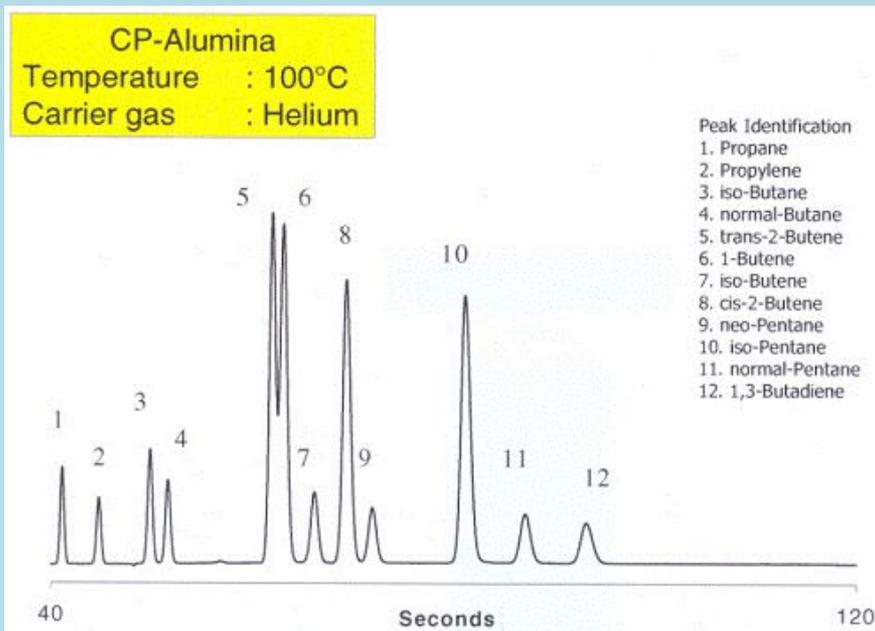




Физико-химические методы исследования биологически активных веществ



Подготовила: Тогыс Кундыз
Группа: ФА12.003-02

Планы:

- Хроматография
- История хроматография
- Основы хроматографических методов
- Классификация методов хроматографии
- Заключение
- Список использованной литературы

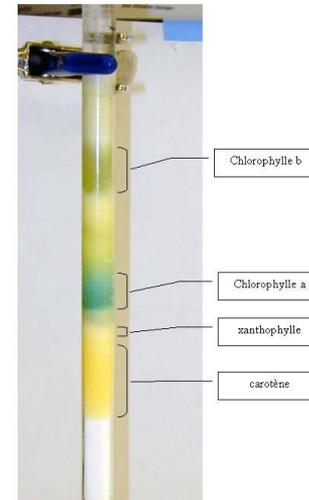
Хроматография – физико-химический метод,

используется для разделения веществ

аналитические цели



препаративные цели



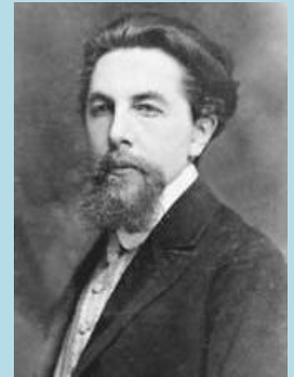
Служит для идентификации и количественного определения органических и неорганических веществ

Из истории хроматографии

День рождения хроматографии – 21 марта 1903г.

Доклад М.С. Цвета «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу»

Свой метод М.С. Цвет назвал – «хроматография»
(запись цвета)



Михаил Семёнович Цвет
(1872—1919)

Ричард Кун (институт фундаментальной медицины г. Гейдельберг) (1938г. Нобелевская премия по химии за предложенную Цветом адсорбционную хроматографию каротиноидов и витаминов):

Альфред Винтерштайн (1915г. Нобелевская премия по химии за исследования хлорофиллов)

Арчер Портер Мартин, Ричард Лоуренс Миллингтон Синдж (1938г. первый противоточный экстрактор с использованием воды и хлороформа для разделения олигопептидов; 1940г. Использование жидкость-жидкостной хроматографии для разделения аминокислот; 19 ноября 1941г. Статья «Новая форма использования двух жидких фаз для хроматографии» в «Biochemical journal»; 1952г. Нобелевская премия за открытие распределительной хроматографии)

Арчер Портер Мартин, Энтони Траффорд Джеймс (50-е годы первый газовый хроматограф)

Измаилов, Шрайбер (1938г. Первые работы по тонкослойной хроматографии)

Шталь (1956г. Использование тонкослойной хроматографии как аналитического метода)

Современные хроматографические методы:

- капиллярная газовая хроматография (КГХ),
- высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ),
- высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ),
- высокоэффективная ионная хроматография (ВЭИХ),
- сверхкритическая флюидная хроматография (ВЭИХ),
- капиллярный электрофорез (КЭ)

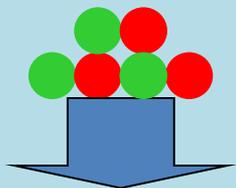
«Никакое другое открытие не оказало на исследования в органической химии такого огромного продолжительного влияния, как анализ с помощью адсорбционной хроматографии Цвета» Каррер, 1947г.

