

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Кафедра математики и естественнонаучных дисциплин

ОДОБРЕНО
Учебно-методическим советом
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России

Протокол № 1/2022
«25» января 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института медицинского
образования
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России
Е.В. Пармон
«25» января 2022 г.

Н.В. Михайлова, Р.А. Губаева

ПЛАНАРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
В БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

учебно-методическое пособие для обучающихся
по дисциплине «Инструментальные методы анализа
в биохимических исследованиях»
по направлению подготовки 06.04.01 Биология (уровень магистратуры)
профиль «Клеточная и молекулярная биология»

УДК – 543.544:57

ББК – 24.47:28

Михайлова Н.В., Губаева Р.А. Планарная хроматография в биохимических исследованиях: учебно-методическое пособие / Н.В. Михайлова, Р.А. Губаева – СПб.: Издательство ... 2022. – 22 с.: ил.

Авторы:

Михайлова Н.В. – заведующий кафедрой математики и естественнонаучных дисциплин ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, к.х.н., доцент;

Губаева Р.А. – доцент кафедры математики и естественнонаучных дисциплин ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, к.фарм.н.

Рецензент:

Васильев А.В. – директор института химической переработки биомассы дерева и техносферной безопасности ФГБОУ ВО «СпбГЛТУ им. С.М. Кирова», д.х.н., профессор

В учебно-методическом пособии «Планарная хроматография в биохимических исследованиях» кратко изложены теоретические и практические основы планарной хроматографии (бумажная и тонкослойная хроматография).

Данное пособие направлено на развитие навыков проведения экспериментальных исследований биологических объектов и обработки полученных данных у обучающихся по направлению подготовки 06.04.01 Биология (уровень магистратуры) при изучении дисциплины Инструментальные методы анализа в биохимических исследованиях.

Обсуждено на заседании кафедры математики и естественнонаучных дисциплин
Института медицинского образования
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Основные понятия бумажной и тонкослойной хроматографии.....	7
1.1. Неподвижные фазы, применяемые в тонкослойной хроматографии	8
1.2. Подвижные фазы, применяемые в тонкослойной хроматографии	10
1.3. Основные параметры разделения в планарной хроматографии	10
1.4. Детектирование соединений на хроматограммах	12
1.5. Техника проведения анализа методом планарной хроматографии	14
1.6. Применение планарной хроматографии в качественном анализе	14
1.7. Применение тонкослойной хроматографии в количественном анализе	14
Глава 2. Лабораторная работа. Разделение и идентификация аминокислот методами бумажной и тонкослойной хроматографии ...	17
2.1. Реагенты и аппаратура.....	17
2.2. Техника выполнения эксперимента методом БХ	17
2.3. Техника выполнения эксперимента методом ТСХ	18
Контрольные вопросы для самостоятельной работы обучающихся ...	20
Библиографический список	21
Приложение. Форма отчета	22

ВВЕДЕНИЕ

Хроматография как эффективный метод анализа и исследования веществ и их смесей родилась в начале XX века. Создателем метода является русский ученый М.С. Цвет. В 1903 году М.С. Цвет впервые опубликовал результаты своих исследований, и он же назвал этот метод хроматографией. Слово «хроматография» произведено от греческих слов: *chromatos* – цвет, и *grapho* – пишу, описываю. В настоящее время хроматография сформировалась в самостоятельную научную дисциплину изучающую распределение химических соединений в системе двух контактирующих несмешивающихся фаз, из которых одна подвижная и перемещается относительно другой неподвижной. Хроматография является наиболее широко используемым аналитическим методом. Ни один аналитический метод не может конкурировать с хроматографией по универсальности применения и эффективности разделения сложных многокомпонентных смесей. В данном учебно-методическом пособии рассматривается бумажная и тонкослойная хроматография, как разновидности планарной хроматографии.

Продолжительность изучения раздела «Бумажная и тонкослойная хроматография» – 16 часов

Из них:

Лекции – 2 часов

Лабораторное занятие – 4 часа

Самостоятельная работа – 10 часов

Цель изучения раздела:

- изучить теоретические основы планарной хроматографии;
- сформировать навыки выполнения химического анализа методами бумажной и планарной хроматографии;
- сформировать навыки обработки и представления экспериментальных данных, полученных в ходе выполнения разделения и идентификации аминокислот методами бумажной и тонкослойной хроматографии.

Актуальность блока: данный блок вносит вклад в формирование следующих компетенций:
УК-6, ОПК-8, ПК-2.

Конкретные задачи

Название компетенции	Обучающийся должен знать	Обучающийся должен уметь	Обучающийся должен владеть
УК-6. Способен определять и реализовывать приоритеты собственной деятельности и способы ее совершенствования на основе самооценки	- основы планарной хроматографии	- формулировать задачу, делать выводы (обобщения) на основании полученных результатов исследования методом планарной хроматографии	навыками обработки и представления полученных результатов научного исследования
ОПК-8. Способен использовать современную исследовательскую аппаратуру и вычислительную технику для решения инновационных задач в профессиональной деятельности	- основы аппаратного оформления планарной хроматографии	- интерпретировать выбор условий проведения хроматографического анализа для решения конкретных задач	- навыками использования аппаратного оформления для решения конкретных задач
ПК-2. Способен планировать работу и выбирать адекватные методы решения научно-исследовательских задач в выбранной области биологии	- классификацию хроматографических методов анализа	- осуществить выбор метода хроматографического анализа	- навыками интерпретации результатов анализа

Место проведения занятий: учебные лаборатории.

