

六六六异构体的薄层层析测定法

I 直接扫描法测定六六六原粉中的 γ -体

李妙容 靳风云* 李德明*
(化学系)

薄层层析法(TLC)在六六六异构体研究中的应用愈来愈广泛,许多文献^[1-10]报导了六六六异构体的分离、鉴定和半定量测定法。本文在改进薄层层析条件的基础上,建立适用于六六六各种异构体测定的薄层层析直接定量法,用直接扫描法测定六六六原粉中 γ -体的含量,方法快速、操作简便,易于掌握,灵敏度和精密度也较高,测定结果的相对标准偏差为 $\pm 1.6\%$ 。

实 验

一、主要仪器与试剂

(一) 仪器

1. HR67型紫外线杀菌灯
2. 岛津CS-900薄层层析扫描仪

(二) 试剂

1. 硅胶GF:上海萤光化学厂出品。硅胶G:上海五四农场出品的层析用硅胶,用球磨机研磨8小时后,加15%自制煨石膏**。
2. 正己烷:分析纯。
3. 石油醚:沸程30~60℃,分析纯。
4. 丙酮:分析纯。
5. 20%(w/v)二苯胺(分析纯)丙酮溶液。
6. 六六六 γ -体标准溶液:用广东省化工研究所提供的纯度 $\geq 99.5\%$ 的六六六 γ -体纯品,加正己烷配制成 $1\mu\text{g}/1\text{ml}$ 的标准溶液。

* 化学系分析专业74届毕业生。

**煨石膏的制备:10%CaCl₂与10%H₂SO₄在搅拌下等体积混合,沉淀,过滤,用蒸馏水洗至沉淀物至无Cl⁻,置于140℃烘箱中烘4小时后取出,用研钵稍研磨,重置于140℃烘箱中烘30分钟,取出,密闭保存。

二、操作方法

(一) 薄层板的制备

称取7克硅胶GF(或硅胶G)置于小研钵中,加15ml蒸馏水,研磨至稀糊状,立即用涂布器均匀地涂布于10×20cm的玻璃板上,使成厚度约为0.3mm的薄层,晾干后置于80℃烘箱中活化15~20分钟或在室温下放置18~20小时,贮于干燥器中备用(若用上海五四农场产之层析用硅胶配制成的硅胶G铺板,则需在110℃活化30分钟,移入干燥器中12小时后使用)。

(二) 薄层层析

在距薄层板下端1.5cm、两边1cm的起始线上,用微量注射器分别点上不同量的 γ -体标准溶液和一定量的样品溶液(用正己烷配制),点与点之间相距1—1.5cm,待溶剂挥干后置于事先盛有正己烷—石油醚(1:4)展开剂,并且三面有滤纸作内衬的层析缸中展开,当溶剂前沿上升至17~18cm时,取出晾干,用当天配制的20%二苯胺丙酮溶液均匀喷雾,溶剂挥干后,置于紫外灯下8~10cm处照射,约5分钟后白色底板上出现六六六各异构体的兰色斑点。

(三) 扫描测定

将获得的薄层色谱置于岛津CS-900薄层层析扫描仪的扫描台上,用单波长法在580nm下进行锯齿形扫描,采用双笔记录器同时绘出各有关斑点的反射光波峰曲线及其积分值(峰面积),根据积分值与物质的量成直线关系,以积分值对 γ -体的量作图则可制得工作曲线,从工作曲线上找出在同一板上测得的样品点的积分值所对应的 γ -体量,然后按下式计算样品中 γ -体的百分含量。

$$x = \frac{aV_0}{WV} \times 100$$

式中: a —斑点中 γ -体的量(μg).

W —样品的重量(mg).

V_0 —样品溶液的体积(ml).

V —样品溶液的点样体积(μl).

结果与讨论

1. 吸附剂

在有机氯农药的薄层层析中,硅胶是最常用的吸附剂。我们用不同型号的五种硅胶进行了比较,结果(表I)表明,它们都能用于六六六异构体的分离。本文主要采用2号和4号吸附剂。

2. 展开剂

关于有机氯农药的薄层层析展开剂,文献中有不少报导^{[1][4][6]},我们对下列

表 I 吸附剂的比较

NO	吸附剂	活化条件	分离效果
1	E. Merck 硅胶 GF ₂₅₄	80°C 活化 15~20 分钟 或室温放置 18~20 小时	展开 17~18cm 已能将五种异构体分离, 斑点呈圆形, 边缘清晰。
2	上海荧光化学厂产硅胶 GF ₂₅₄	同上	同上
3	上海荧光化学厂产硅胶 H + 15% 自制煅石膏。	80°C 活化 15 分钟	展开 17~18cm 能将各异构体分离, 斑点呈圆形, 但扩散较明显。
4	上海五四农场产层析硅胶, 经球磨机研磨 8 小时后, 加 15% 自制煅石膏	110°C 活化 30 分钟	展开 20cm 以上才能将各异构体分开, 斑点呈椭圆形, 边缘清楚, 展开速度快。
5	浙江黄岩产的硅胶 GF ₂₅₄ 预制板	用前未经活化	展开 11~12cm 即能将各异构体很好地分开, 斑点呈圆形, 边缘清楚, 但展开速度较慢。