Перечень основных загрязнителей окружающей среды, анализируемых хроматографическими методами

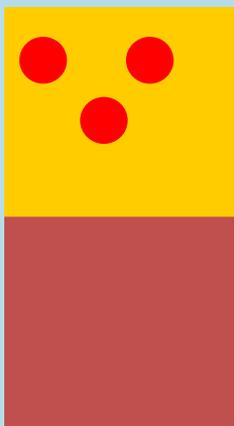
Перечень загрязнений	Методы хроматографии
Органические примеси в атмосфере, воде и почве	ГХ, ЖХ, ГХ + МС ЖХ + МС
Вредные газы в атмосфере (NO ₂ , SO ₂ , SO ₃ , HCl, HF, Cl ₂ , NH ₃ и др.)	ИХ, ГХ
Нефтепродукты в воде	ГХ, ЖХ
Пестициды в воздухе, воде, почве, пище, фураже	ГХ, ЖХ
Хлорорганические соединения в воздухе и воде	ГХ, ЖХ
Фталаты в воде	ЖХ
Ароматические амины	ЖХ
Ароматические соединения (бензол, толуол, этилбензол, ксилол) в воздухе и воде	ГХ + ФИД
Полиядерные ароматические соединения	ГХ, ЖХ
Фенол и его производные	ЖХ, ГХ
Фреоны в стратосфере	ГХ
Нитрозамины в пище	ГХ, ЖХ
Тяжелые металлы в воде и почве	ИХ, ЖХ
Афлатоксины в пище и фураже	ЖХ, ГХ
Полихлорбифенилы	ГХ, ЖХ
Полихлорированные диоксины	ГХ + МС
Летучие хлорорганические соединения в питьевой воде	ГХ + АРП
Анионы (фторид, хлорид, нитрат, сульфат) в поверхностных и питьевых водах	ИХ
Нитраты в воде, почве и пище	ИХ
Цианид в питьевой воде	ИХ + АД

Примечание: ГХ – газовая хроматография, ЖХ – жидкостная хроматография, ИХ – ионная хроматография, МС – масс-спектрометрия, АРП – анализ равновесного пара, ФИД – фотоионизационный детектор, АД – амперометрический детектор.

Принцип хроматографического разделения веществ



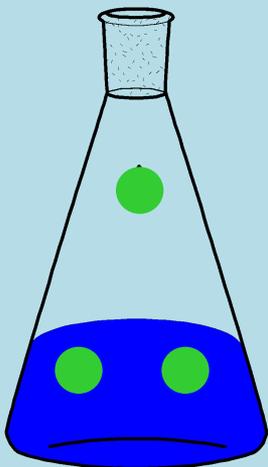
Молекулы разделяемых веществ



Неподвижная фаза

Подвижная фаза

Эффект разделения основывается на том, что соединения проходят расстояние, на котором происходит разделение, с некоторой, присущей этому соединению задержкой



Хроматографический процесс состоит из целого ряда сорбции и десорбции, а также растворения и элюирования, которые каждый раз приводят к новому равновесному состоянию

Классификация методов хроматографии

- 1) По типу агрегатного состояния фаз;
 - Газовая хроматография (ГХ)
 - Жидкостная хроматография (ЖХ)
- 2) природа элементарного акта; **распределительная хроматография**
 - Газо-твердая адсорбционная хроматография**
 - Проявительная (элюентная), Фронтальная, вытеснительная**
- 3) способ относительного перемещения фаз;
 - Качественный анализ смеси**
 - Количественный анализ смеси,**
 - Препаративное выделение веществ**
- 4) цель осуществления процесса

Классификация методов хроматографии

По типу агрегатного состояния фаз

Газовая хроматография (ГХ)

Жидкостная хроматография (ЖХ)

Критерии использования метода

летучие вещества,
испаряются без разложения

вещество должно быть растворимо
в каком-либо растворителе

По типу процесса разделения

Адсорбционная

Распределительная

стационарная фаза –
твёрдая активная основа

Стационарная фаза –
жидкость, нанесенная на твёрдый
неактивный носитель

Принцип: вещества с разной силой
адсорбируются на твёрдой фазе
и снова десорбируются

Принцип: в зависимости от
растворимости, вещества
распределяются между двумя
несмешивающимися жидкостями

По технике проведения

Внешняя хроматограмма

Внутренняя хроматограмма

вещества детектируются
вне зоны разделения

вещества детектируются в зоне разделения
(ТСХ, бумажная хроматография)