Межпредметные и внутрипредметные связи: для изучения данного блока необходимы знания, умения и навыки, приобретённые в процессе изучения дисциплин химия, физика, математика:

- 06.03.01 Биология (уровень бакалавриата);
- 19.03.01 Биотехнология (уровень бакалавриата).

Основная литература:

- Теория и практика лабораторных биохимических исследований/Любимова Н.В., Бабкина И.В., Тимофеев Ю.С. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970447215.html>
- Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие/Кишкун А.А. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970448304.html>
- Правила чтения биохимического анализа: Руководство для врача/И.М. Рослый, М.Г. Водолажская. — 3-е изд., испр.и доп. — М.: ООО

- «Медицинское информационное агентство», 2020. — Режим доступа:
<https://www.medlib.ru/library/library/books/37313>
4. Общая химия с элементами биоорганической химии: учебник/О.В. Нестерова, И.Н. Аверцева, Д.А. Доброхотов, А.А. Прокопов, В.Ю. Решетняк, под ред. В.А. Попкова. - Москва: Лаборатория знаний, 2020.
 - Текст: электронный//URL:
<https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785001018681.html>
 5. Общая и неорганическая химия: учебник/Бабков А.В., Барабанова Т.И., Попков В.А. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. - Текст: электронный//URL:
<https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970453919.html>

Дополнительная литература:

1. Общая химия: учебник/А.В. Жолнин; под ред. В.А. Попкова, А.В. Жолнина. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - Текст: электронный//URL:
<https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970429563.html>
2. Общая, неорганическая и органическая химия/Бабков А.В., Попков В.А. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - Текст: электронный//URL:
<https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970429785.html>
3. Основы химии/Егоров А.С., Попков В.А., Иванченко Н.М. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - Текст: электронный//URL:
<https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970429747.html>
4. Сборник тестов по токсикологической химии: учебное пособие/под ред. Г.В. Раменской - Москва: Лаборатория знаний, 2019. - Текст: электронный//URL:
<https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785001016175.html>

Глава 1. Основные понятия бумажной и тонкослойной хроматографии

Бумажная (БХ) хроматография по механизму разделения относится к распределительной хроматографии, по технике выполнения – к плоскостной. В методе БХ инертным носителем является специальная хроматографическая бумага с определенными заданными свойствами. Неподвижной фазой служит вода, адсорбированная на поверхности бумаги, подвижной – органический растворитель, смешивающийся или несмешивающийся с водой, вода или растворы электролитов. Механизм хроматографического разделения на бумаге довольно сложен. В стационарной фазе вещество может удерживаться не только вследствие растворения в адсорбированной бумагой воде, но и адсорбироваться бумагой. Нанесенные на бумагу разделяемые компоненты переходят в подвижную фазу и по капиллярам бумаги перемещаются с различными скоростями в соответствии с коэффициентом распределения каждого из них. В начальный момент хроматографирования некоторая часть вещества из бумаги переходит в подвижную фазу. Когда органический растворитель достигает участка бумаги, несодержащего растворенное вещество, снова происходит перераспределение: из органической фазы вещество переходит в водную, фиксированную на бумаге. В результате каждый компонент концентрируется на определенном участке бумажного листа – образуются соответствующие зоны отдельных компонентов на хроматограмме.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) является разновидностью жидкостной хроматографии, в которой разделение веществ происходит на открытом слое сорбента. Она относится к плоскостной (планарной) хроматографии и по механизму разделения является адсорбционной хроматографией. Среди многих хроматографических методов тонкослойная хроматография, предложенная в 1938 году советскими учеными Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбером, занимает важное место благодаря своей скорости, воспроизводимости, простоте и низкой стоимости анализа. В 50-х годах благодаря работам Э. Шталя этот метод занял одно из ведущих мест в качественном и полуколичественном анализе сложных смесей, таких как природные соединения, фармацевтические препараты, продукты химического и микробиологического синтеза и многие другие объекты. В методе ТСХ разделение обеспечивается движением подвижной фазы через нанесённый на подложку тонкий слой сорбента. В качестве сорбентов чаще всего применяют диоксид кремния – силикагель SiO_2 и оксид алюминия – Al_2O_3 , а также другие материалы (активированный уголь, сахарозу, карбонат кальция, тальк и др.). Важнейшей характеристикой сорбента является его активность, т.е. способность сорбировать (удерживать) компоненты разделяемой смеси. Выбор растворителя (подвижной фазы) определяется природой сорбента и свойствами разделяемых веществ.

Хроматографический процесс в тонком слое сорбента обеспечивается передвижением подвижной фазы (элюента) посредством капиллярных сил. При этом, поступающий элюент сначала заполняет более узкие поры, а более крупные поры, находящиеся на пути его движения, остаются на какое-то время пустыми, однако и они также заполняются элюентом, вытекающим из более мелких пор. Скорость движения компонентов разделяемой смеси определяется соотношением времен движения (в токе элюента) и удерживания поверхностью за счет сорбции. При этом молекулы каждого из компонентов участвуют в многочисленных актах сорбции и десорбции. В конце процесса элюирования каждый из разделяемых компонентов смеси проходит соответствующее расстояние, определяемое положением центра хроматографической зоны, которая размывается за счет флуктуаций средней скорости индивидуальных молекул в процессе движения по слою. При определении состава пробы методом тонкослойной хроматографии в первую очередь необходимо правильно подобрать состав подвижной и неподвижной фаз, который позволит наиболее эффективно разделить исследуемую пробу на компоненты. При анализе известных соединений, например, фармацевтических препаратов, условия хроматографирования прописаны в соответствующей нормативной документации и химик-аналитик должен строго их придерживаться. При анализе проб неизвестного, но предполагаемого состава, например, при разработке методов анализа новых лекарственных средств, обычно руководствуются литературными данными, посвященными хроматографическому разделению веществ подобной химической структуры. Изменяя состав и соотношение компонентов подвижной и неподвижной фазы, экспериментально добиваются наиболее эффективного разделения.

