

Сибирский федеральный университет

кафедра водных и наземных экосистем

Физико-химические методы

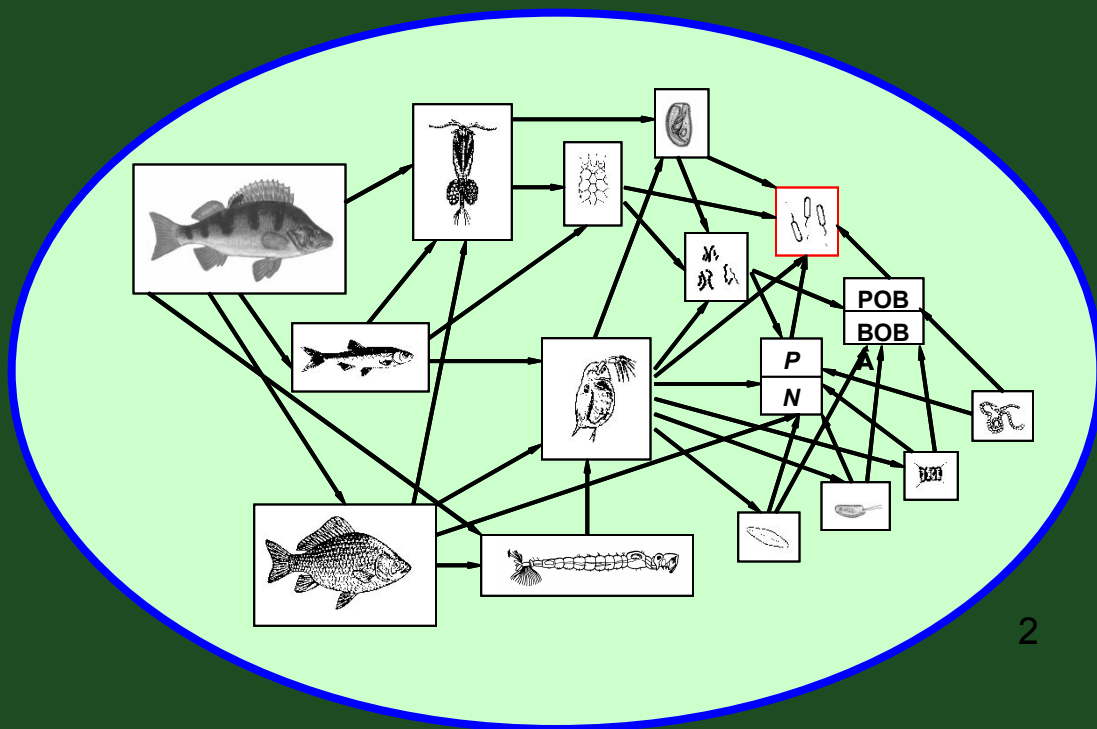
анализа

биологических систем

Исследования биологических систем:

Видовой (таксономический) состав биоты

Химический состав биоты и среды обитания
(взвешенных и растворенных веществ в воде,
донных осадках, почве, воздухе)



Цели анализа химического состава биологических систем

```
graph TD; A[Цели анализа химического состава биологических систем] --> B[Выполнение задач экологического мониторинга]; A --> C[Информация о составе биологической продукции, используемой в практических целях: питании, лечении, производстве и т.п.]; A --> D[Медико-клинические исследования тканей и жидкостей];
```

Выполнение задач экологического мониторинга

Информация о составе биологической продукции, используемой в практических целях: питании, лечении, производстве и т.п.

Медико-клинические исследования тканей и жидкостей

Анализ химического состава биоты и окружающей среды (воды, воздуха, почв) – необходимая часть экологического мониторинга:

 Элементный состав

 Ионный состав

 Состав органических веществ

Анализ химического состава биоты и окружающей среды – необходимая часть экологического мониторинга

 **Элементный состав включает:**

Стехиометрия биогенных элементов: C, N, H, O, P, S

Состав микроэлементов: Fe, Mg, Mn, Cu, B, K, Ca, Co

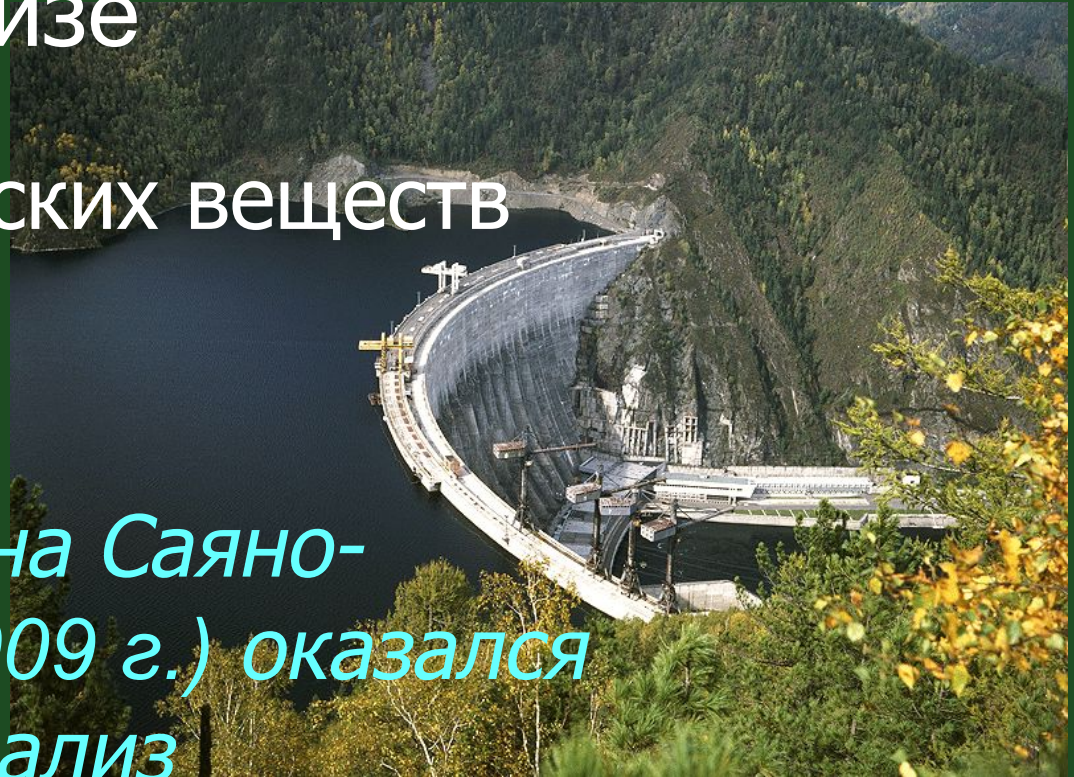
Содержание тяжелых металлов: Fe, Ni, Zn, Cr, Cu, Sn, V

Содержание радиоактивных изотопов: кобальт-60 ,
америций-241, цезий-137, иод-131, фосфор-32

Мониторинг антропогенного загрязнения окружающей среды основывается на химическом анализе

✦ Состав органических веществ

После катастрофы на Саяно-Шушенской ГЭС (2009 г.) оказался востребованным анализ нефтепродуктов (смесей углеводородов) в р.Енисей



Анализ биомассы как источника полезной для человека продукции

- ✦ Биомасса **животных** – источник белка, аминокислот, витаминов, незаменимых жирных кислот
- ✦ Биомасса **растений** – источник углеводов, аминокислот, витаминов, биополимеров
- ✦ Биомасса **микроорганизмов** – целевые продукты биотехнологических производств

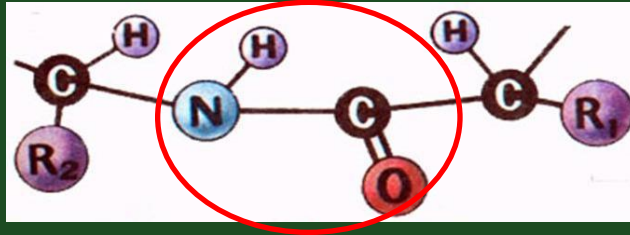
Физико-химические методы анализа биологических объектов

- ✦ Фотометрические, включая колориметрию, цветные реакции
- ✦ Флуоресцентные, включая спектральный анализ
- ✦ Электрохимические
- ✦ Спектроскопические (атомная абсорбция, эмиссия)
- ✦ Хроматография, масс-спектрометрия



Фотометрические методы, включая колориметрию и цветные реакции

Биуретовая реакция



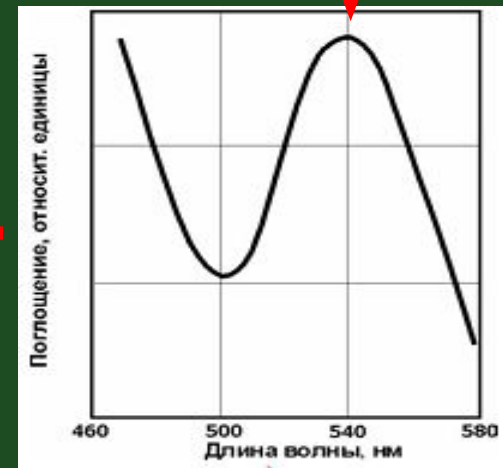
пептидная связь



сине-фиолетовое окрашивание



фотометр



спектр поглощения



Флуоресцентные методы, включая спектральный анализ

Для веществ, испускающих флуоресцентное излучение: хлорофиллы, люциферины, «зеленые флуоресцентные» белки