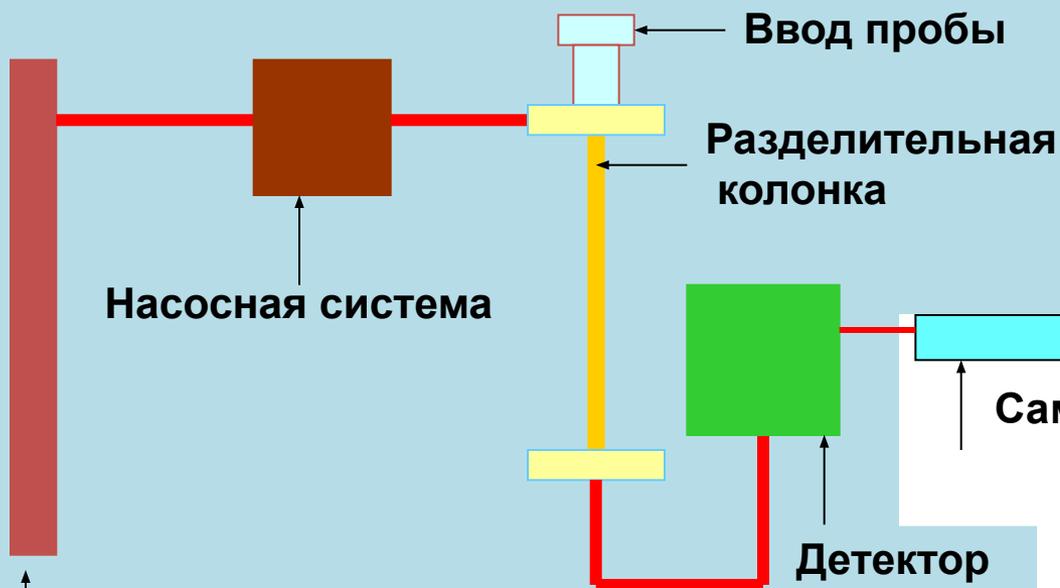
Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз, типам процессов разделения и техникам проведения

Название метода	Английская аббревиатура	Агрегатное состояние подвижной фазы	Агрегатное состояние стационарной фазы	Процесс разделения	Техника проведения разделения
Жидкость-жидкостная хроматография	LLC	жидкое	жидкое	распределение	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), TLC (ТСХ), PC (бумажн. хромат.)
Газожидкостная хроматография	GLC	газообразное	жидкое	распределение	GC (ГХ)
Жидкостная хроматография	LSC	жидкое	твердое	адсорбция	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), PC (бумажн. хромат.)
Газовая хроматография	GSC	газообразное	твердое	адсорбция	GC (ГХ)

Колоночная хроматография

стационарная фаза находится в колонке;
прием используется как в газовой, так и в жидкостной хроматографии

Принципиальная схема хроматографа для колоночной хроматографии



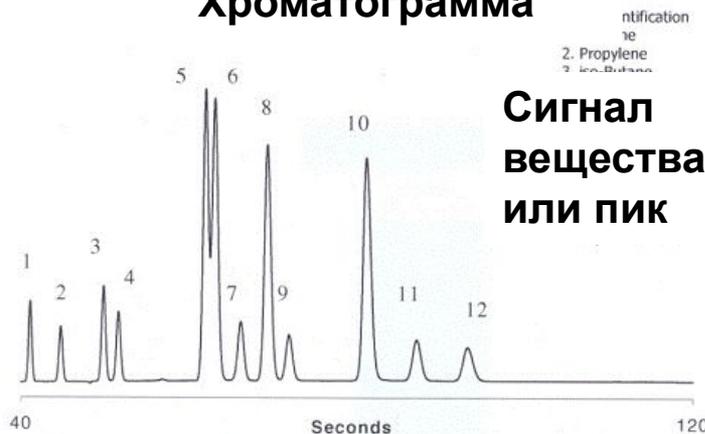
Подвижная фаза
в ГХ – газ-носитель

Подвижная фаза
в ЖХ - элюент

Самописец

Детектор

Хроматограмма



Сигнал
вещества,
или пик

Хроматограмма

Хроматографический пик – концентрация пробы в подвижной фазе на выходе из колонки как функция времени.

Пик- качественная и количественная характеристика

Качественный анализ: время удерживание одного компонента при одинаковых условиях хроматографирования – постоянная величина.

Время удерживания – время, которое проходит с момента введения пробы до регистрации самописцем максимума сигнала.

Условия хроматографии, влияющие на время удерживания:

- тип колонки;
- состав подвижной фазы;
- скорость потока подвижной фазы;
- температура

Две возможности проведения достоверного качественного анализа:

1. И пробу и стандарт хроматографируют в разных хроматографических условиях
2. Выбор соответствующих детекторов

Правильная запись данных ГЖХ

1. Номер (шифр) эксперимента или номер образца
2. Количество введенной пробы
3. Используемая колонка (неподвижная фаза и процент ее нанесения, материал носителя, длина (см))
4. Расход газа-носителя
5. Рабочая температура
6. Усиление, используемое для каждого пика
7. Скорость диаграммы

Пример:

Опыт К-9

1 мкл

10% смазки апиезон APL на хромасорбе W, 200см

N₂, 60 мл/мин

150⁰С

Все пики при 50•10²

Диаграмма 60 см/ч

Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ)

Газо-жидкостная хроматография используется для разделения «летучих» соединений, т.е. соединений с молекулярной массой до 500.