Достоинствами планарной хроматографии являются: а) низкая стоимость оборудования и единичного рутинного анализа; б) возможность одновременного разделения нескольких образцов; в) легкая и быстрая смена элюента, широкий выбор растворителей; г) разнообразие неподвижных фаз; д) возможность сохранения хроматограммы с разделенными образцами с последующим их детектированием. К недостаткам метода планарной хроматографии можно отнести: а) ограниченная разрешающая способность из-за сравнительно небольшой длины разделяющей зоны; б) более низкая чувствительность, чем в методе ВЭЖХ; в) зависимость результатов анализа от факторов окружающей среды.

1.1. Неподвижные фазы, применяемые в тонкослойной хроматографии

Хроматографическая пластина представляет собой тонкую плоскую подложку с нанесенным на нее вручную или промышленным способом сорбентом (неподвижной фазой). Сорбенты, используемые в тонкослойной хроматографии, можно разделить на три группы по степени полярности:

полярные, средней полярности, неполярные. Наиболее часто используются в методе ТСХ следующие неподвижные фазы:

Силикагель (полярная фаза). Поверхность силикагеля содержит активные силанольные группы, являющиеся донорами протонов. Кроме силанольных групп на поверхности силикагеля имеются силоксановые группы, обладающие протоноакцепторными свойствами. Силикагель применяют для разделения большого количества веществ с различными функциональными группами (алифатические углеводороды, простые и сложные эфиры, карбонильные соединения, фенолы и спирты, карбоновые кислоты и др.). В ТСХ используют также импрегнированные различными веществами слои силикагеля. Импрегнирование обычно проводят путем опрыскивания или погружения в раствор выбранного реагента. В качестве реагентов широко используются катионы различных металлов, борная кислота и др. в процессе хроматографического разделения эти соединения образуют комплексы, имеющие различные константы нестойкости, с компонентами разделяемой смеси, что и приводит к увеличению эффективности разделения. На основе слоев силикагеля получают неподвижные фазы, обладающие средней и низкой полярностью. Это осуществляется путем химической модификации силикагеля как *n*-алкильными радикалами различной длины ($n = 2, 8, 18$), так и алкильными радикалами, имеющими в конце метиленовой цепи функциональные группы, такие как $-NH_2$; $-CN$ и $-CH(OH)-CH_2OH$ (аналогично ВЭЖХ).

Оксид алюминия (полярная фаза). Он, как и силикагель способен образовывать водородные связи; однако, в отличие от силикагеля, протоноакцепторные свойства у него выражены сильнее. Оксид алюминия в зависимости от способа приготовления может обладать нейтральными, кислотными и основными свойствами. Область применения – разделение ароматических углеводородов, алкалоидов, хлоруглеводородов, стероидов.

Флорисил. Основной силикат магния – по полярности занимает промежуточное положение между оксидом алюминия и силикагелем. Применяют в анализе флавоноидов, стероидов, ацетилированных углеводов.

Кизельгур (диатомитовая земля). Применяется главным образом для разделения сильно полярных соединений по адсорбционному механизму.

В настоящее время разработаны модифицированные целлюлозы, которые представляют собой ионообменники.

В качестве подложки для сорбента используют стекло, алюминиевую фольгу, полимерные материалы (в основном, полиэтилентерефталат). Для придания стабильности слоя сорбента на подложке используются различные связующие вещества (гипс, силиказоль, силикаты щелочных металлов, полиакриламид, крахмал). К адсорбенту часто добавляют флуоресцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в УФ области спектра. Важной характеристикой сорбентов, является диаметр их частиц. В классической ТСХ используются для производства пластинок сорбенты с

размером частиц 11-20 мкм. В высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) используют сорбент, диаметр частиц которого составляет 5- 7 мкм.

1.2. Подвижные фазы, применяемые в тонкослойной хроматографии

Элюенты, используемые в ТСХ, должны удовлетворять следующим требованиям:

- быть малотоксичными и содержать минимум компонентов. Результаты, получаемые при использовании многокомпонентных элюентов, как правило, трудно воспроизводимы;
- индивидуальные компоненты подвижных фаз должны быть чистыми;
- подвижная фаза не должна вступать в химические реакции ни с сорбентом, ни с компонентами разделяемой смеси. Часто к подвижной фазе добавляют вещества кислого или основного характера для подавления диссоциации молекул компонентов разделяемой смеси;
- подвижная фаза должна быстро испаряться с поверхности хроматограммы после проведения разделения. Выбор растворителя зависит от природы сорбента и свойств анализируемых соединений. Часто применяют смеси растворителей из двух и более компонентов. При практическом выборе подвижной фазы можно руководствоваться следующим эмпирическим правилом, если вещество обладает слабым сродством к сорбенту, то используют активные слои сорбента и слабополярные растворители, стоящие вначале элюотропного ряда и наоборот. Элюирующая сила растворителей различна для каждой комбинации «сорбент – подвижная фаза».

1.3. Основные параметры разделения в планарной хроматографии

Продвижение органического растворителя по пластине так же, как и в БХ, обеспечивается капиллярными силами. Хроматографическое разделение методами БХ и ТСХ проводят в разделительной камере или цилиндре с притёртой крышкой. Положение зоны хроматографируемого компонента устанавливают по величине коэффициента R_f , равной отношению скорости движения его зоны к скорости движения фронта растворителя. На практике величину R_f рассчитывают как отношение расстояния l , пройденного веществом, к расстоянию L , пройденному растворителем:

$$R_f = \frac{l}{L}$$

Обычно для расчета выбирают точку в центре пятна (рис. 1.)

