

Využitie tlakovej vrstvovej chromatografie (OPLC) v analýze rezíduí herbicídov

JOZEF TEKEĽ – KATARÍNA SCHULTZOVÁ – JANA KOVAČIČOVÁ

Súhrn. Práca informuje o technike OPLC a možnosti jej uplatnenia v analýze rezíduí herbicídov – inhibitorov Hillovej reakcie. Overili sa podmienky separácie herbicídnych zlúčenín zo skupiny devinátov *s*-triazínu a fenyľmočoviny na chromatografických doskách Silufol® (20 × 20 cm) s tenkou vrstvou silikagélu. Na separáciu sa použili dvojzložkové mobilné fázy na báze *n*-hexán–octan etylový a chloroform–octan etylový. Skúmala sa závislosť času separácie od prietokovej rýchlosti mobilnej fázy, bol odvodený matematický tvar tejto závislosti pre mobilnú fázu chloroform–octan etylový (9 : 1).

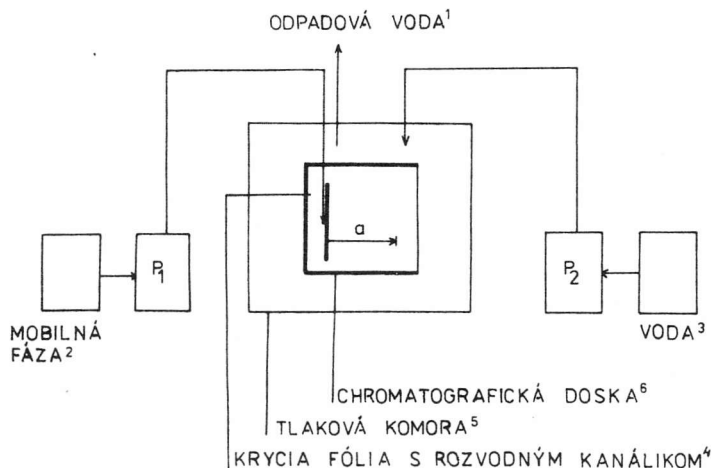
Tlaková vrstvová chromatografia (overpressure layer chromatography, OPLC) je výslednicou vývoja rovinnej chromatografie. Metóda využíva teoretické základy klasickej TLC rozšírené o výsledky teórie HPTLC, resp. HPLC.

Separácia zložiek analyzovanej zmesi metódou OPLC prebieha na chromatografickej doske v tlakovej komore. Pracovný tlak vytvára vodná poduška, ktorá pritláča kryciu fóliu na chromatografickú dosku a zabraňuje odparovaniu mobilnej fázy z povrchu chromatogramu. Vodnú podušku vytvára prívod vody do medzifóliového priestoru pomocou tlakovej pumpy. Mobilnú fázu (eluent) privádza na chromatografickú dosku samostatná pumpa. Mobilná fáza prechádza cez kovovú kapiláru, rozvod mobilnej fázy na chromatografickej doske zabezpečuje rozvodný kanálik na krycej fólii. Práca v uzavretom chromatografickom systéme s núteným prietokom mobilnej fázy vyžaduje úpravu okrajov chromatografickej dosky impregnačným prípravkom. Funkčná schéma zariadenia pre techniku OPLC je na obr. 1.

Odstránenie otvoreného chromatografického systému (komora nasýtená parami mobilnej fázy) zvyšuje reprodukovateľnosť podmienok chromatografickej separácie. Tieto možno definovať typom a hrúbkou vrstvy sorbenta na

Ing. Jozef Tekel, CSc., RNDr. Katarína Schultzová, Ing. Jana Kovačičová, CSc.,
Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

chromatografickej doske, zložením a prietokovou rýchlosťou mobilnej fázy, tlakom vodnej podušky na chromatografickú dosku, separačnou dráhou a pracovnou teplotou. Separačná účinnosť techniky OPLC sa dá porovnať s účinnosťou HPTLC.



Obr. 1. Schéma zariadenia pre techniku OPLC. P_1 – tlaková pumpa pre mobilnú fázu, P_2 – tlaková pumpa pre vodu, a – separačná dráha.

Fig. 1. Apparatus for the OPLC technique. P_1 – mobile phase pump, P_2 – water pump, a – separation distance. 1 – Waste water, 2 – Mobile phase, 3 – Water, 4 – Covering foil with the mobile phase channel, 5 – Pressure chamber, 6 – Chromatographic plate.