Чувствительность метода: позволяет определить до 10^{-6} г количества соединения

Неподвижной фазой является жидкость, подвижной – газ

Жидкая неподвижная фаза - высокомолекулярную нелетучую жидкость (силиконовые масла, углеводородные смазки и высокомолекулярные полиэфиры)

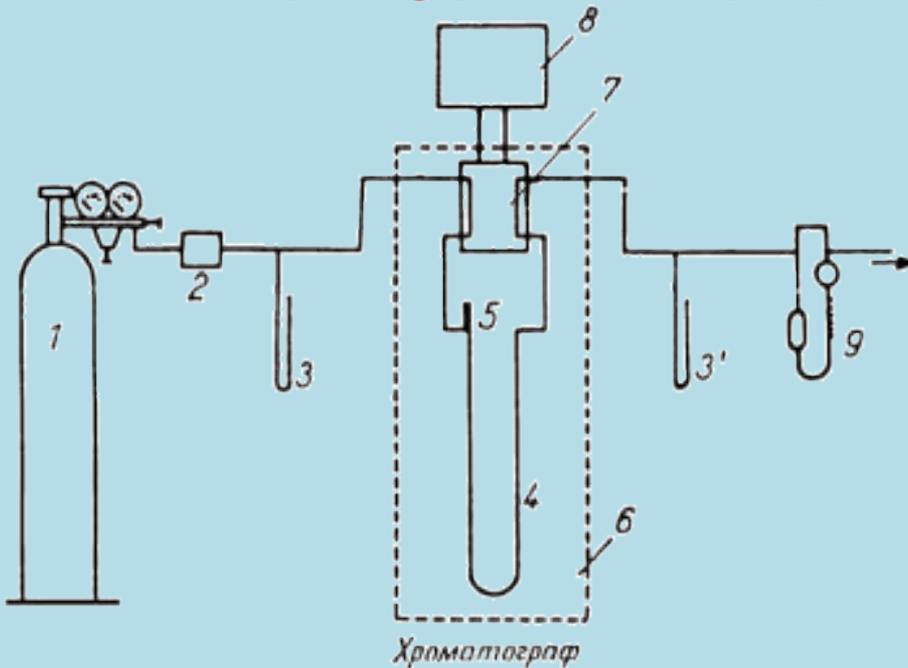
Подвижная фазой – газ (азот)