Величина R_f зависит от многих факторов: типа хроматографической бумаги (ее пористости, плотности, толщины, степени гидратации) и сорбента (размера зерна, природы групп на поверхности, толщины слоя, его влажности), природы вещества, растворителей, состава подвижной фазы,

условий эксперимента (температуры, времени хроматографирования и т.п.). При постоянстве всех параметров хроматографирования значение коэффициента R_f определяется только индивидуальными свойствами каждого компонента.

Эффективность БХ и ТСХ также зависит от селективности и чувствительности реакций, используемых для обнаружения компонентов анализируемой смеси. Обычно используют реагенты, образующие с определяемыми компонентами окрашенные соединения – проявители.

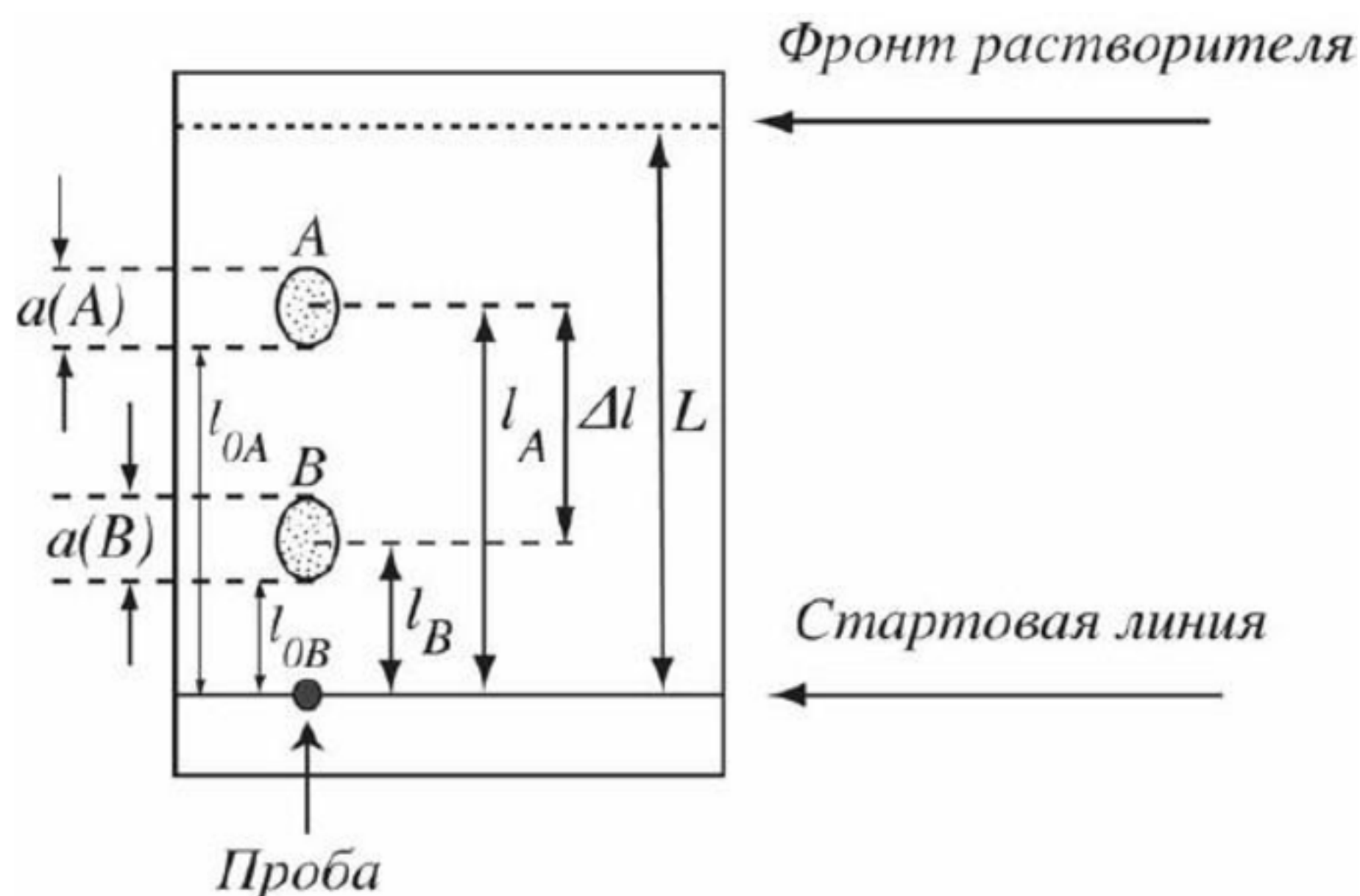


Рис. 1. Определение на хроматограмме величин R_f для компонентов А и В, степени их разделения R_s и числа теоретических тарелок N .

Для более надёжной идентификации разделяемых компонентов применяют «свидетелей» – это растворы стандартных веществ (в том же растворителе, что и проба), наличие которых предполагается в анализируемом образце. Стандартное вещество наносят на стартовую линию рядом с анализируемой пробой и хроматографируют в одних условиях. На практике часто используют относительную величину:

$$R_{f,rel} = \frac{R_{f,x}}{R_{f,stand.}},$$

где $R_{f, stand.}$ также рассчитывают по формуле.