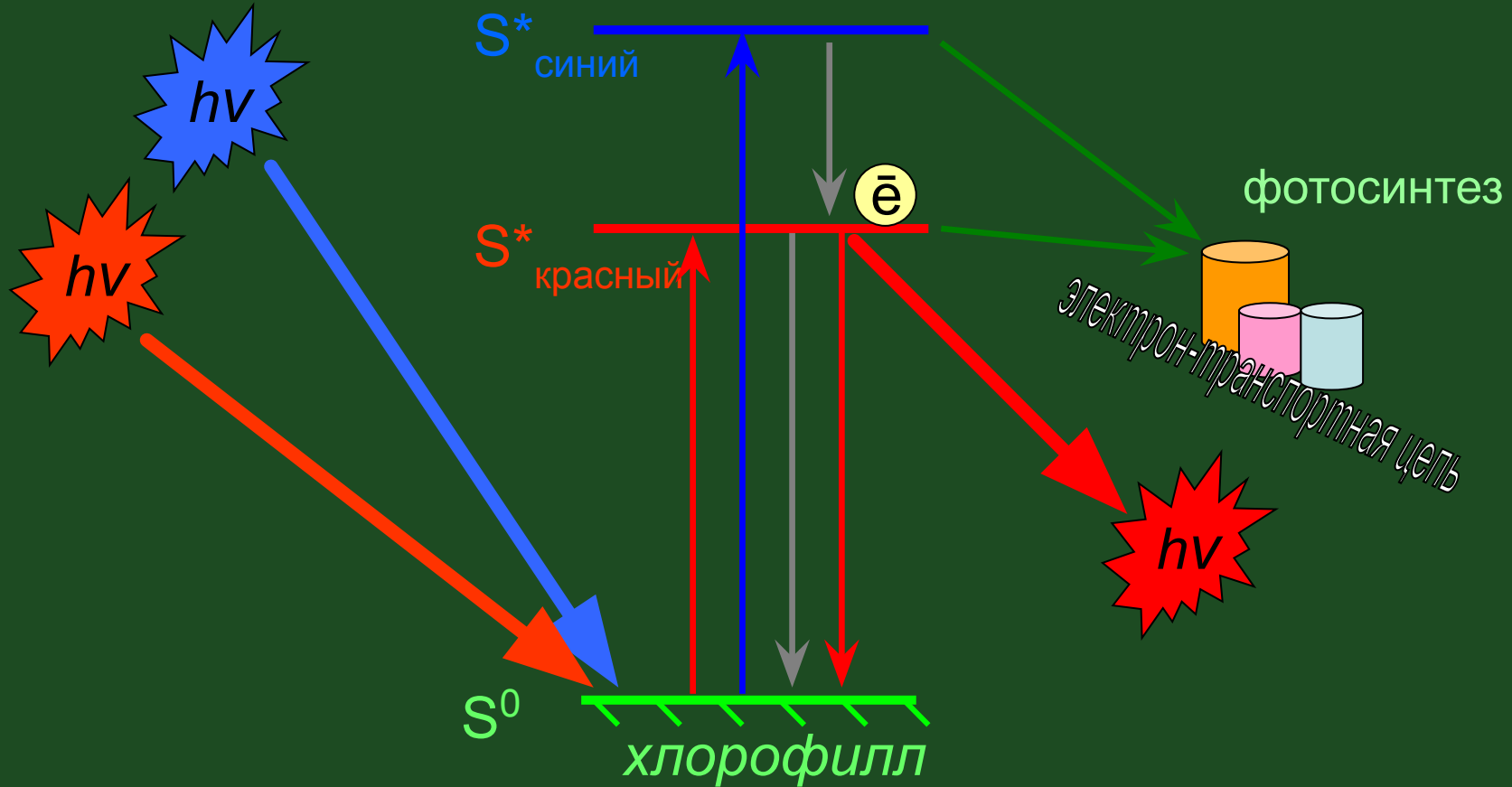
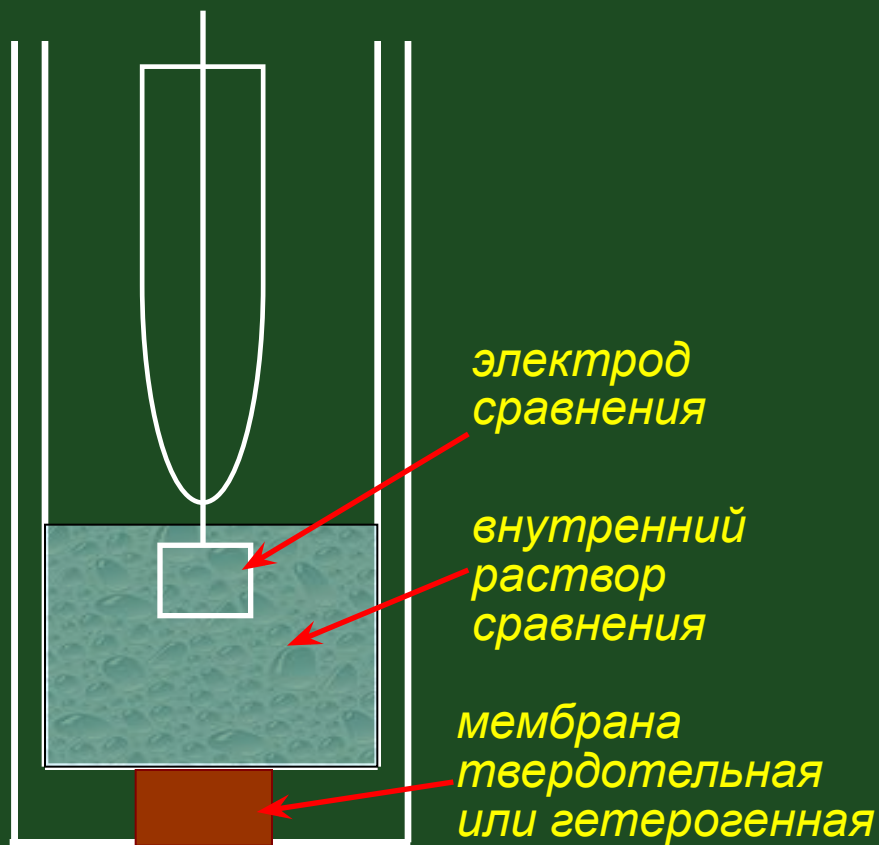


Схема фотоэнергетических процессов, происходящих в молекуле хлорофилла при поглощении света ($h\nu$).



Электрохимические методы основаны на измерении электропроводности (кондуктометрия) или потенциала электрода (потенциометрия).

Ионселективные электроды: ионный состав



Высокая точность, чувствительность, селективность, возможность определения нескольких веществ в одном растворе без предварительного разделения

Общая схема ионселективного электрода



Спектроскопические методы (атомная абсорбция, эмиссия)

Для валового содержания металлов и ряда неметаллов

озоление



проба + кислота

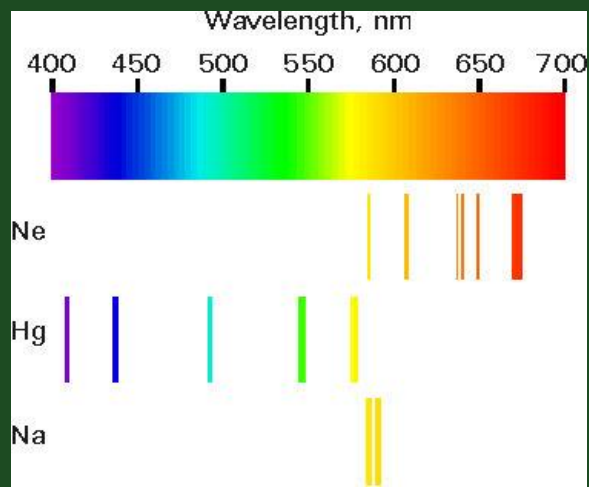


раствор ионов



T, Q, I

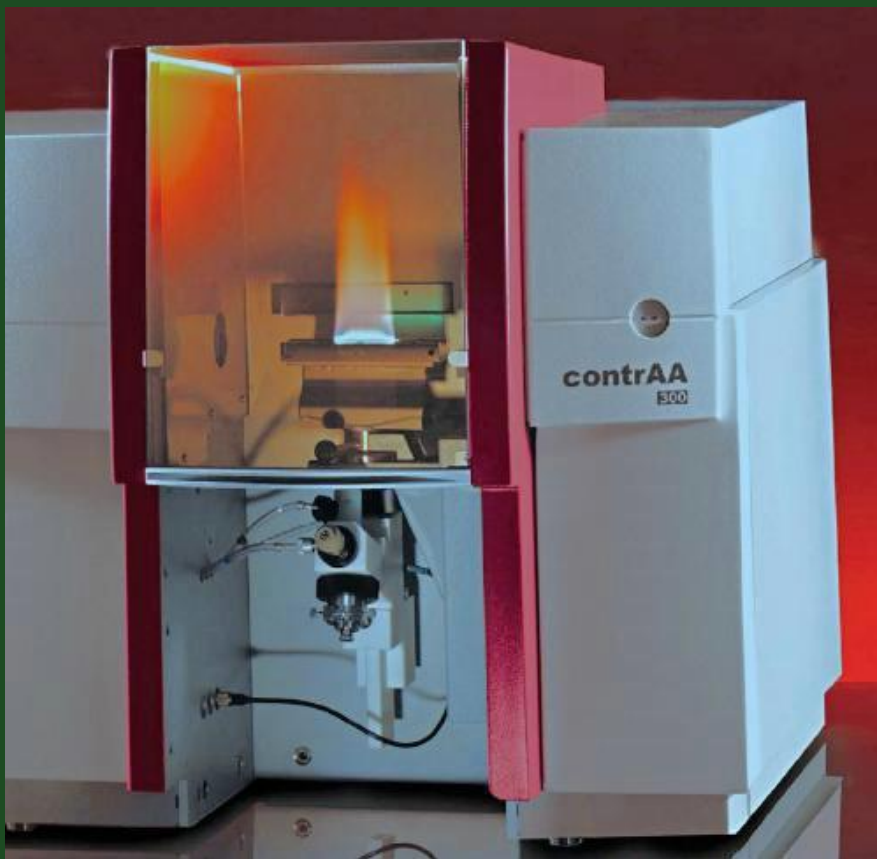
Возбуждение атомов, спектры поглощения и испускания энергии