展开剂: 正己烷——石油醚(1:4)。

展开剂进行了对照试验。

(1) 石油醚(沸程 30~60°C)

(2) 石油醚—丙酮 99.5:0.5

(3) 石油醚—丙酮 99:1

(4) 正己烷—石油醚 4:1

(5) " 1:1

(6) " 2:3

(7) " 1:3

(8) " 1:4

(9) 正己烷——氯仿 97:3

(10) 正己烷——四氯化碳 97:3

(11) 正己烷——乙腈 40:1

(12) 环己烷——二甲基甲酰胺 19:1

(13) 石油醚——醋酸 19:1

试验结果表明, 除 11、12、13 号溶剂系统不能将各异构体有效地分离外, 其余各展

开剂均有一定的分离效果,其中,正己烷—石油醚(1:4)或(1:3)分离效果最好,其优点是:(1)分离效果好,在多种硅胶板上,一次展开即能将五种异构体有效地分开(见图1)。(2)溶剂纯度要求不高,市售的分析纯试剂直接配制即可,用前不需蒸馏纯化。(3)两溶剂的混合比例区间比较宽,便于操作,如用(1:3)和(1:4)展开所获得的各异构体的 R_f 值几乎无变化(见表I)。

表I 六六六异构体的 R_f 值

层开剂	α -	β -	γ -	δ -
正己烷—石油醚1:3	0.54	0.25	0.38	0.12
正己烷—石油醚1:4	0.58	0.25	0.38	0.12

吸附剂:硅胶G.

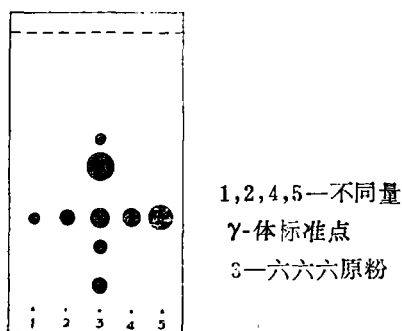


图1 六六六的薄层色谱

3. 显色剂

有机氯农药的显色是一个困难的课题。硝酸银类、芳香胺类以及罗丹明B、溴酚兰等显色剂都曾被用作有机氯农药的检出⁽⁶⁾⁽¹¹⁾。我们对上述各类型的十多种显色剂进行了筛选,结果表明:碘蒸气和罗丹明B与亮绿、溴酚兰等有机染料显色的灵敏度太低,在本实验用的硅胶G薄层上,8微克六六六原粉层析后仍不显出任何斑点。

硝酸银类显色剂的配制方法很多,是有机氯农药的最常用的显色剂。然而人们对它的评价却很不一致⁽⁶⁾⁽¹²⁾。我们的试验表明:此类显色剂的一个突出的问题是重现性不好,显出斑点所需的紫外灯照射时间的长短很不一致,有时虽经长时间照射也根本不显出斑点。其次是底板逐渐变暗,斑点边缘模糊,虽然在喷洒显色剂前先用紫外灯预照30分钟,结果有所改善,但仍不能从根本上克服上述缺点。考虑到定量测定的要求,硝酸银类显色剂并不理想。

用邻甲联苯胺显色,在我们的实验条件下,0.1微克 γ -体仍能给出轮廓清晰的兰色斑点,但因其颜色迅速变浅,以致不能用作定量测定。然而,进行定性检定时,仍不失为较理想的显色剂。

用5~20%的二苯胺丙酮(或乙醇)溶液喷雾显色,同样能使六六六显出兰色的斑点,20%的二苯胺丙酮溶液能使60微克六六六原粉显出五个异构体的斑点(见图1), γ -体最低检出量为0.3微克,灵敏度虽不及邻甲联苯胺,但它的颜色较稳定,底板清楚,能满足定量分析的要求,所以我们选用它作显色剂。鉴于斑点颜色随显色剂浓度的增加而有所加深,因而我们采用了高浓度的显色剂,但使用时要注