Эффективность хроматографического разделения характеризуют числом эквивалентных теоретических тарелок и их высотой. Так, в методе ТСХ число эквивалентных теоретических тарелок N для компонента А разделяемой смеси рассчитывают по формуле:

$$N_A = 16 \left(\frac{l_{0A}}{a(A)} \right)^2.$$

Значения l_{OA} и $a(A)$ определяют, как показано на рис. 1. Тогда высота эквивалентной теоретической тарелки H_A составляет:

$$H_A = \frac{l_{OA}}{n} = \frac{a(A)^2}{16l_{OA}}.$$

Разделение практически возможно, если $Rf(A) - Rf(B) \geq 0,1$. Для характеристики разделения двух компонентов А и В используют *степень (критерий) разделения R_s* :

$$R_s = \frac{\Delta l}{[a(A)/2 + a(B)/2]} = \frac{2\Delta l}{[a(A) + a(B)]},$$

где Δl – расстояние между центрами пятен компонентов А и В; $a(A)$ и $a(B)$ – диаметры пятен А и В на хроматограмме соответственно. Чем больше R_s , тем чётче разделены пятна компонентов А и В на хроматограмме. Условия хроматографирования подбирают так, чтобы величина R_s отличалась от нуля и единицы, оптимальное значение R_s составляет 0,3 – 0,7.

Для оценки *селективности разделения* двух компонентов А и В используют *коэффициент разделения α* :

$$\alpha = \frac{l_B}{l_A}.$$

Если $\alpha=1$, то компоненты А и В не разделяются.

В зависимости от направления движения подвижной фазы различают:

- а) *восходящую хроматографию* – подвижную фазу наливают на дно разделительной камеры, бумага (пластинка) ставится вертикально;
- б) *нисходящую хроматографию* – подвижная фаза подаётся сверху и перемещается вниз вдоль слоя сорбента пластинки или бумаги;
- в) *радиальную хроматографию* – горизонтальное продвижение фронта растворителя: подвижная фаза подводится к центру бумажного диска (пластины), куда нанесена разделяемая смесь.

1.4. Детектирование соединений на хроматограммах

Если соединения окрашены, то их обнаруживают визуально. Но большинство хроматографируемых соединений бесцветно и поэтому для их обнаружения используют различные методы, которые можно разделить на несколько групп: физические, химические и биологические. Физические методы. В этом случае для детектирования пятен пластинку помещают в УФ излучение (обычно флуоресценция вызывается облучением с длиной волны 254 или 365 нм). Методы этой группы применяются для обнаружения соединений:

- флуоресцирующих при облучении светом определенной длины волны. В этом случае соединения на хроматограмме видны в виде светящихся разным цветом пятен (например, рибофлавин, кумарин и др.).

Флуоресценция является наиболее чувствительным методом. Для увеличения интенсивности флуоресценции хроматограмму можно предварительно обработать подходящим специфическим реагентом;

- нефлуоресцирующих, которые хроматографируют на слоях сорбента, содержащих флуоресцентные индикаторы (люминофор). Пятна исследуемых соединений можно наблюдать в виде темных зон на желто-зеленом или голубом фоне (в зависимости от люминофора).

Микробиологические и биохимические методы. Эти методы обладают высокой чувствительностью и избирательностью. К ним относятся биоавтография и фермент-субстратная реакция. Их используют при анализе биологически активных соединений. В биоавтографических методах при обнаружении стимуляторов роста или витаминов определяется степень роста зон микроорганизмов, а при обнаружении антибиотиков – степень их ингибирования. Недостатком биологических методов обнаружения является большие затраты времени на их проведение – от нескольких часов до нескольких дней.

Химические методы. При обнаружении соединений химическими методами хроматограмму после окончания разделения обрабатывают различными реагентами. В настоящее время используется ряд методов обработки хроматограммы обнаруживающими реагентами:

- выдерживание хроматограммы в закрытой камере, где присутствуют пары обнаруживающего реагента;
- внесение обнаруживающего реагента в подвижную фазу;
- опрыскивание хроматограммы раствором обнаруживающего реагента;
- погружение хроматограммы в раствор обнаруживающего реагента.

Для протекания обнаруживающей реакции пластинку часто необходимо нагревать до определенной температуры.

Различают реагенты универсальные (неизбирательные) и избирательные, которые избирательно взаимодействуют с определенными функциональными группами исследуемых соединений.

К универсальным реагентам можно отнести газы (пары аммиака, йода, брома) и растворы сильных окислителей (серная кислота, азотная кислота, перманганат калия и др.). В первом случае соединения обнаруживаются по появлению желто-коричневых пятен, а во втором – по появлению пятен различной окраски (красной, фиолетовой, темно-бурой и др.).

К специфическим реагентам относится огромное количество химических веществ, которые выбирают в зависимости от химических свойств определяемых веществ и реакций, в которые они вступают. Например, сульфаниламидные препараты проявляются путем опрыскивания пластинки концентрированной соляной кислотой с последующим нагреванием в сушильном шкафу при 100°C в течение 30 минут. Холестерин проявляется погружением хроматограммы в 0,1% раствор брома в хлороформе на 1 секунду с последующим высушиванием на воздухе и

выдерживанием при 60°C в течение 10 мин. 70 Ментол обнаруживается при обработке пластины уксусным ангидридом и нагреванием при 100°C в течение 15 мин. Аминокислоты обнаруживают опрыскиванием раствора нингидрина с последующим нагреванием при 100 °C. Фенолы проявляют опрыскиванием хроматограммы раствором хлорида железа (III), а неорганические ионы – растворами комплексообразующих реагентов.