Сплошной и линейчатые спектры для разных элементов

✦ Спектроскопические методы (атомная абсорбция, эмиссия)

Атомно-абсорбционная спектрометрия



Атомизация термически и пламенем
 $t = 3000\text{ }^{\circ}\text{C}$



газообразное атомарное состояние



линейчатые спектры поглощения



Спектроскопические методы (атомная абсорбция, эмиссия)

Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой



Электрический разряд
в магнитном поле



аргоновая плазма,
 $t = 10000\text{ }^{\circ}\text{C}$



газообразное атомарное
состояние



линейчатые спектры
излучения

Применяемые методы анализа

**Неорганические
вещества и
элементы**

~ 10 000

Спектроскопические методы
(атомная абсорбция, эмиссия)

Спектрофотометрические методы

Электрохимические методы

**Органические
вещества**

~ 30 000 000

Спектрофотометрические методы
*низкая разрешающая способность
в отношении химической структуры*

Флуоресцентные методы

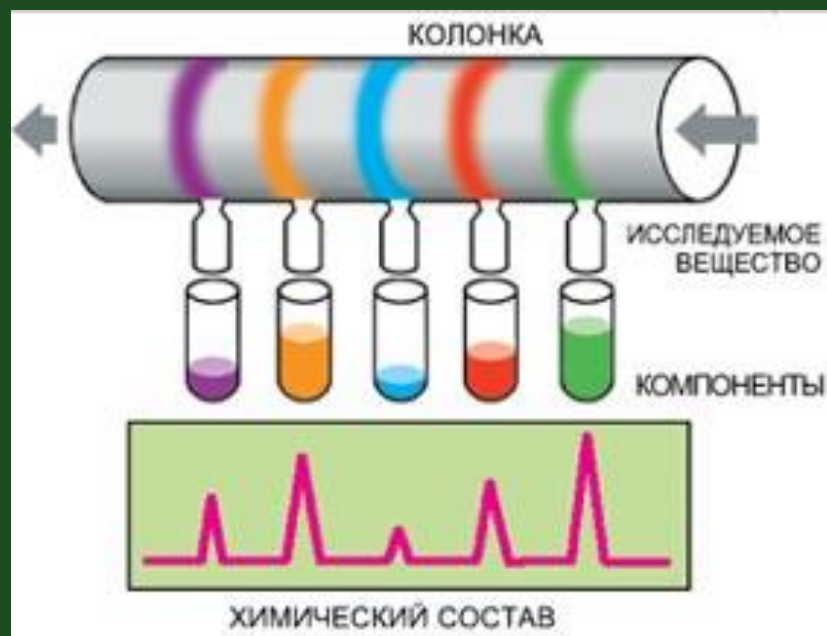
*Ограниченный круг веществ,
способных к флуоресценции*

???

✦ Хроматография, масс-спектрометрия

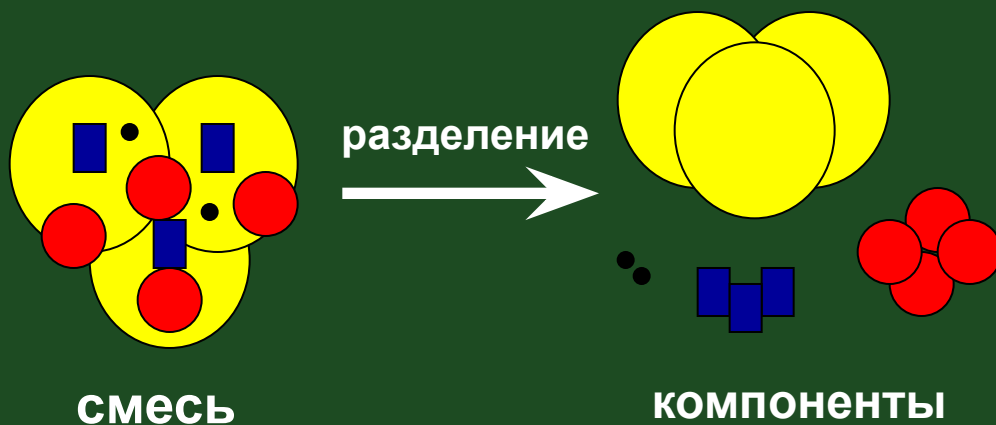
Определение и идентификация широкого круга органических веществ:

Белки, углеводы, липиды, полимеры, кофакторы, низкомолекулярные вещества, ароматические вещества, галогенсодержащие вещества, загрязнители .. и многие другие..



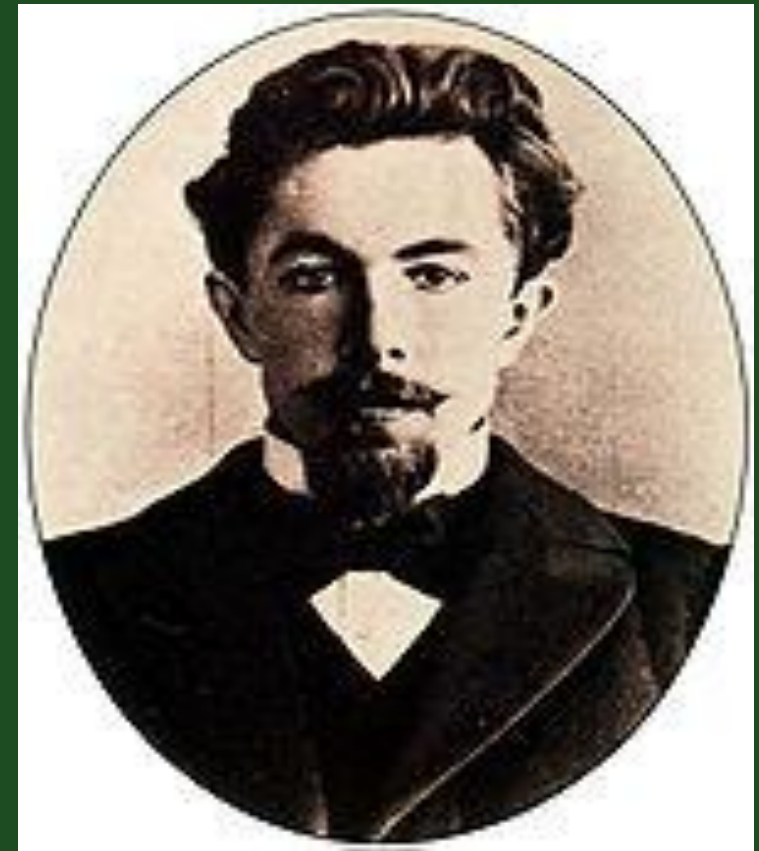
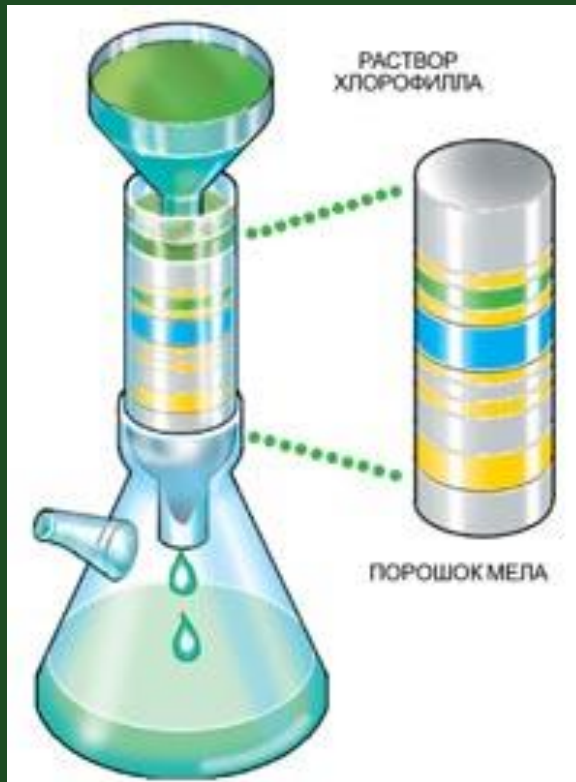
Хроматография – по гречески писать “*graphy*”
цветом “*Chroma*”

Хроматография – это метод разделения
сложных смесей на компоненты для
дальнейших идентификации, измерения
количества, выделения либо очистки.



- **Разделение**
- **Идентификация**
- **Определение количества**

Изобретение хроматографии - 1903 г.



«...различные компоненты сложного пигмента закономерно распределяются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступными качественному определению. Такой расцветенный препарат я назвал *хроматограммой*, а соответствующий метод анализа *хроматографическим методом*.»

Михаил Семенович Цвет
1872 – 1919,
Ботаник, физиолог

В 1931 г. лаборатория Р. Куна и Е.Ледерера, изучавших разновидности каротеноидов, подтвердила перспективность хроматографического метода М.С.Цвета и получила много последователей.

1941 -1951 гг. – А.Дж. Мартин, Р. Синг, основываясь на распределительном механизме, создают бумажную и газо-жидкостную хроматографию, вводят понятие теоретической тарелки.