Základné teoretické poznatky a informáciu o zariadení pre tlakovú vrstvou chromatografiu poskytujú práce [1–4], prehľad o súčasnom stupni vývoja techniky OPLC poskytuje [5]. Pri klasickej vrstvovej chromatografii postup čela mobilnej fázy sa spomaľuje s časom. Vzdialenosť medzi čelom mobilnej fázy a miestom jej prívodu na chromatografickú dosku (štartom) rastie podľa vzťahu

$$z_f^2 = k \cdot t,$$

kde z_f – vzdialenosť čela od štartu, t – čas, k – konštanta.

Pri tlakovej vrstvovej chromatografii však platí vzťah

$$z_f = k \cdot t$$

Znamená to, že mobilná fáza postupuje konštantnou rýchlosťou. Preto je rozdeľovanie technikou OPLC oproti klasickej chromatografii na tenkých vrstvách rýchlejšie.

Chromatogramy získané technikou OPLC možno vyhodnotiť rovnako ako klasicky získané chromatogramy, teda pomocou ďalších dodatkových zariadení (napr. denzitometricky).

Tlaková vrstvomá chromatografia sa doteraz najviac využíva pri separácii zmesi prírodných látok. Dallenbach-Toelke a kol. [6] separovali technikou OPLC flavonoidné glykozidy, chromatogram vyhodnotili denzitometricky. Fatér a kol. [7] separovali aminokyseliny po derivatizácii na fenyl-2-tiohydantoínové deriváty, takisto s denzitometrickým hodnotením chromatogramu. Petit-Paly a kol. [8] použili techniku OPLC na separáciu zmesi alkaloidov. Aczél [9] stanovil obsah karotenoidov v červenej paprike po separácii technikou OPLC spektrofotometricky.

Je známe i využitie OPLC pri analýze kontaminantov v potravinách. Váradí a Harsányi [10] tak separovali aflatoxíny B_1 , B_2 , G_1 a G_2 v arašidoch. Pracovali na chromatografických doskách HPTLC silica gel 60 F_{254} (Merck Darmstadt) s mobilnou fázou chloroform–octan etylový–tetrahydrofurán (4:6:0,3). Chromatogramy hodnotili denzitometricky. Technika OPLC sa použila aj pri stanovení zearelenónu v kukurici a ryži [11]. Na našom pracovisku sme aplikovali techniku OPLC pri analýze rezíduí triazínových a fenylmočovínových herbicídov. Chromatogramy sme kvantitatívne hodnotili chronometrickou metódou [12] s využitím biochemickej detekcie na základe inhibície Hillovej reakcie.

Experimentálna časť

Pomôcky a zariadenia. Prístroj CHROMPRES 25 na tlakovú vrstvomú chromatografiu (Labor MIM Budapest, Hungary). Polymérny prípravok IMPRES (Labor MIM Budapest, Hungary). Chromatografické dosky Silufol® (20 × 20 cm), hrúbka vrstvy silikagélu $d_f = 0,1$ mm (sklárný Kavalier Votice). Chromatografické dosky sme pred použitím prečistili jednoduchým chromatografovaním v acetóne. Ultrazvukové zariadenie UC 005 (Tesla, k. p., Vrāble). Štandardné roztoky herbicídnych zlúčenín v acetóne ($c = 10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, resp. $c = 1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Materiál a metóda

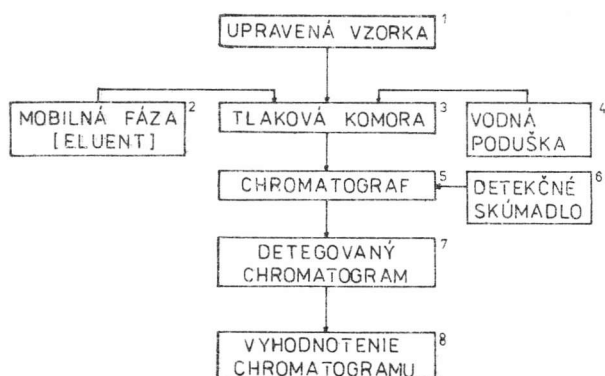
Prípravu detekčného skúmadla, izolačné a čistiacie postupy na stanovenie rezíduí triazínových a fenylmočovínových herbicídov v rastlinných materiáloch opisujú práce [12, 16].