1.5. Техника проведения анализа методом планарной хроматографии

При проведении анализа можно выделить следующие этапы:

1. Подготовка пробы
2. Подготовка пластины или хроматографической бумаги
3. Подготовка хроматографической камеры и подвижной фазы
4. Нанесение пробы
5. Элюирование пластины
6. Проявление веществ на пластине

1.6. Применение планарной хроматографии в качественном анализе

Идентификацию соединений в тонкослойной хроматографии проводят путем сравнения значений R_f пятен анализируемого вещества и стандартного (вещества-свидетеля). Растворы веществ-свидетелей наносятся на пластинку рядом с пятном исследуемого объекта и хроматографируются одновременно в тех же условиях. Только при совпадении величин R_f ($R_f \pm 0,02$) у пятен компонентов исследуемой пробы с пятнами веществ-свидетелей делают заключение об идентичности соединений. Поэтому важным условием, позволяющим произвести качественный анализ разделяемой смеси, является наличие стандартных образцов веществ-свидетелей. Дополнительным подтверждением идентичности являются одинаковая окраска под воздействием химических реагентов, одинаковая реакция на УФ излучение, которые проявляются при детектировании. Если состав пробы неизвестен или вещества-свидетели недоступны, то можно опираться на литературные данные, описывающие детектирование пятен веществ и их значения R_f в соответствующих условиях хроматографирования. Однако такой способ весьма не точен, так как полное воспроизведение хроматографических условий в ТСХ затруднительно.

1.7. Применение тонкослойной хроматографии в количественном анализе

Методы количественного хроматографического анализа в тонкослойной хроматографии можно разделить на две группы: методы, основанные на извлечении вещества с хроматографической пластинки и методы прямого количественного определения на хроматограмме.

К первой группе относятся методы, основанные на переносе хроматографической зоны с пластинки в подходящую емкость с последующим экстрагированием вещества с сорбента и определением его с помощью классических методов количественного анализа — колориметрических, спектрофотометрических, и др. Этот метод является трудоемким, хотя и достигается при его использовании достаточная точность.

Ко второй группе относятся методы, не требующие удаления анализируемого вещества с пластинки.

Эти методы базируются на том, что площадь пятен и их интенсивность окраски зависят от количества хроматографируемого вещества. Для количественного определения содержания вещества в хроматографических зонах в этой группе методов используют два способа. Первый способ основан на пропорциональности площади пятна логарифму концентрации при нанесении постоянных объемов растворов анализируемого вещества. Площадь пятен измеряют вручную с помощью миллиметровой бумаги. Погрешность количественного определения таким способом достаточно велика, составляет 5-10%. Полуколичественную оценку содержания вещества методом ТСХ можно провести путем визуального сравнения величины окрашенных или флуоресцирующих пятен анализируемых соединений со стандартными растворами. Второй способ основан на принципах фотометрии с использованием специальных приборов.

В настоящее время количественная обработка хроматограмм осуществляется с помощью денситометров. Денситометры позволяют измерять поглощение света веществом непосредственно на хроматограмме в режиме пропускания или отражения, а также флуоресценцию или ее гашение. Режим пропускания можно использовать только в том случае, если исследуемое вещество имеет полосы поглощения, лежащие в видимой области спектра. Если вещество поглощает в УФ области спектра регистрацию в режиме пропускания осуществить нельзя из-за собственного поглощения силикагеля и подложки хроматограммы. Поэтому поглощение света в этой области регистрируется в режиме отражения. Свет, падающий на поверхность хроматограммы в области пятна исследуемого вещества, поглощается пятном, поэтому интенсивность отраженного света уменьшается. Если разделяемые вещества флуоресцируют, то количественные измерения проводят по величине интенсивности флуоресценции. Для проведения количественного анализа методом денситометрии необходимо предъявлять более строгие требования к хроматографическим пластинкам и условиям хроматографирования, а именно:

- использовать специальные пластинки для ВЭТСХ с гомогенным сорбентом, нанесенным равномерным слоем;

- наносить одинаковые размеры стартовых пятен точно калиброванными микрошприцами или капиллярными пипетками;
- соблюдать хроматографические условия, обеспечивающие постоянное парциальное давление паров элюента в камере и подбирать состав подвижной фазы, при котором достигается четкое разделение пятен;
- в случае если для обнаружения веществ на используется химическое детектирование, то опрыскивание пластинки реагентом необходимо проводить равномерно с получением контрастных пятен.

В настоящее время в денситометрии используются два типа приборов: сканирующие денситометры и видеоденситометры. В сканирующих денситометрах хроматографическая пластинка помещается на передвигающуюся с постоянной скоростью платформу прибора. Сканирование проводят при облучении пластинки светом с определенной длины волны. В качестве источников видимого излучения применяют галогеновые или вольфрамовые лампы. УФ излучение получают с помощью дейтериевых ламп. Для флуоресцентного анализа используются высокоинтенсивные ртутные лампы. Задание длины волны осуществляют с помощью монохроматора или светофильтра. Для измерения величины сигналов обычно используются фотоумножители или фотодиоды. Различают два типа сканирующих денситометров: денситометры с изменяемым размером щели и денситометры, имеющие постоянный размер щели. Видеоденситометрия сравнительно новый метод для количественной обработки хроматограмм. Принцип метода основан на введении изображения хроматограммы в компьютер с помощью видеокамеры или цифровой камеры с последующим сравнением интенсивностей пятен стандартных и исследуемых соединений.

Глава 2. Лабораторная работа.

Разделение и идентификация аминокислот методами бумажной и тонкослойной хроматографии

Разделение аминокислот выполняют методами одномерных восходящих БХ и ТСХ. Указанные методы с успехом применяют для разделения и обнаружения аминокислот в различных смесях. Ниже приведены формулы соединений:

Моноаминокарбоновые кислоты

Глицин $\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COOH}$

Валин $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

Лейцин $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

Диаминокарбоновые кислоты

Лизин $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

Аргинин

Гетероциклические аминокислоты

Пролин

2.1. Реагенты и аппаратура

Разделительная камера или цилиндр с притёртой крышкой.