1938 г. – изобретение тонкослойной хроматографии, Н.А. Измайлов, М.С. Шрайбер, Харьковский университет.

1960 гг. - инструментальное развитие высокоэффективной жидкостной хроматографии, Ц. Хорват, Йельский университет.

Все виды хроматографии имеют две фазы

- 1. стационарная (адсорбент) фаза
Материал, на котором происходит разделение
- 2. подвижная (или мобильная) фаза
Растворитель, транспортирующий пробу

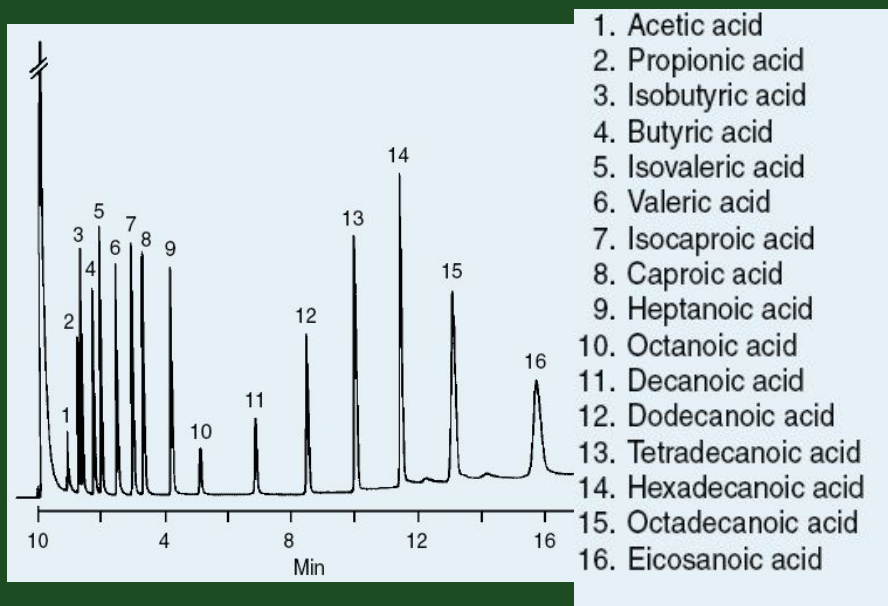
Цели анализа

Недеструктивные
методы, очищение
продукта

Хроматография

аналитическая

препаративная



Виды фаз, технические решения



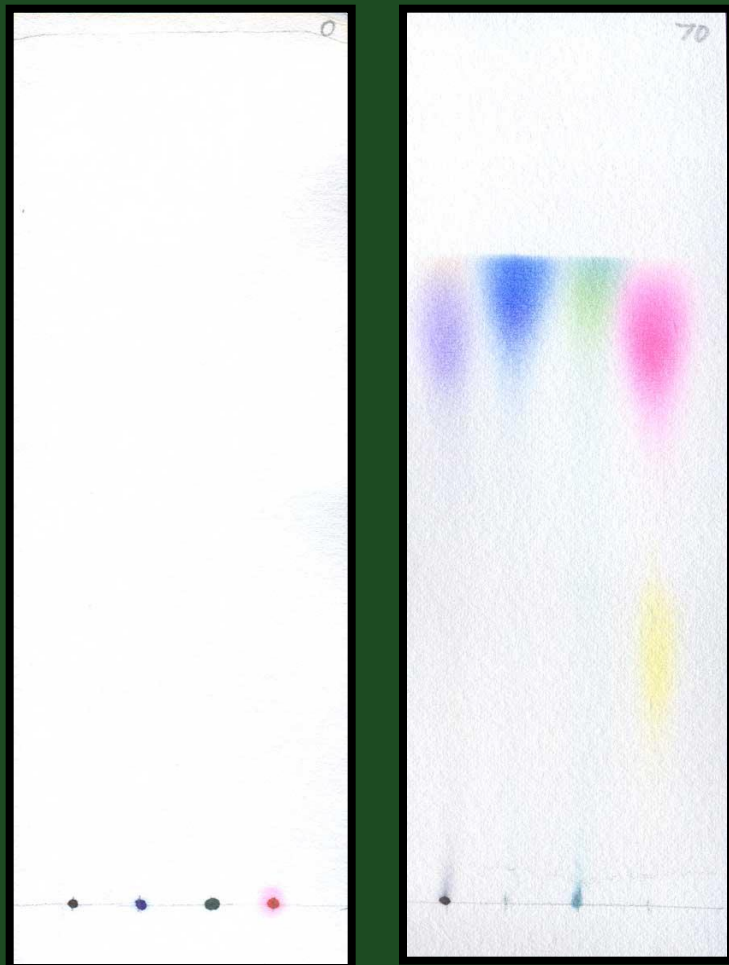
Жидкостная хроматография – разделяет жидкие пробы с помощью жидкой подвижной фазы и колонки, заполненной твердыми частицами

Газовая хроматография – разделяет пробы в парообразном состоянии с помощью несущего газа (подвижная фаза) и колонки, заполненной жидкостью и(или) твердыми частицами

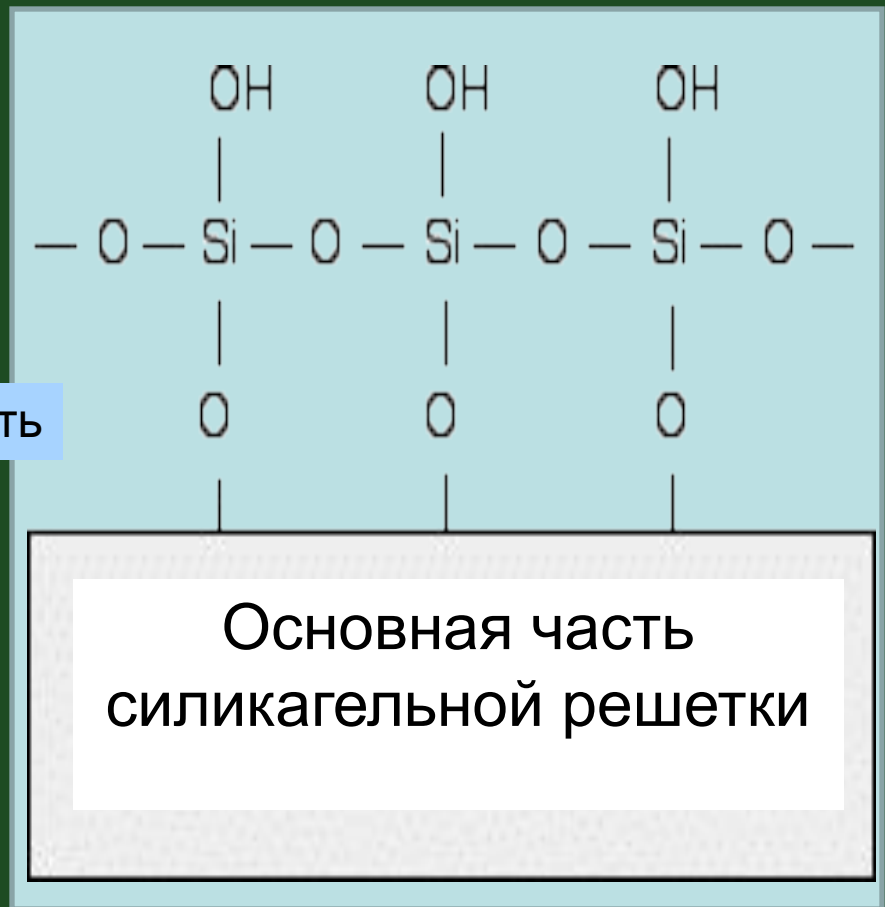
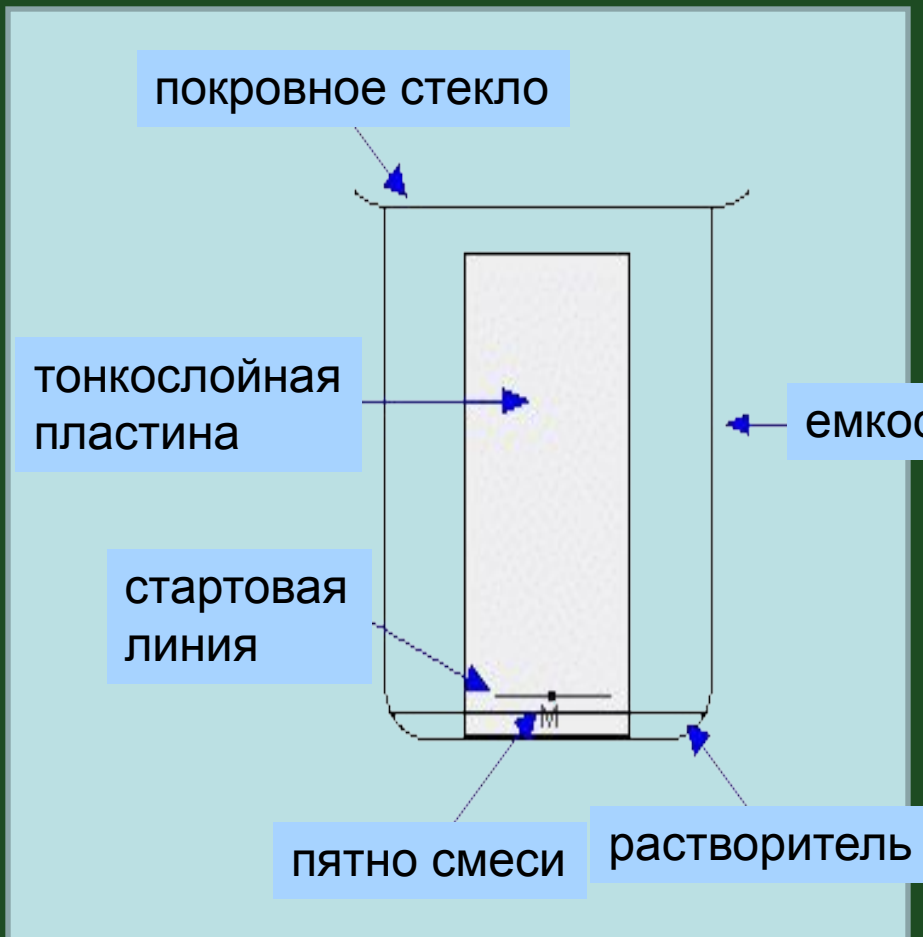
Бумажная хроматография – разделяет сухие пробы с помощью жидкого растворителя на полосе бумаги (стационарная фаза)