**Насадочные колонки
2 - 4 мм**

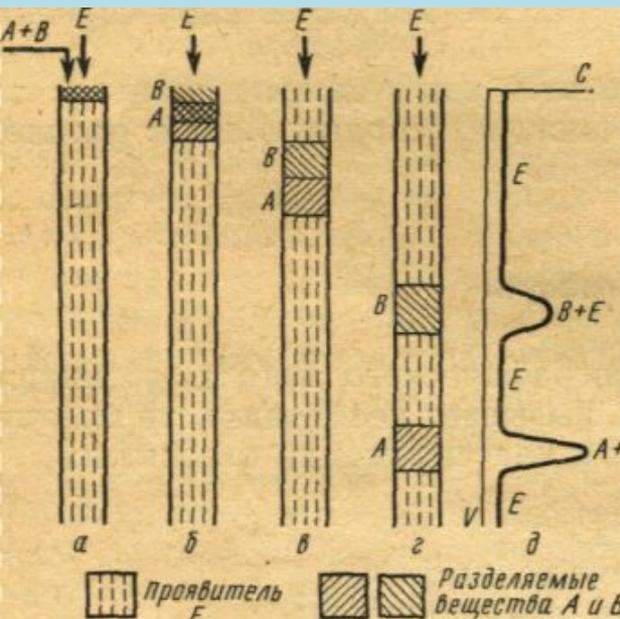
**Капиллярные колонки
0.2-0.5 мм**



Аппаратурное оформление метода ГЖХ



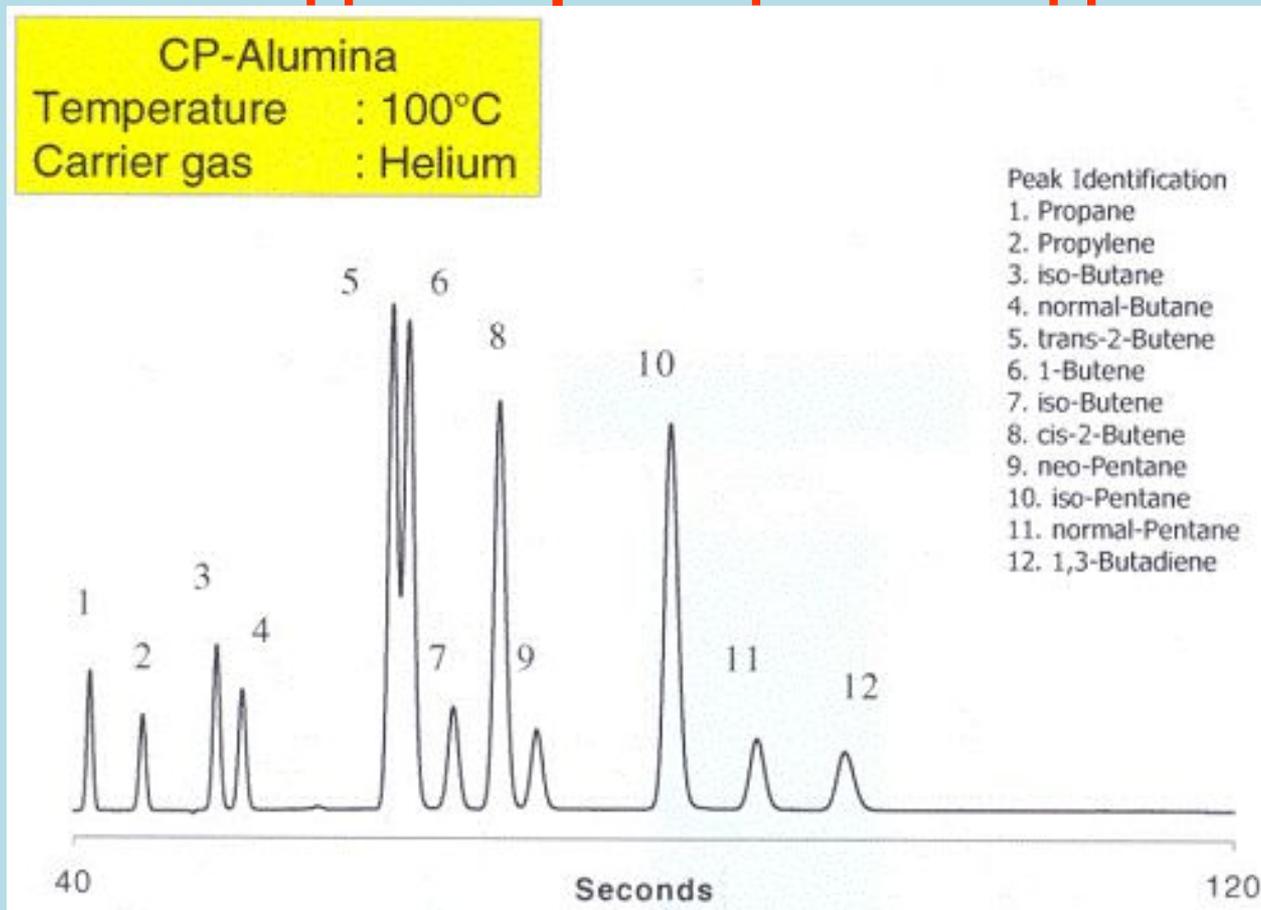
- 1 – баллон с газом-носителем;
- 2 – стабилизатор потока;
- 3 и 3' – манометры;
- 4 – хроматографическая колонка;
- 5 – устройство для ввода пробы;
- 6 – термостат;
- 7 – детектор;
- 8 – самописец;
- 9 – расходомер



Механизм распределения компонентов между носителем и неподвижной жидкой фазой основан на растворении их в жидкой фазе

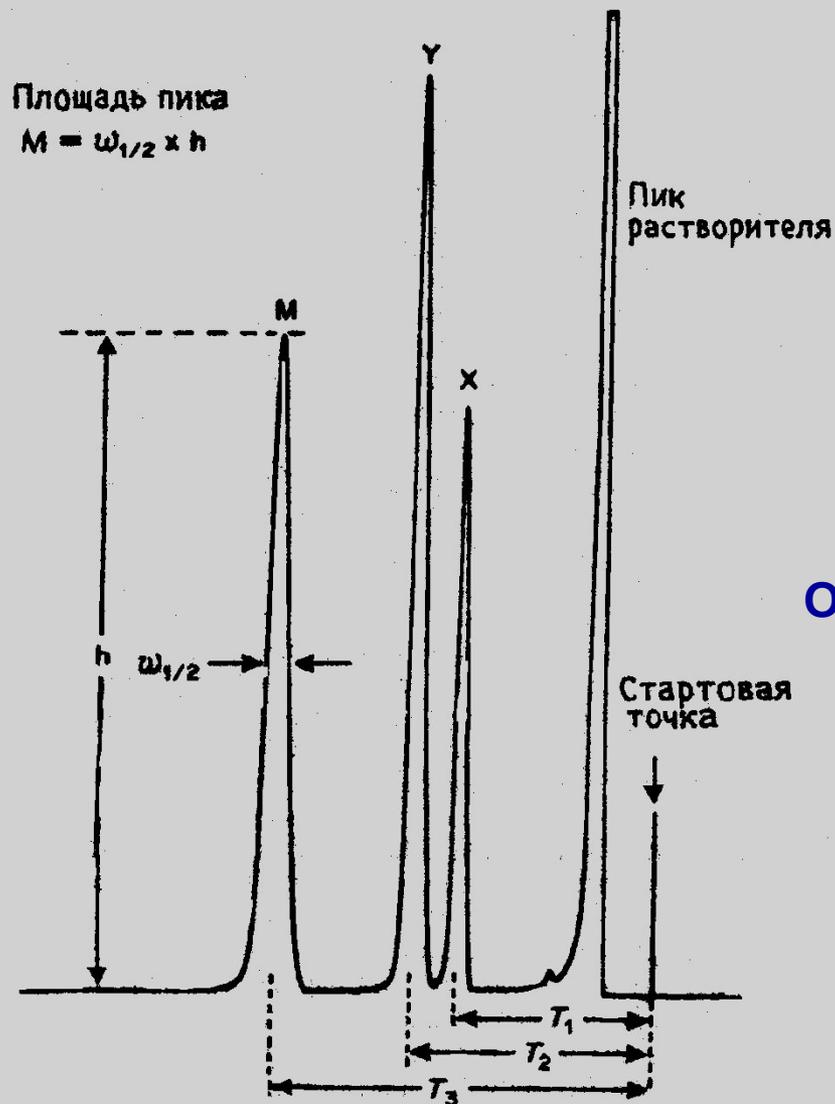
Отношение количества вещества в неподвижной фазе к количеству вещества в подвижной фазе представляет собой коэффициент распределения k'