Pracovné podmienky pre techniku OPLC:
 Externý tlak vodnej podušky: 1,5 MPa
 Začiatočný tlak mobilnej fázy: 0,05 MPa
 Separačná dráha: 16 cm
 Prietoková rýchlosť mobilnej fázy: 0,17–0,98 ml·min⁻¹
 Pracovná teplota: 23 °C
 Použité mobilné fázy: S₁ až S₆

Zloženie mobilnej fázy:

- S₁: n-hexán–octan etylový (3:1), v/v
- S₂: n-hexán–octan etylový (2:1)
- S₃: n-hexán–octan etylový (1:1)
- S₄: chloroform–octan etylový (3:1)
- S₅: chloroform–octan etylový (4:1)
- S₆: chloroform–octan etylový (9:1)

Schéma pracovného postupu je na obr. 2.



Obr. 2. Schéma postupu stanovenia rezíduí herbicídov triazínového a fenylmočovínového typu metódou OPLC.

Fig. 2. Procedure for the determination of triazine and phenylurea herbicides by OPLC. 1 – Cleaned-up sample, 2 – Mobile phase (eluent), 3 – Pressure chamber, 4 – Water cushion, 5 – Chromatogram, 6 – Detection reagent, 7 – Detected chromatogram, 8, Evaluation of the chromatogram.

Techniku OPLC sme využili pri hľadaní možností lepšej separácie rezíduí vybraných typov herbicídnych zlúčenín zo skupiny inhibítorov Hillovej reakcie. Pri analýze vzoriek rastlinného materiálu a mlieka sme použili čistiaci a izolačný postup vypracovaný pre techniku TLC, resp. pre konečné stanovenie metódami GLC alebo HPLC [12, 13, 16]. Overili sme možnosť použiť chromatografické dosky Silufol® s hrúbkou silikagélovej vrstvy 0,1 mm na techniku OPLC.

Vplyv prietokovej rýchlosti mobilnej fázy na čas separácie sme skúmali modelovo pre mobilnú fázu S_6 .

Výsledky a diskusia

Prednosťou OPLC je možnosť voľby prietokovej rýchlosti mobilnej fázy, ktorá významne vplyva na čas separácie analyzovanej zmesi pri konštantnej separačnej dráhe (obr. 3a). Zvýšením prietokovej rýchlosti sa skrúti čas analýzy. Pre závislosť separačného času od prietokovej rýchlosti mobilnej fázy platí vzťah

$$t = a + b(1/V),$$

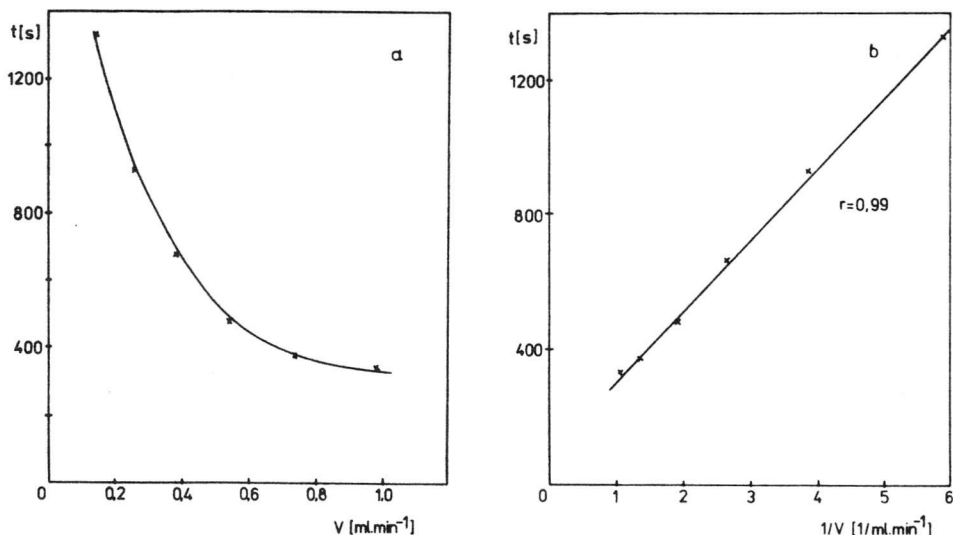
kde t je separačný čas [s], a , b – konštanty, V – prietoková rýchlosť mobilnej fázy [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$].

Pre mobilnú fázu S_6 (chloroform–octan etylový 9:1) sme odvodili na základe experimentálnych údajov (obr. 3b) tvar rovnice

$$t = 121,83 + 204,15(1/V).$$

Separálny čas pre triazínové a fenyľmočovínové herbicídy na chromatografickej doske Silufol (20×20 cm) je asi 40 min; technika OPLC skrúti tento čas asi na 14 min pri použitej prietokovej rýchlosti $0,27 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Zvyšovanie prietokovej rýchlosti mobilnej fázy nad hodnotu $0,4\text{--}0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ už výrazne neovplyvní čas separácie (obr. 3a). Pri skrútení separačného času pod 10 min môže nastať deformácia tvaru škvŕn a zhoršenie rozdelenia separovaných herbicídnych zlúčenín.