Тонкослойная хроматография – разделяет сухие пробы с помощью жидкого растворителя в тонком слое силикагеля, закрепленном на пластине (стационарная фаза)

Разделение в плоскости: Бумажная и тонкослойная хроматография

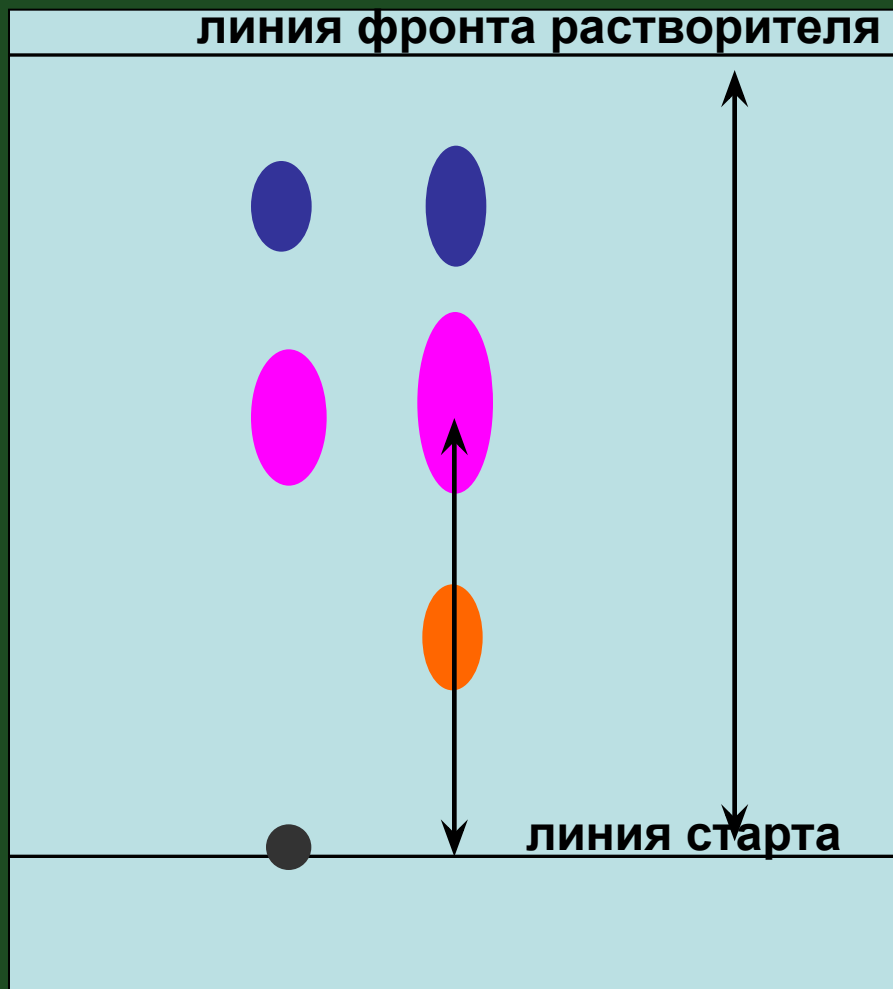


Разделение в плоскости: Бумажная и тонкослойная хроматография



Тонкий слой (0.05-0.5 мм)
силикагеля – полярная
стационарная фаза

Подсчет результатов на пластине ТСХ

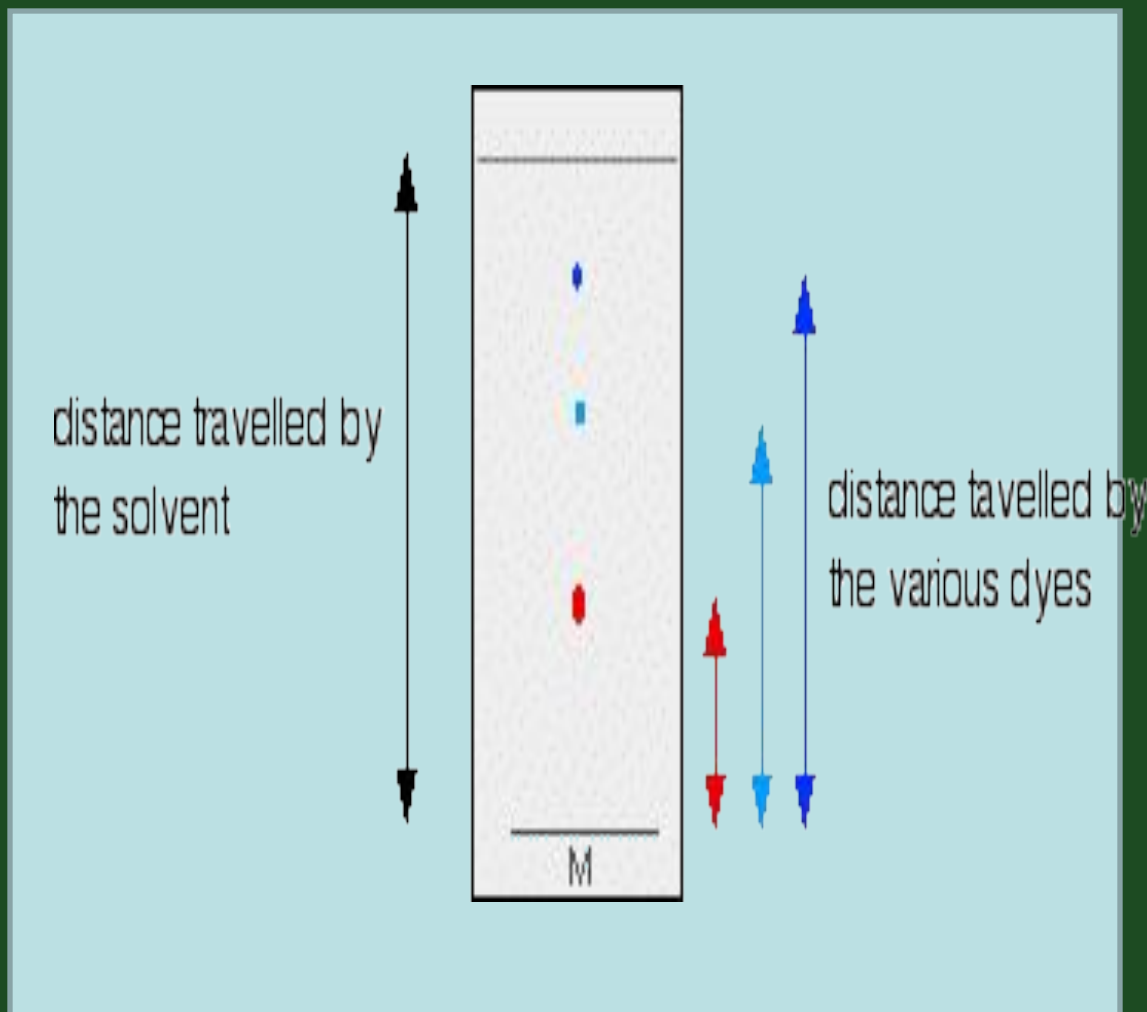


Измерение расстояния от линии старта до линии фронта растворителя

Измерение расстояния от центра пятна до линии старта

$R_f = \frac{\text{Соотношение расстояний, пройденных веществом и растворителем}}{\text{}}$