Капилляры.

Хроматографическая бумага шириной 2 см и длиной 20 см.

Пластика для ТСХ «UV-Silufol» (Чехия) шириной 1-1,5 см и длиной до 12-15 см.

Подвижная фаза: смесь изопропанол – H_2O (об. %: I -70:30; II - 50:50).

Анализируемые индивидуальные растворы аминокислот в подвижной фазе с концентрацией 1 мг/мл или модельные смеси в комбинациях: для разделения методом БХ лизин-глицин-лейцин, глицин-пролин-лейцин, лизин-валин- лейцин или двухкомпонентные смеси; для разделения методом ТСХ аргинин-пролин-лейцин, лизин-пролин-лейцин, лизин-глицин-лейцин, аргинин-глицин-лейцин или двухкомпонентные смеси.

Реагент-проявитель, 0,2%-ный раствор нингидрина в ацетоне.

2.2. Техника выполнения эксперимента методом БХ

На расстоянии 2 см от края бумажной полоски карандашом проводят стартовую линию. Из капилляра в середину этой линии наносят каплю анализируемого раствора или раствора с осадком. При этом необходимо прижать капилляр к бумаге, т.е. раствор следует наносить так, чтобы капля не расплывалась (чем меньше диаметр капли, тем более четкой будет хроматограмма). Диаметр пятна обычно составляет 2-3 мм. Пятно обводят карандашом, высушивают над песчаной баней, не касаясь ее. Эту операцию проводят 2-3 раза.

Получение хроматограммы. Полоску хроматографической бумаги с нанесенной каплей анализируемого раствора опускают вертикально в

цилиндр так, чтобы ее конец был погружен в растворитель не более, чем на 0,5 см. Пятно не должно погружаться в растворитель, а бумажная полоска не должна касаться стенок цилиндра. Время хроматографирования составляет 1,5-2 часа. Процесс прекращают после того, как растворитель пройдет от линии старта не менее 10 см.

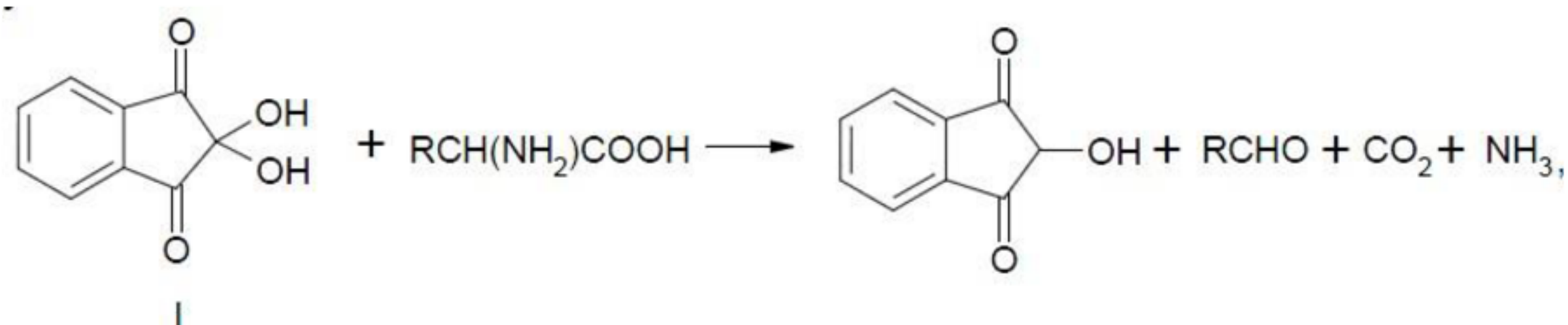
2.3. Техника выполнения эксперимента методом ТСХ

На пластинке для ТСХ проводят *карандашом* линию старта (*ни в коем случае в этих целях нельзя использовать гелевую или шариковую ручку!*) на расстоянии 1 см от края. На стартовую линию наносят капилляром раствор смеси аминокислот так, чтобы диаметр пятна не превышал 4-5 мм, а центр пятна находился на линии старта. Подсушивают пластинку над песчаной баней или плиткой и вновь наносят анализируемую смесь на линию старта.

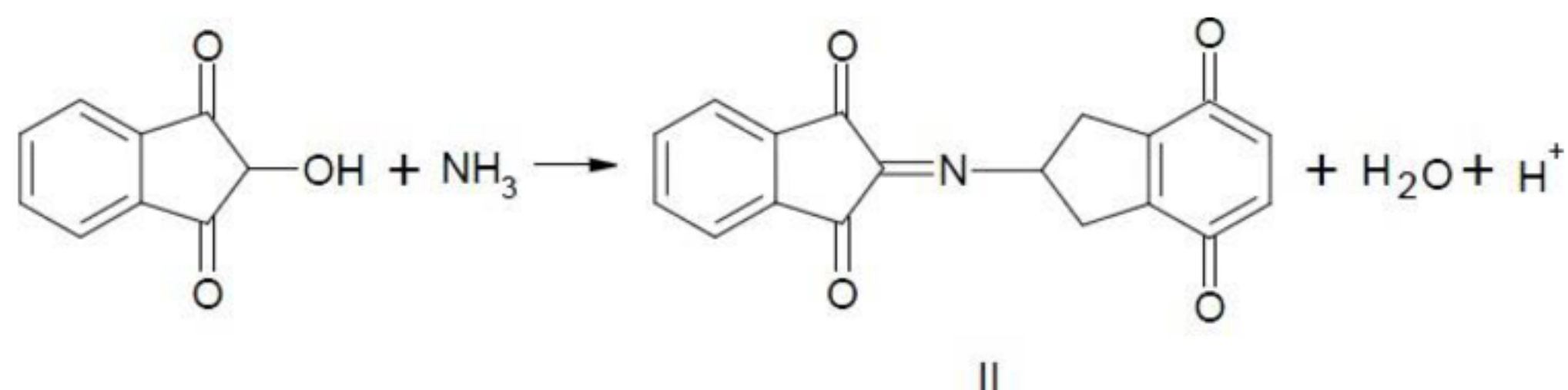
Внимание, пластинки для ТСХ надо брать аккуратно за края, не захватывая при этом центральную часть!