Technika OPLC umožňuje prácu s rôznymi mobilnými fázami, najčastejšie dvojzložkovými alebo trojzložkovými. Na separáciu triazínových a fenyľmočovínových herbicídov sme použili dvojzložkové mobilné fázy S_1 až S_6 . Dosiahnuté rozdelenie herbicídnych zlúčenín zhŕňa tab. 1. Triazínové herbicídy sa výhodne delia v sústave S_2 alebo S_4 , fenyľmočovínové v sústave S_3 . Dokonalé súčasné rozdelenie triazínových a fenyľmočovínových herbicídov sme nedosiahli, súčasný výskyt týchto látok v praxi však neprichádza do úvahy. Zlúčeniny s veľmi blízkou chemickou štruktúrou (prometryn–terbutryn, linuron–chlorbromuron–metobromuron) sme uspokojivo neoddelili ani technikou OPLC. Určité možnosti separácie zlúčenín s blízkou chemickou štruktúrou naznačuje práca [14], ktorá opisuje úpravu zariadenia na gradientovú elúciu.



Obr. 3. Závislosť času separácie herbicídnych zlúčenín od prietokovej rýchlosti mobilnej fázy chloroform–octan etylový (9:1). a – graf experimentálnych hodnôt, b – linearizovaný tvar.
 Fig. 3. The dependence of the separation time of herbicides on the mobile phase flow rate chloroform–ethyl acetate (9:1). a – experimental values, b – linearized form.

T a b u l k a 1. Separácia herbicídnych zlúčenín technikou tlakovej vrstvovej chromatografie. Prietoková rýchlosť mobilnej fázy 0,27 ml.min⁻¹.
 T a b l e 1. Separation of herbicides by overpressure layer chromatography. Mobile phase flow rate 0.27 ml .min⁻¹

Herbicíd ¹	R_f					
	S_1	\hat{S}_2	S_3	S_4	S_5	S_6
Atrazine	0,39	0,44	0,65	0,51	0,45	0,27
Simazine		0,34	0,55	0,35	0,33	0,24
Prometryn		0,56	0,77	0,72	0,67	0,59
Cyanazine		0,23	0,52	0,34	0,25	0,20
Terbutryn		0,53	0,75	0,71	0,67	0,61
Desmetryn		0,31	0,54	0,37	0,34	0,25
Linuron	0,27	0,30	0,53	0,77	0,74	
Chlorbromuron	0,26	0,30	0,53			
Metobromuron	0,28	0,34	0,54			
Chloroxuron	0,04	0,04	0,17			
Metoxuron	0,02	0,02	0,10			
Metabenzthiazuron	0,10	0,10	0,25	0,47	0,45	
Izoproturon	0,05	0,06	0,20			
Rušivá zóna ²	0,71	0,72	0,82	0,89	0,88	0,81

¹ – Herbicide, ² – Disturbing zone.

Vzhľadom na používané pracovné tlaky pri technike OPLC môže sa vytvoriť pri práci so zmesnými mobilnými fázami tzv. rušivá zóna (disturbing zone), na ktorú upozornil Nyiredy a kol. [15]. Poloha zóny môže narušiť separáciu analyzovanej zmesi. Odstránenie rušivej zóny dosiaľ nie je uspokojivo vyriešené. V našej práci sme sa pokúsili eliminovať tvorbu rušivej zóny odplynením mobilnej fázy na ultrazvukovom zariadení tesne pred použitím. Použitie ultrazvuku (5 min alebo 10 min) značne znížilo ostrosť rušivej zóny, nepodarilo sa ju však úplne odstrániť.

Techniku OPLC sme overili aj pri rozdelení rezíduí triazínových a fenylmočovínových herbicídov v prítomnosti koextraktov z reálnych materiálov, menovite z mlieka a niektorých poľnohospodárskych plodín. Izolačné a čistiacie postupy, vypracované pre konečné stanovenie týchto rezíduí metódami TLC, GLC a HPLC, boli vhodné aj na spracovanie vzoriek technikou OPLC. Chronometrická metóda na stanovenie inhibítorov Hillovej reakcie sa uplatnila rovnako na klasických tenkovrstvových chromatogramoch, ako aj na chromatogramoch získaných technikou OPLC. Z toho vyplýva, že tlakovú vrstvovú chromatografiu možno považovať za perspektívnu v oblasti analýzy rezíduí pesticídov, kde môže slúžiť ako rýchlejšia, exaktnejšia a lepšie reprodukovateľná moderná náhrada klasickej TLC.