Подсчет результатов на пластине ТСХ

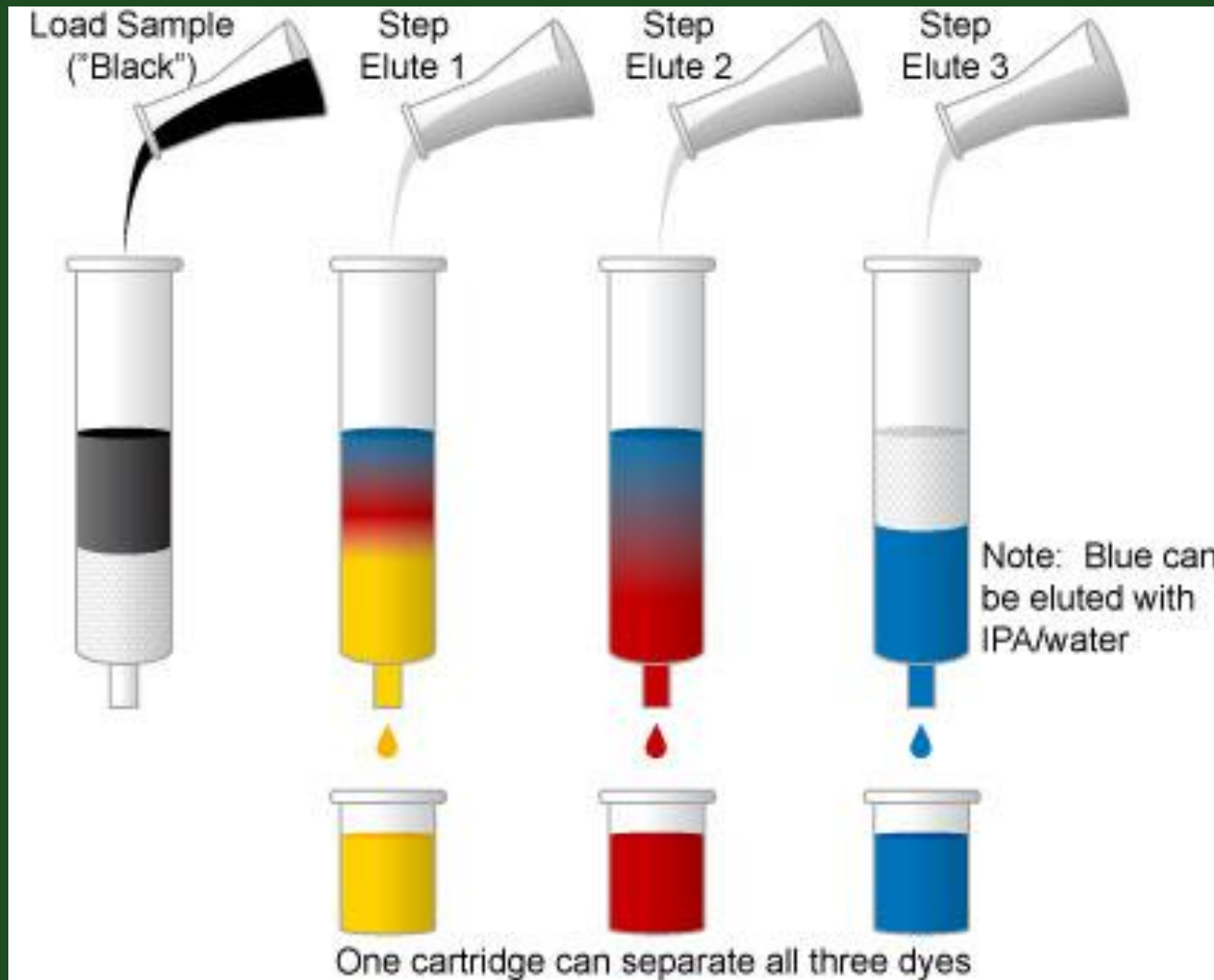


$$\text{Spot 1: } R_f = \frac{1.4 \text{ cm}}{7.7 \text{ cm}} = 0.18$$

$$\text{Spot 2: } R_f = \frac{6.0 \text{ cm}}{7.7 \text{ cm}} = 0.78$$

$$\text{Spot 3: } R_f = \frac{4.1 \text{ cm}}{7.7 \text{ cm}} = 0.53$$

Разделение в объеме: Колоночная жидкостная хроматография

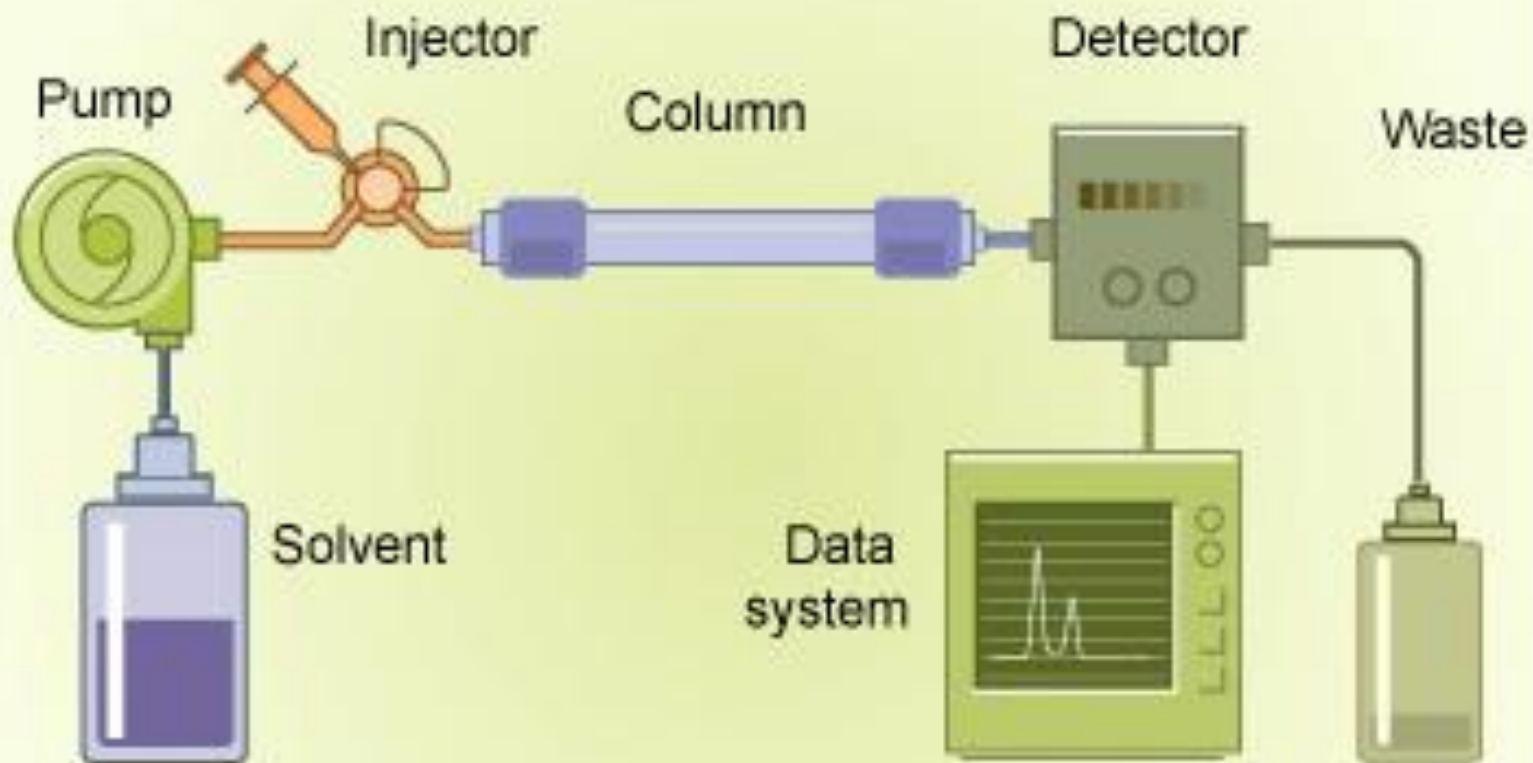


Разделение в объеме: приборная колоночная хроматография

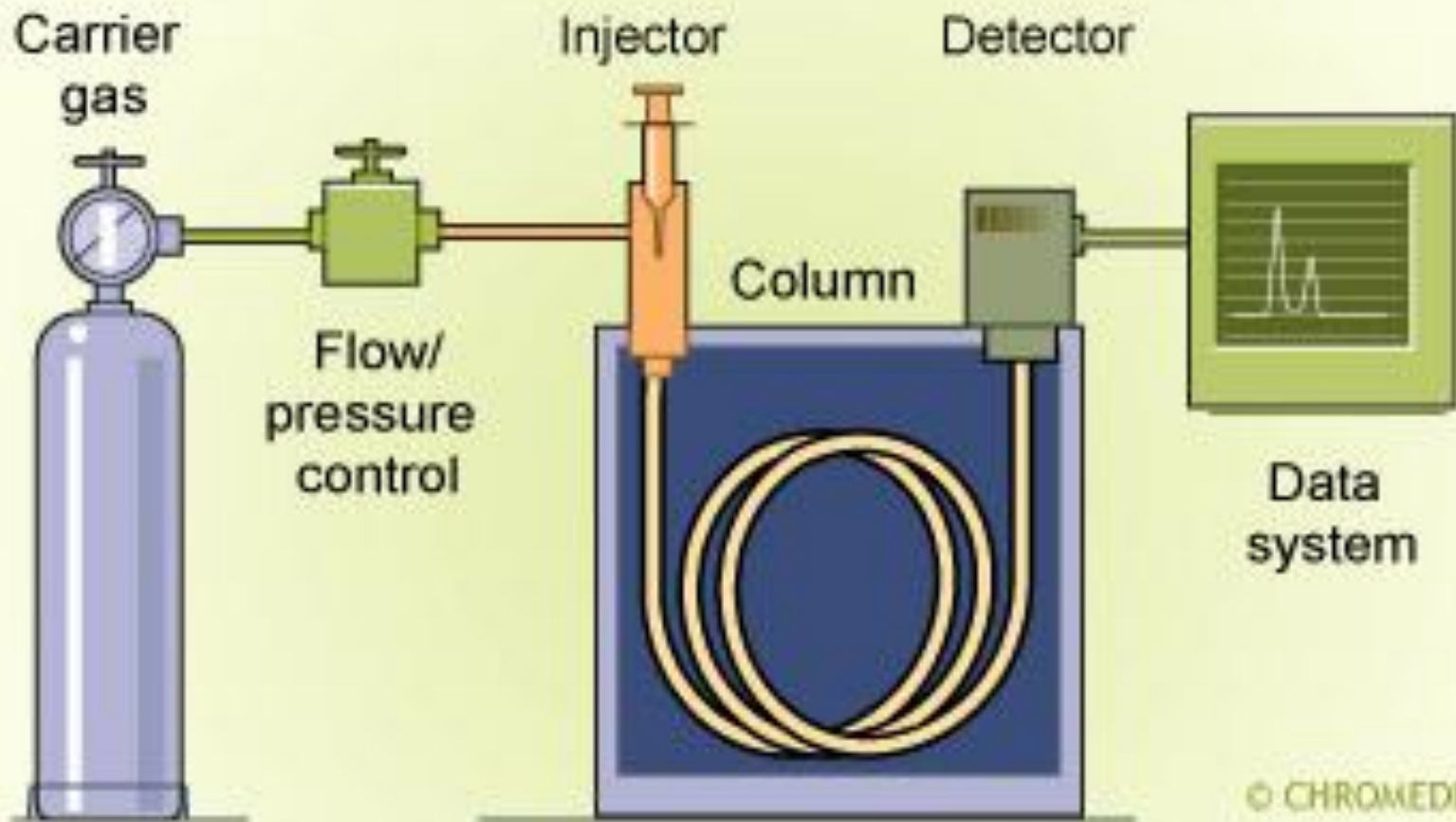
Высокоэффективная жидкостная хроматография и газовая хроматография - современные приборные варианты колоночной хроматографии.