Пластинку с нанесенной пробой помещают вертикально в цилиндр так, чтобы она погружалась в подвижную фазу не более чем на 5 мм. Хроматографирование прекращают, когда фронт растворителя пройдет 8-10 см. В случае разделения методом БХ время хроматографирования составляет 1,5–2 ч, для ТСХ не превышает 15-25 мин. Далее пластинку аккуратно вынимают из камеры, карандашом отмечают линию фронта растворителя, подсушивают пластинку над песчаной баней или плиткой и обрабатывают раствором нингидрина.

Нингидрин (I) расщепляет α-аминокислоту до альдегида, углекислого газа и аммиака:



а аммиак образует с нингидрином краситель фиолетового цвета (фиолетовый Руэманна) (II):



Пролин, у которого нет α-аминогруппы, в реакции с нингидрином образует производное желтого цвета. После обработки пластинки раствором нингидрина её снова подсушивают: при нагревании при 70-80°C для проявления пятен на хроматограмме достаточно 3-5 мин. Рассчитывают величины R_f для каждого пятна. Затем по величинам R_f и окраске пятен

идентифицируют компоненты анализируемой смеси, используя данные табл. 1

Таблица 1
Величины R_f и окраска пятен аминокислот на хроматограмме при разделении их методами бумажной хроматографии (I) и ТСХ (II) ($n = 5$, $P = 0,95$)

Аминокислота	R_f		Цвет пятна	
	I	II	I	II
Аргинин	—	$0,07 \pm 0,01$	—	Красно-фиолетовый
Лизин	0,10	$0,08 \pm 0,02$	Красно-фиолетовый	Сине-фиолетовый
Пролин	0,53	$0,56 \pm 0,04$	Желто-синяя	Сине-желтый
Глицин	0,35	$0,63 \pm 0,06$	Фиолетовый	Сине-фиолетовый
Лейцин	0,81	$0,83 \pm 0,07$	Фиолетовый	Сине-фиолетовый
Валин	0,66	—	Фиолетовый	—

Отчет по проделанной работе должен соответствовать форме отчета (Приложение) и содержать следующие вычисления и заключения:

1. Вычисляют величины R_s и α для двух компонентов разделяемой смеси (рис. 1).
2. Оценивают величины N и H для каждой аминокислоты.
3. Делают вывод о качественном составе анализируемой смеси, эффективности и селективности разделения аминокислот.
4. Хроматограмму вклеивают в лабораторный журнал.

Контрольные вопросы для самостоятельной работы обучающихся

1. В чем состоит сущность методов хроматографии?
2. Какие существуют способы классификации хроматографических методов анализа?
3. Какие способы применяют для характеристики эффективности разделения?
4. Что такое тонкослойная (планарная) хроматография?
5. К каким методам жидкостной хроматографии ее можно отнести?
6. Каков механизм разделения веществ в тонком слое сорбента?
7. Какие подвижные и неподвижные фазы применяются в тонкослойной хроматографии, какой принцип подбора фаз?
8. Назовите основные этапы проведения анализа методом ТСХ, кратко охарактеризуйте каждый из этапов.
9. Охарактеризуйте основные параметры разделения в ТСХ, приведите формулы.
10. Как тонкослойная хроматография применяется в качественном и количественном анализе?
11. С помощью каких приборов осуществляется количественная обработка хроматограммы?

Библиографический список

1. Бёккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Бёккер. – М.: техносфера, 2009. – 473 с.
2. Жебентяев А.И. Аналитическая химия. Хроматографические методы анализа : учеб. пособие / А. И. Жебентяев. – Минск : Новое знание; Москва : ИНФРА-М, 2013. – 205 с.
3. Харитонов Ю.Я. Аналитическая химия. Аналитика 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа / Ю. Я. Харитонов. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 656 с.

Форма отчета

РАЗДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (БХ) / ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ТСХ)

ФИО обучающегося

Курс: _____ Группа: _____

Цель работы:

Краткое теоретическое введение: характеристика метода БХ (ТСХ) по аппаратному оформлению, агрегатному состоянию подвижной и неподвижной фаз, механизму разделения и способу получения хроматограммы; понятие фактора удерживания R_f и его зависимость от условий хроматографирования; идентификация веществ в методе БХ (ТСХ) с использованием свидетелей. Способ детектирования.

Реактивы и оборудование:

Экспериментальные результаты:

Рисунок полученной хроматограммы:

Таблица 1

Параметры удерживания индивидуальных веществ (свидетелей)

№ п/п	Вещество	l , см	L , см	R_f
1				
2				
3				

Таблица 2

Параметры удерживания компонентов анализируемой смеси (задачи)

№ п/п	l , см	L , см	R_f	Вещество
1				
2				

Заключение:

ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России
Сертификат 01D9A9C6655B6ED0000BADF200060002
Владелец Пармон Елена Валерьевна
Действителен с 28.06.2023 по 28.06.2024