意喷雾均匀,雾滴要细。

4. 扫描条件的选择

用显色剂显色后的薄层色谱,在CS-900薄层层析扫描仪下,所给出的反射光波峰的峰面积与物质的量成直线关系。本法就是根据这一原理进行扫描测定的。

为了确定扫描的波长,将用二苯胺显色所获得的六六六兰色斑点,置于CS-900薄层层析扫描仪上,测定其在不同波长下的反射吸光度,获得如图2所示的吸收光谱。在580~590nm处有最高吸收。鉴于其最低吸收440~450nm处仍有相当高的吸光度值,为保证测定有较高的灵敏度,最终测定时,采用单波长法在580nm下进行。为了克服原点大小不一、斑点形状不规则及斑点中颜色不均匀所引起的误差,采用了小光束(1.25×1.25mm)锯齿形方式扫描。此外,由于薄层和显色的不均匀以及溶剂前沿附近杂质等影响,常使扫描基线弯曲(如图3a),影响积分值的准确判断,因此扫描时需用背景校正仪校正其影响,使基线漂移减小(如图3b),以提高测定的准确性。

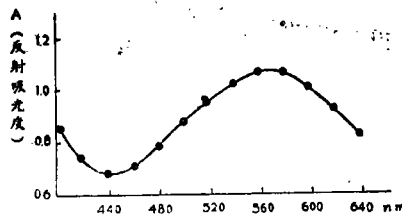


图2 吸收光谱

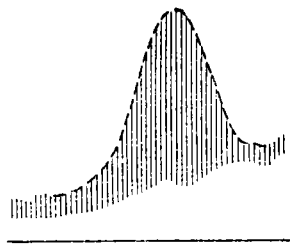


图3a 未用背景校正仪的图形

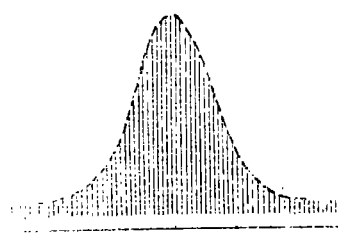


图3b 用背景校正仪后的图形

在上述条件下进行测定时,对1—12微克的 γ -体,积分值与含量成直线关系,所以在此范围内,可以方便地用工作曲线法进行测定。

5. 分析结果和测定方法的比较

为了比较方法的可靠性,我们在用直接扫描法测定后也用斑点面积测量法对同一斑点进行了测量,其结果列于表Ⅱ。

表Ⅱ 分析结果

点样量* (微克)	直接扫描法			斑点面积测量法**		
	测得 γ -体量 (微克)	样品中 γ -体 含量(%)	偏差	测得 γ -体量 (微克)	样品中 γ -体 含量(%)	偏差
30	3.80	12.7	-0.1	3.54	11.8	-0.9
30	3.90	13.0	+0.2	4.17	13.9	+1.2
40	5.20	13.0	+0.2	5.16	12.9	+0.2
50	6.30	12.6	-0.2	6.00	12.0	-0.7
平均值	12.8%			12.7%		
相对标准偏差	±1.6%			±7.6%		

* 一定量的六六六原粉，用正己烷配成2mg/ml或5mg/ml的点样溶液。

** 斑点的轮廓用透明纸描下后套在毫米方格纸上求得斑点的面积，再代入经过改进的珀迪——特拉特公式计算。

表Ⅱ的数据表明，斑点面积测量法的精密密度远远不及直接扫描法，其主要原因是原点大小不一以及测量斑点面积时的误差所致。用CS—900薄层层析扫描仪扫描测定时，由于有锯齿形扫描装置及背景校正附件，可克服原点大小不一等所引起的误差，所以操作简便、快速、重现性好。测定六六六原粉中 γ -体含量的相对标准偏差为±1.6%，是目前较为理想的薄层层析直接定量测定法。

由于在本法的层析过程中，获得 γ -体蓝色斑点的同时，也呈现了颜色相同的 α -、 β -、 δ -和 ϵ -异构体的斑点。它们也具有如图2所示的吸收光谱，故可推知，这些异构体的含量也可以按照类似的步骤进行测定。

参 考 文 献

- [1] S. N. Tewari, I. C. Sharma, *J. Chromatogr.*, 131(1977), 275.
- [2] U. Grundey, P. Kraus, *Ibid.*, 117(1976), 1, 242.
- [3] A. Szokolay et al., *Ibid.*, 106(1975), 2, 401.
- [4] H. Thielemann, *Z. Anal. Chem.*, 266(1973), 3, 208.
- [5] H. Thielemann, *AA*, 31(1976), 5G34.
- [6] 商检群(编), 农药残留量薄层层析法, 中国财政经济出版社, 1976.
- [7] 环境污染分析技术资料汇编, 中国建筑工业出版社, 1977, 203.
- [8] K. Visweswarish, M. Jayaram, *AA*, 23(1972), 925, *CA*, 76(1972), 109006.
- [9] Л. И. Бублик, Е. С. Кооматый, *Зав. Лаб.*, 36(1970), 1194.
- [10] S. N. Tewari, I. C. Sharma, *Mikrochim. Acta*, 1976, 3-4, 323.
- [11] K. Naranaswami et al., *J. Chromatogr.*, 95(1974), 2, 181.
- [12] D. C. Abbott et al., *J. Chromatogr.*, 16(1964), 481.