Например в ВЭЖХ, вместо гравиметрического прохождения растворителя через колонку, последний идет под высоким давлением – до 400 атмосфер, создаваемым насосом. Это в разы увеличивает скорость анализа, позволяет наполнять колонки мелкодисперсным сорбентом.

Разделение в объеме: Принцип работы ВЭЖХ хроматографа

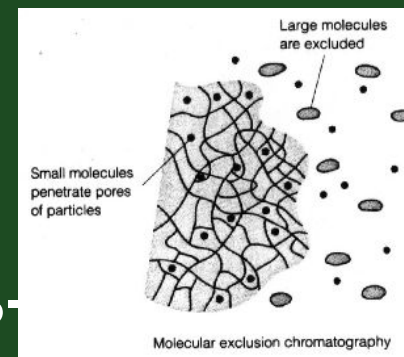
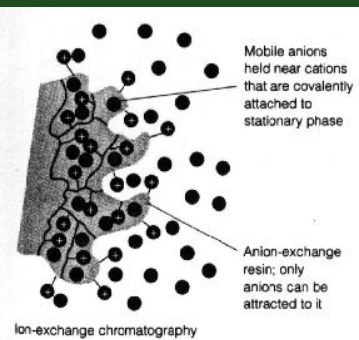


Разделение в объеме: Газо-жидкостная хроматография



Тип взаимодействия аналитов и фазы

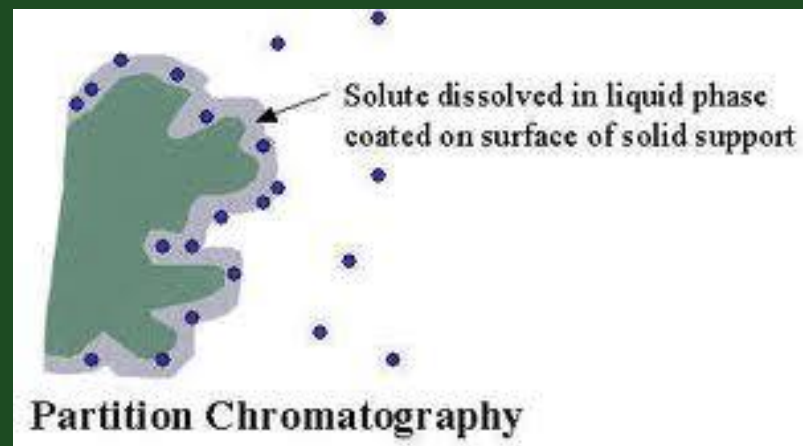
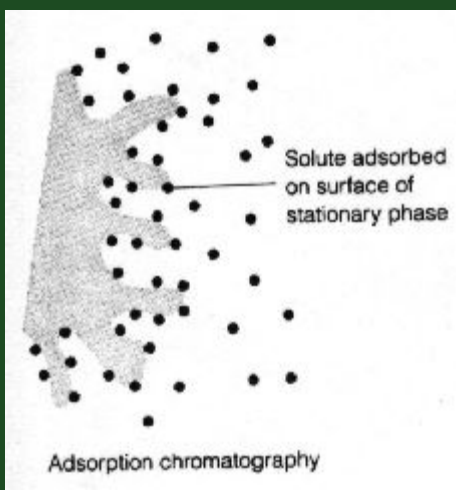
ионная ← Хроматография



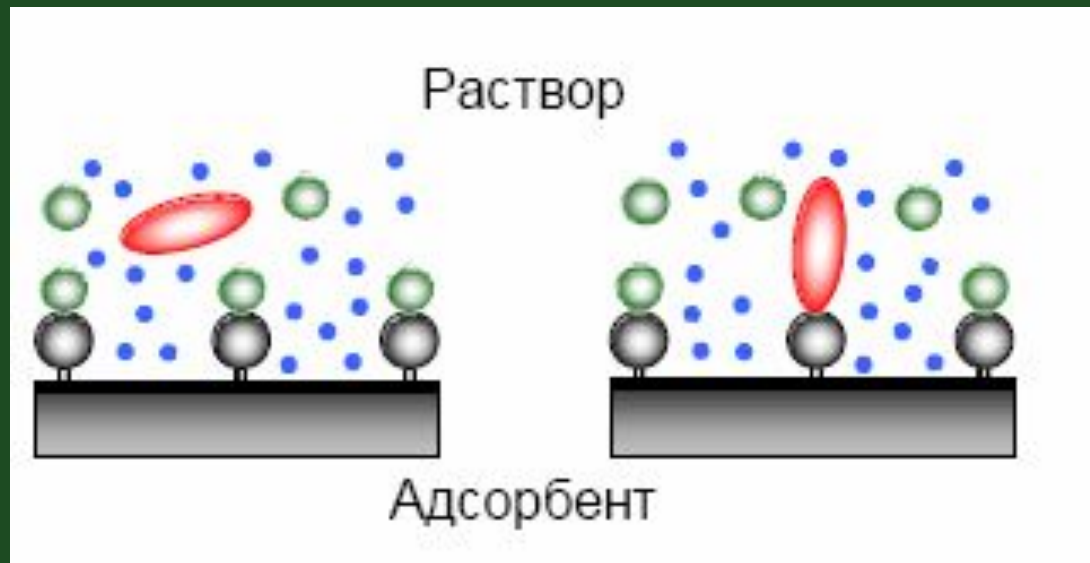
гель-
проникающая

адсорбционная

распределительная



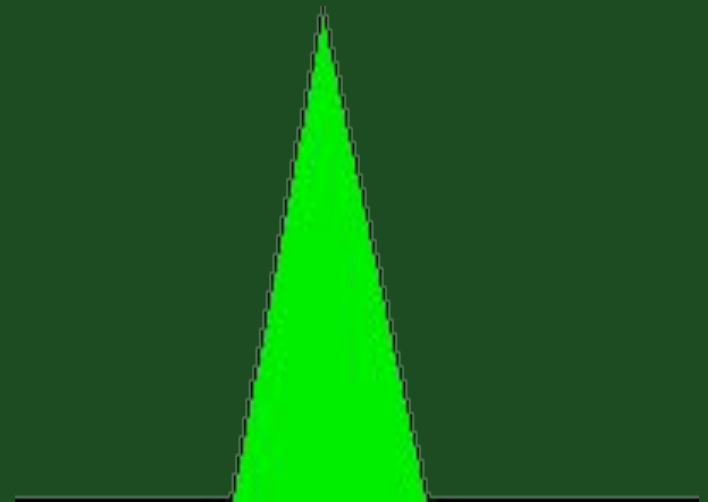
Адсорбционное разделение – Колоночная жидко-твердофазная хроматография



- - функциональная группа адсорбента
- - молекула адсорбата-аналита (А)
- - молекула адсорбата-конкурента-вытеснителя
- - молекула растворителя-разбавителя (Р)

Формирование хроматографического пика

- На выходе (детекторе) записывается серия пиков.
- Каждый пик представляет собой одно вещество из смеси.
- Площадь пика пропорциональна количеству вещества, прошедшему через детектор.



