представляют собой типичные спектрометры, в которых перемещающуюся хроматографическую пластину сканирует узкий луч света с определенной длиной волны. При такой схеме измерения требуется значительное время, а из-за сложности оптико-механической системы стоимость этих денситометров высокая.

Создание видеоденситометра, использующего для количественных расчетов видеоизображения хроматограмм, значительно ускорило процесс анализа. Кроме того, этот прибор позволяет сохранять данные для последующей обработки и облегчает документирование. Основным его преимуществом является высокая скорость обработки. Если съемка и расчет параметров пятен на пластине с помощью механического денситометра длится до 30 мин, то на видеоденситометре та же процедура занимает 2—3 мин, поскольку хроматограмма обрабатывается как единое целое. В свою очередь это требует равномерного освещения пластины, что представляет собой достаточно сложную инженерную задачу. Поскольку видеоденситометр состоит, в принципе, из устройств, обеспечивающих получение и обработку изображения, стоимость его как минимум вдвое ниже, чем механического денситометра.

В состав денситометра «Сорбфил», разработанного и изготовленного ЗАО «Сорбполимер», входит осветительная камера, цветная видеокамера, блок ввода изображения, компьютер, монитор, принтер и программное обеспечение (рис. 5). Денситометр «Сорбфил» не требует изменения существующих методик, способен обрабатывать любую хроматограмму в видимом или ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 или 365 нм, и благодаря простоте конструкции может использоваться в лабораториях любого типа.

Как отмечалось выше, равномерность освещенности пластины является одним из основных условий точности расчетов. Расположение ламп дневного света над пластиной и применение

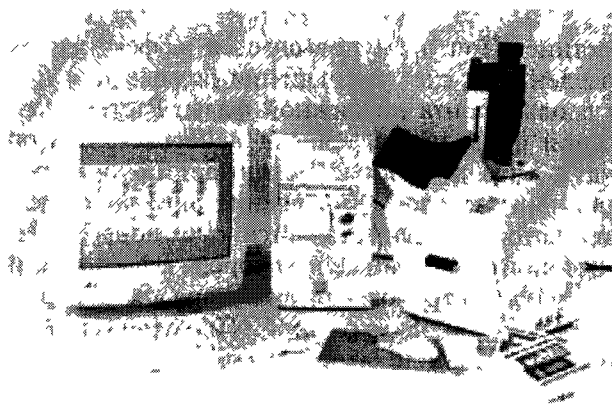


Рис. 5. Денситометр «Сорбфил»

светопоглощающей окраски позволяет добиться в осветительной камере очень высокой равномерности освещенности (98%).

Цветная видеокамера передает изображение через блок ввода на компьютер. Для пластин с окрашенными в видимом свете пятнами (в том числе и после обработки проявляющими веществами) предусмотрено получение изображений с помощью планшетного сканера, что значительно расширяет возможности видеоденситометра. Специальная программа позволяет по изображениям хроматограммы расчет состава веществ в смеси и концентрации вещества в пробе. Воспроизводимость измерений составляет 98% при относительном среднеквадратичном отклонении площади хроматографических зон менее 4%. Применение программных средств уменьшает трудоемкость расчета и снижает погрешность результатов анализа, создает возможность собрать банк сравнительных данных проведенных анализов. Результаты расчетов — графики, таблицы, текстовые пояснения, а также цветное изображение хроматограммы могут быть сохранены и отпечатаны в виде отчета.

Система для тонкослойной хроматографии с денситометром «Сорбфил», оснащенная комплектом устройств и приборов для нанесения дозированной пробы, ее разделения, регистрации и количественной обработки, значительно расширяет возможности количественной тонкослойной хроматографии в России. Она представляет собой интегрированную лабораторию тонкослойной хроматографии, обеспечивающую высокую точность и воспроизводимость анализов любой сложности. Эта хроматографическая система столь же надежна и проста в обслуживании, как и зарубежные аналоги, но при значительно более низкой стоимости. Разработанная в ЗАО «Сорбфил» хроматографическая система утверждена как средство измерения в Госстандарте России (сертификат RU.C.31.001.A 6488) и внесена в Государственный реестр средств измерений (регистрационный номер 18503-99).