Literatúra

1. TYIHÁK, E. – MINCSOVICS, E. – KALÁSZ, H., *J. Chromatogr.*, 174, 1979, s. 75.
2. MINCSOVICS, E. – TYIHÁK, E. – KALÁSZ, H., *J. Chromatogr.*, 191, 1980, s. 293.
3. TYIHÁK, K. – MINCSOVICS, E. – KÖRMENDI, F., *Hung. Sci. Instrum.*, 1983, č. 55, s. 33.
4. TYIHÁK, E. – MINCSOVICS, E., *Hung. Sci. Instrum.*, 1984, č. 57, s. 1.
5. TYIHÁK, E. – MINCSOVICS, E., *J. Planar Chromatogr.*, 1, 1988, s. 6.
6. DALLENBACH-TOELKE, K. – NYIREDEY, SZ. – MEIER, R. – STICHER, O., *J. Chromatogr.*, 365, 1986, s. 63.
7. FATÉR, S. – DIBÓ, G. – MINCSOVICS, E. – SZÓKAN, GY.: *Proc. Int. Symp. on TLC with Special Emphasis on OPLC, Szeged 1984*. Ed. E. Tyihák. Budapest, Labor MIM 1986, s. 309.
8. PETIT-PALY, J. – POTHIER, J. – MONTAGU, M. – GALAND, N. – CHENIEUX, J. C. – RIDEAU, M. VIEL, C.: *Proc. 2nd Int. Conf. Biochem. Separations*. Eds. J. Pick, J. Vajda. Keszthely 1988, s. 167.
9. ACZÉL, A., *Acta Alimentaria*, 17, 1988, s. 37.
10. VÁRADI, M. – HARSÁNYI, G., *Hung. Sci. Instrum.*, 1985, č. 59, s. 1.
11. SAWINSKY-ACSÁDI, J. – HALÁSZ, A. – TYIHÁK, E., *Élelmezési Ipar*, 41, 1987, s. 324.
12. KOVÁČ, J. – TEKEL, J. – KURUCOVÁ, M., *Z. Lebensm. – Unters. Forsch.*, 184, 1987, s. 96.
13. TEKEL, J. – ŠPAŇÁR, M. – KOVAČÍČOVÁ, J., *Čs. Hyg.*, 33, 1988, s. 531.
14. VAJDA, J. – LEISZTNER, L. – PICK, J. – ANH-TUAN, N., *Chromatographia*, 21, 1986, s. 152.

15. NYIREDY, SZ. – MÉSZÁROS, S. Y. – DALLENBACH-TOELKE, K. – NYIREDY-MIKITA, M. – STICHER, O., J. HRC and CC, 10, 1987, s. 352.
16. KOVÁČ, J. – ZELENÁK, J. – KURUCOVÁ, M. – TEKEĽ, J., Agrochémia, 26, 1986, s. 115.

Do redakcie došlo 27. 9. 1989

Использование слойной хроматографии под давлением в анализе остатков гербицидов

Резюме

Работа информирует о технике слойной хроматографии под давлением и о возможностях ее применения в анализе остатков гербицидов – ингибиторов реакции Хилла. Авторы проверили условия отделения гербицидных соединений группы производных с-триазина и фенилмочевины на хроматографических плитах Silufol® (20 × 20 см) с тонким слоем силикагеля. Для отделения авторы применили двухкомпонентные подвижные фазы на основе н-гексан–этилацетат и хлороформ–этилацетат. Была исследована зависимость время отделения от проточной скорости подвижной фазы, был выведен математический образец этой зависимости для фазы хлороформ–этилацетат (9:1).

Utilization of overpressure layer chromatography (OPLC) in the analysis of herbicide residues

Summary

The paper informs on the OPLC technique and the possibilities of its utilization in the analysis of the residues of herbicides which are the Hill reaction inhibitors. The separation conditions for s-triazine-based and phenylurea-based herbicides were tested on chromatographic plates Silufol® (20 × 20 cm) with a silica gel thin layer. Two-component mobile phases on the basis of n-hexane–ethyl acetate and chloroform–ethyl acetate were used for the separation. The dependence of the separation time on the mobile phase flow rate has been investigated and the mathematical form of this dependence has been derived for the mobile phase chloroform–ethyl acetate (9:1).