Формирование хроматограммы – серии пиков



Рис. 1. Хроматограмма смеси двух веществ

t_R - время от момента ввода пробы до момента регистрации максимума хроматографического пика, **время удерживания**

Время удерживания складывается из двух составляющих – времени пребывания веществ в подвижной фазе (t_m) и времени пребывания в неподвижной фазе (t_s)

Хроматографические параметры

t_m – мертвое время колонки

исправленное время удерживания $t' = t_R - t_m$

коэффициент селективности (α),

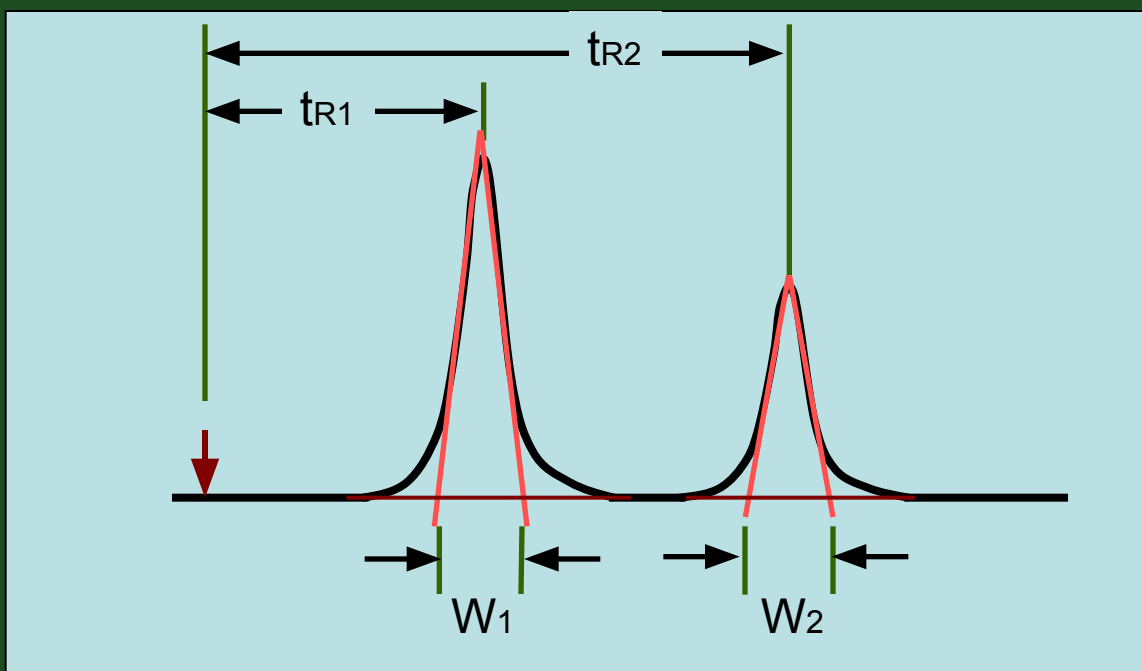
разрешение (R)

эффективность хроматографической колонки – число теоретических тарелок

Хроматографические параметры

коэффициент селективности (α) при разделении двух или более веществ - соотношение исправленных времен удерживания

$$\alpha = t'_2 / t'_1$$

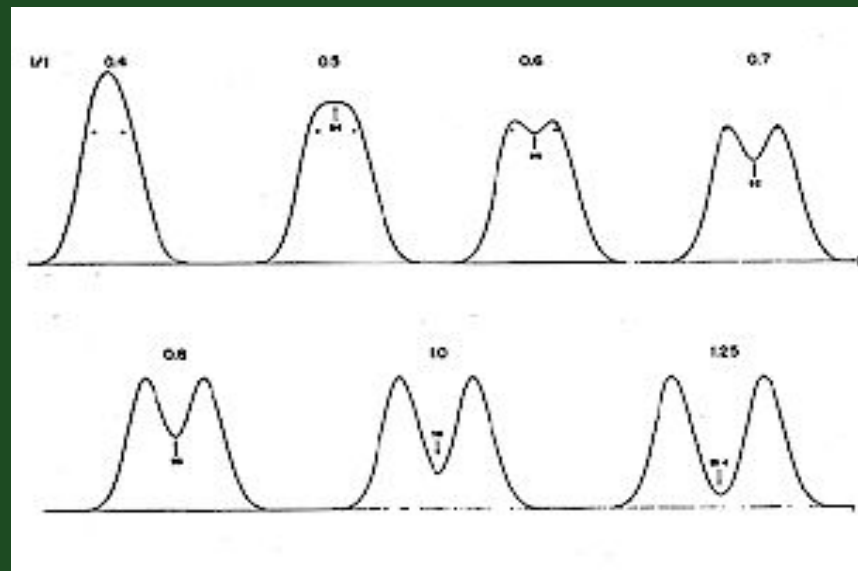
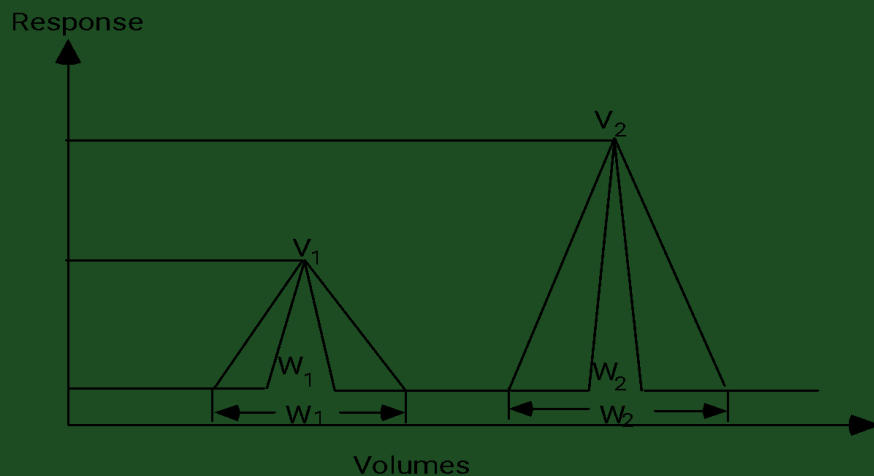


Для разделения двух веществ необходимо подобрать условия разделения так, чтобы $t'_2 \neq t'_1$ и $\alpha > 1,0$.

Хроматографические параметры

Разрешение (R)

$$R = \frac{V_2 - V_1}{1/2(W_1 + W_2)}$$



Хроматографические параметры

Чем эффективнее колонка, тем уже пик, тем большее число компонентов можно разделить за более короткое время. Количественно эффективность колонки выражают числом **теоретических тарелок N** .

Согласно концепции теоретических тарелок хроматографическую колонку представляют как **ряд дискретных, соприкасающихся горизонтальных слоев**, на которых мгновенно устанавливается равновесие между неподвижной и подвижной фазами, и акт сорбции-десорбции вещества повторяется многократно на каждом слое.

H - высота слоя, эквивалентная теоретической тарелке:

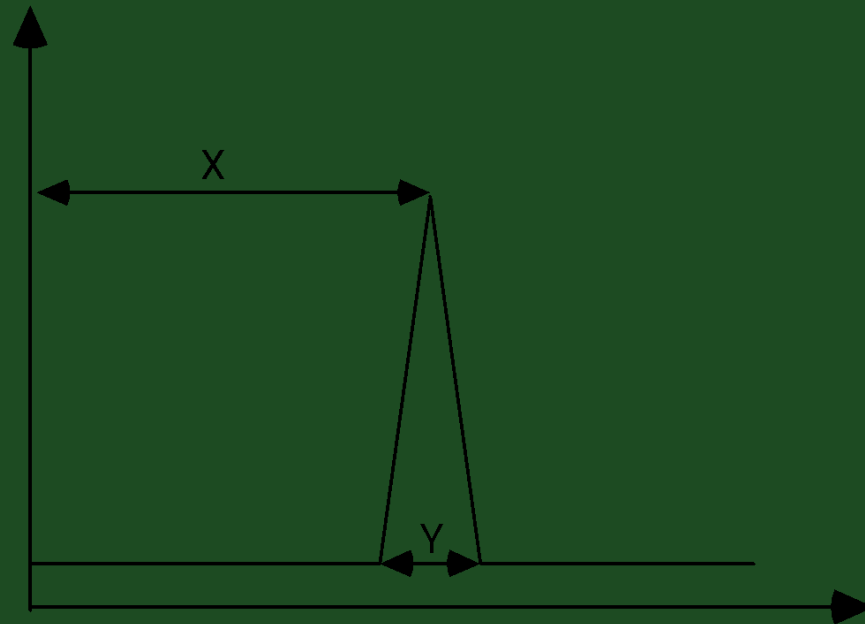
$$H = L/N,$$

где L - длина колонки.



Хроматографические параметры

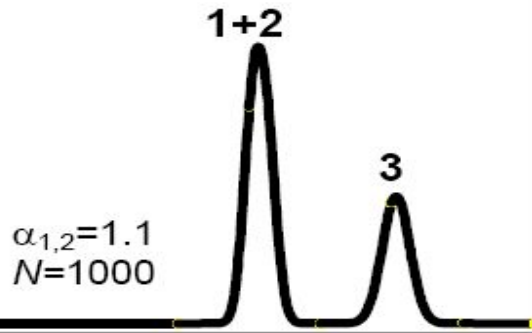
$$\text{Theoretical plates (N)} = 16 \left(\frac{X}{Y} \right)^2$$



Эффективность и селективность

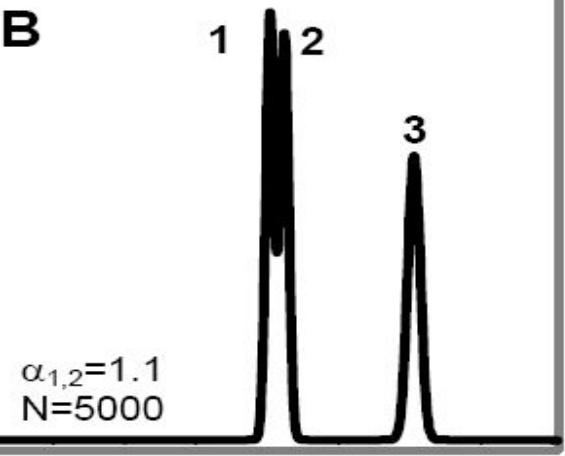
Низкая эффективность
Низкая селективность

A



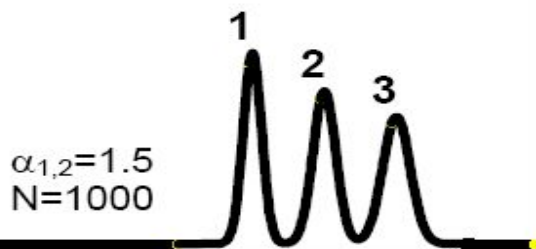
Высокая эффективность
Низкая селективность

B



Низкая эффективность
Высокая селективность

C



Высокая эффективность
Высокая селективность

D