Идентификация методом ГЖХ



Для идентификации соединения в смеси, сравнивают его время удерживания с временем удерживания «подлинного» образца

Количественный анализ с использованием метода ГЖХ



$$W_x = k_x A_x$$

W_x – масса вещества, соответствующего пику с площадью A_x ;
 k_x – константа пропорциональности, является коэффициентом отклика соединения X

Определение k_x проводят двумя методами:

- Метод внутреннего стандарта
- Метод внутренней нормализации

Отличительные особенности ГЖХ и ВЭЖХ

ГЖХ

ВЭЖХ

М.м. веществ

пробы

До 500 До нескольких десятков миллионов

Условия

разделения

Сравнительно жесткие Мягкие

Эффективность До 5000 т.т. на метр До 150000 т.т. на метр

Процент известных соединений,

который можно разделить

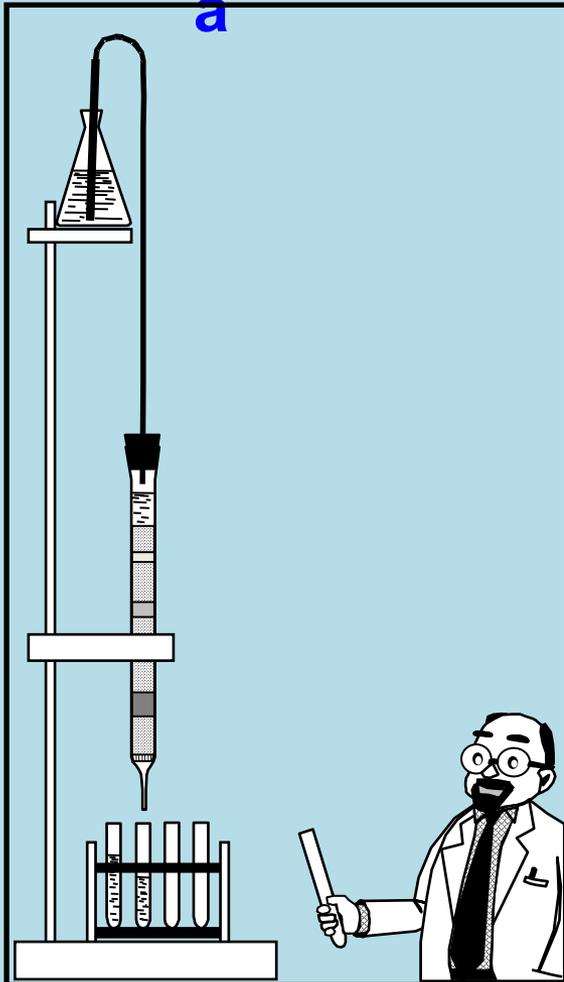
10

90

• ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

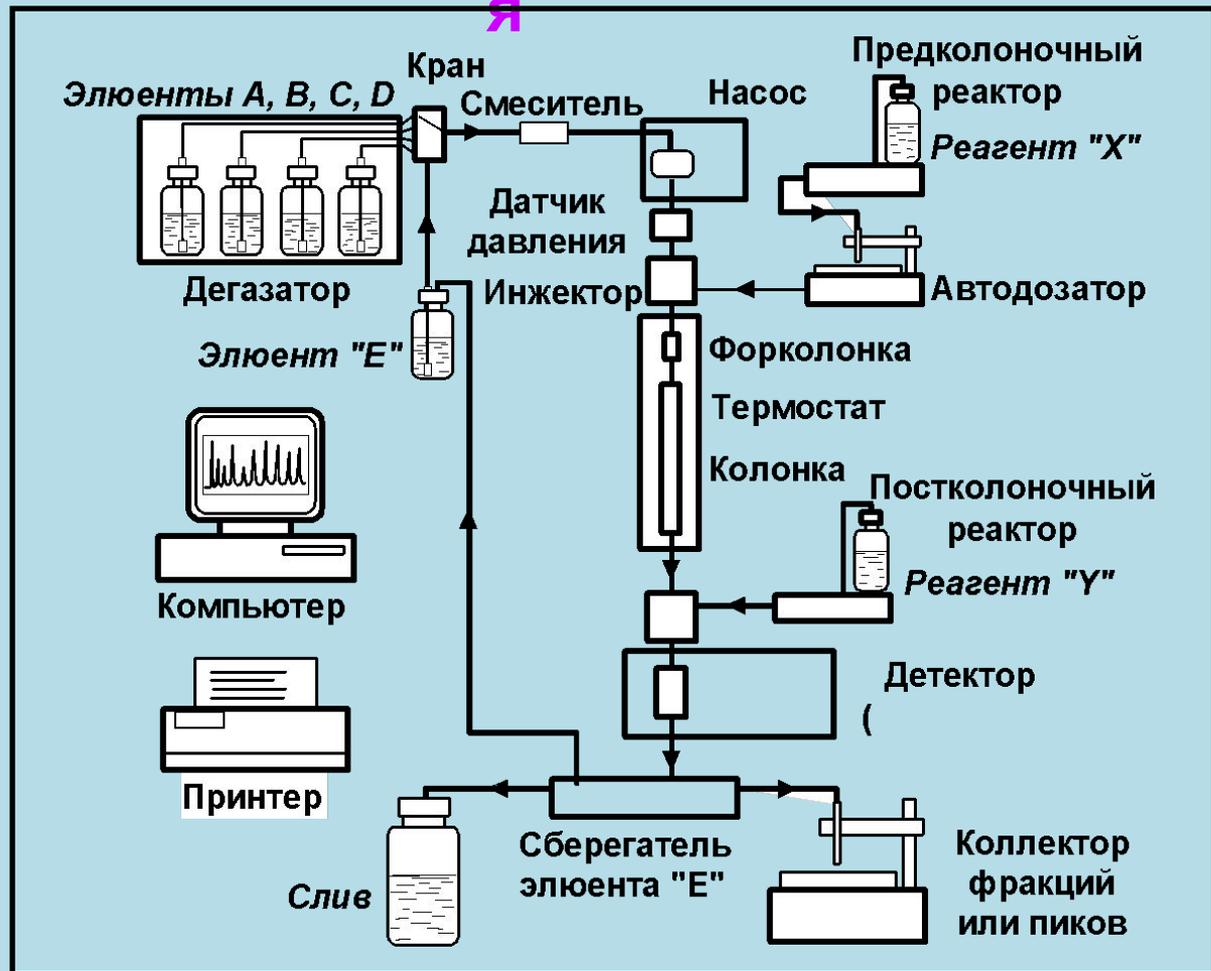
Вчер

а

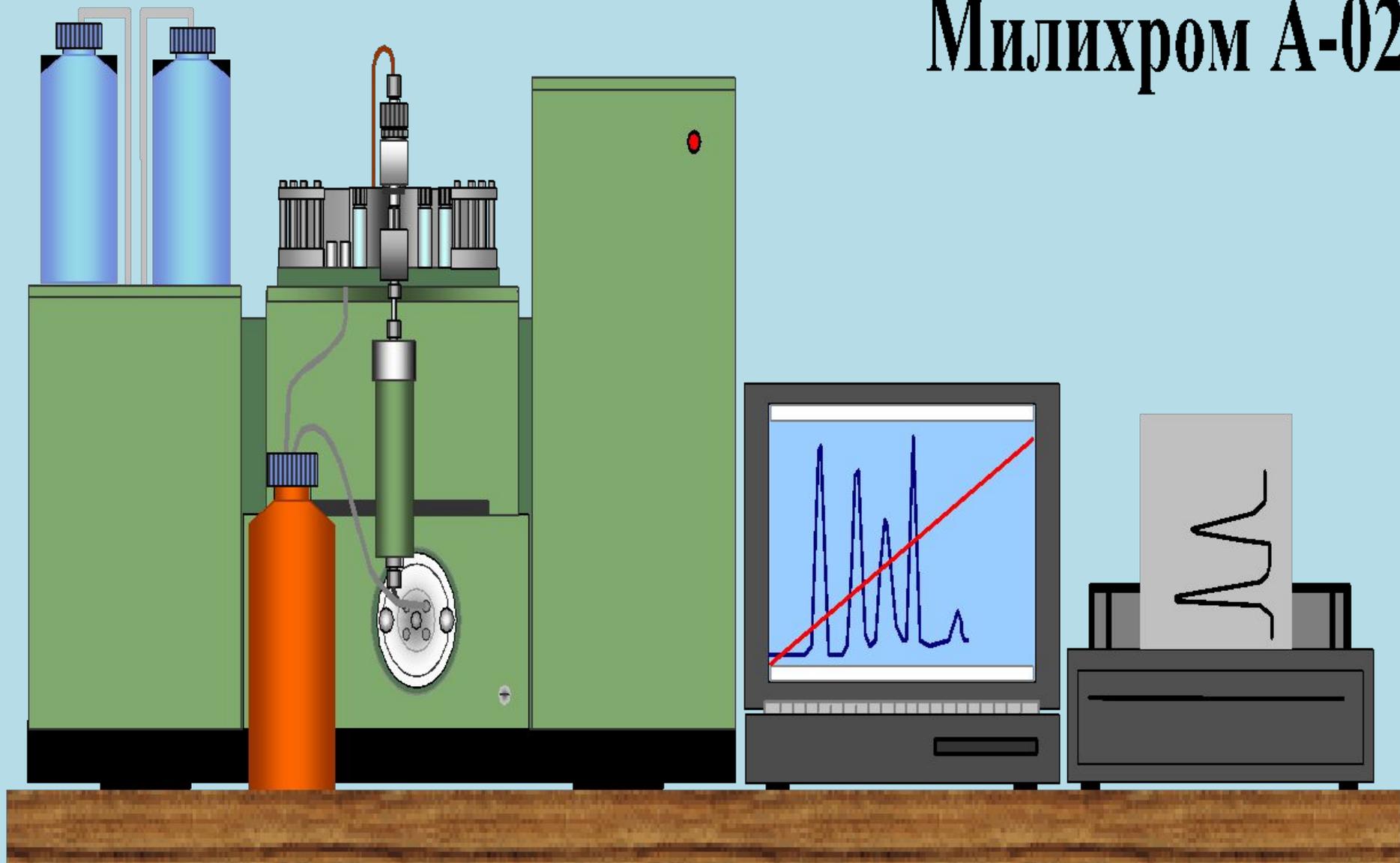


Сегодн

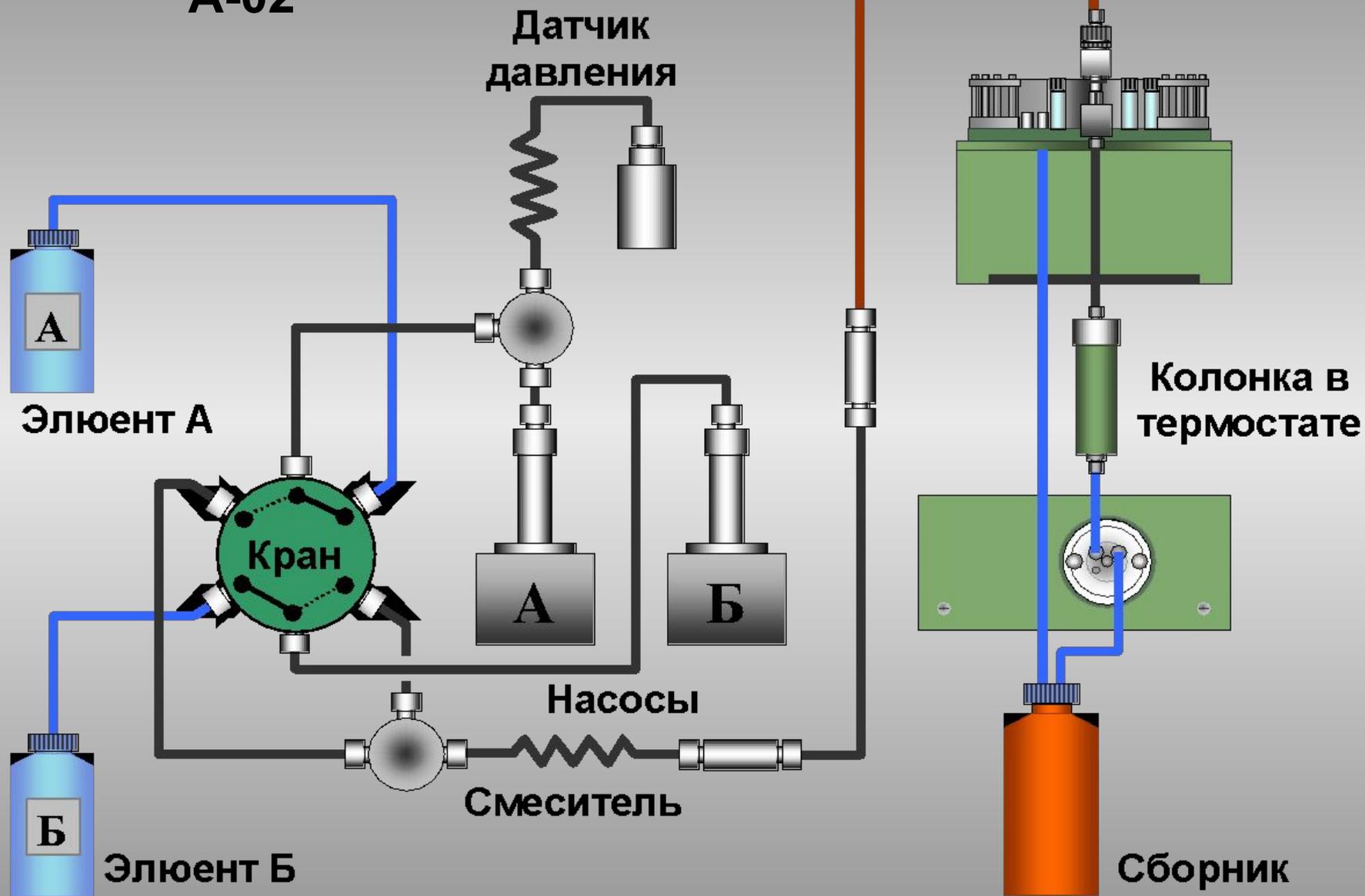
я



Милихром А-02



Милихром А-02



Основные части хроматографа для ВЭЖХ

- резервуар для жидкости;
- нагреватель;
- фильтр;
- насос высокого давления;
- манометр;
- гидродинамическое сопротивление (для сглаживания импульсов);
- автодозатор
- аналитическая колонка;
- датчик давления для контроля работы насоса (необязателен);
- система ввода проб;
- термостат колонок (может отсутствовать);
- детектор;
- сборник
- самопишущий регистратор системы обработки данных.

Заключение:

- **Хроматография** – физико-химический метод, используется для разделения веществ.
- **Современные хроматографические методы:**
 - капиллярная газовая хроматография (КГХ),
 - высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ),
 - высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ),
 - высокоэффективная ионная хроматография (ВЭИХ),
 - сверхкритическая флюидная хроматография (ВЭИХ),
 - капиллярный электрофорез (КЭ)

Пайдаланылган әдебиеттер:

- **Т.Байзолданов, Ш.Т.Байзолданова:**
“Руководство по токсикологической химии
ядовитых веществ, изолируемых методом
экстракции”;
- **Т.Байзолданов - лекция**