

Лабораторная работа «Тонкослойная хроматография антрацена»

Хроматография – метод разделения и анализа сложных молекулярных соединений и их смесей, основанный на принципе сорбции. Анализируемое вещество распределяется между двумя фазами – подвижной (жидкий или газообразный элюент) и неподвижной (жидкий или твердый сорбент). Различные компоненты смеси по-разному взаимодействуют с адсорбентами, позволяя сделать точные выводы о количественном и качественном составе смеси.

Хроматографические методы находят широкое применение в клинической практике. Хроматография на бумаге и ТСХ используют для определения аминокислот, углеводов, нуклеотидов, кетокислот, гормонов и др. в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча, слюна, пот) или в экстрактах из тканей в норме и при различных патологических состояниях. Методом хроматографии на бумаге установлены состав и содержание свободных аминокислот в плазме крови и в моче здоровых людей и при некоторых заболеваниях с нарушением азотистого обмена, например при болезнях печени, почек, болезни Вильсона (гепато-церебральная дистрофия), синдроме Фанкони (цистиноз), недостаточности витаминов, фенилкетонурии и других психических заболеваниях, вызванных токсическим действием отдельных аминокислот или продуктов их неправильного обмена на ЦНС. В нормальной моче человека на двухмерной бумажной хроматограмме могут быть обнаружены глютаминовая кислота (или глютамин), аланин, глицин, таурин, β -аминоизомасляная кислота (β -АИМК), гистидин или метилгистидин. β -АИМК впервые открыта при помощи хроматографии на бумаге. Эта аминокислота встречается в больших количествах у отдельных индивидуумов (семейный признак); она найдена примерно у 5—10% населения. Остальные аминокислоты могут быть выявлены на хроматограмме после сгущения мочи. Аминоацидурия хроматографически выявляется при печеночной коме, некрозах печени, злокачественных новообразованиях, нефритах, ожогах, голодании. Обнаружение на хроматограммах в моче детей аргининоянтарной кислоты (АЯК) впервые позволило описать и выяснить патогенез наследственного психического заболевания детей, названного аргининоянтарной ацидурией; причиной заболевания является утрата гена, связанного с синтезом сукцинаргиназы. Высокое содержание АЯК в цереброспинальной жидкости вызывает отравление ЦНС.

ТСХ на окиси алюминия и силикагеле используют для качественного и количественного определения гормонов коры надпочечника (17-кетостероидов) и половых гормонов — андростерона и эстрогенов — в плазме крови и моче; этот метод применяют для ранней диагностики беременности и при гормональных заболеваниях. Сочетание электрофореза и

хроматографии на бумаге впервые позволило установить различие в аминокислотном составе нормального гемоглобина человека (гемоглобин А) и гемоглобина больных серповидноклеточной анемией (гемоглобин S), положив начало изучению болезненных процессов, совершающихся на молекулярном уровне (при которых клиническое состояние больного обусловлено присутствием химически измененной белковой молекулы).

Хроматография оказалась незаменимой для изучения патогенеза болезней, протекающих с нарушением обмена веществ, что открыло новые диагностические возможности и указало пути к рациональной терапии некоторых заболеваний. Широкое применение находит хроматография в судебно-медицинской экспертизе.

Тонкослойная хроматография — хроматографический метод, основанный на использовании тонкого слоя адсорбента в качестве неподвижной фазы. Он основан на том, что разделяемые вещества по-разному распределяются между сорбирующим слоем и протекающим через него элюентом, вследствие чего расстояние, на которое эти вещества смещаются по слою за одно и то же время, различается. Тонкослойная хроматография предоставляет большие возможности для анализа и разделения веществ, поскольку и сорбент, и элюент могут варьироваться в широких пределах. При этом коммерчески доступен ряд пластинок с различными сорбентами, что делает возможным быстрое и рутинное использование метода. Разновидностью тонкослойной хроматографии является более надёжная и воспроизводимая высокопроизводительная тонкослойная хроматография, при проведении которой используются специальные пластинки и сложное оборудование.

Тонкослойная хроматография была открыта в 1889 году, существенно развита в середине XX века и до настоящего времени широко используется в фармацевтической, медицинской, пищевой сферах, а также в академической и промышленной науке.

Коммерческие пластинки с нанесённым адсорбционным слоем стали доступны в 1961 году и на сегодняшний день практически вытеснили из употребления самодельные. В качестве подложек обычно используются стекло, пластик или алюминий, на которые наносятся сорбенты с размером частиц 10—20 мкм. Толщина слоя составляет от 100—250 мкм для аналитических пластинок до 2 мм для препаративных пластинок. Стандартный формат пластинок — 20×20 см, но существуют также форматы 10×20, 5×20 и 2,5×5 см. Также пластинку необходимого размера можно вырезать самостоятельно. Существуют также пластинки с каналами, облегчающими нанесение образцов и препятствующие их смешиванию. Пластинки с преадсорбционным слоем производят из материала с более низкой адсорбирующей способностью (целлюлоза, кизельгур). Такие слои

служат для очистки образца, а также для формирования узкой полосы перед достижением образцом разделяющего слоя.

Пластинки для высокопроизводительной ТСХ были предложены в 1975 году и также имеют размеры 10×20 и 10×10 см при толщине адсорбционного слоя в 200 мкм. Такие пластинки обладают повышенной разрешающей способностью, более низким пределом обнаружения, требуют меньше растворителя для элюции. В 1995 году появились высокопроизводительные пластинки со сферическими частицами, обладающие ещё более улучшенными свойствами. В 2001 году на рынке были предложены пластинки с монокристаллическим слоем, которые нашли применение лишь в научных исследованиях.

В качестве адсорбентов исторически применялись несколько материалов: оксид алюминия (кислый, нейтральный и основной), кизельгур (очищенная диатомитовая земля), полиамиды, катионообменные смолы. Эти материалы и сегодня упоминаются в учебниках и научных статьях, однако они утратили своё значение, и их производство, в основном, остановлено.

Для упрочнения пластин может использоваться связывающее вещество. Ранее для этих целей, например, в пластинках с силикагелем G, широко использовался гипс в количестве 13 массовых процентов. В современных коммерчески доступных пластинках используются органические связывающие вещества (например, метакрилаты). В литературе описано также применение крахмала и карбоксиметилцеллюлозы. Фактически, связывающее вещество является компонентом неподвижной фазы, может привести к искажению результатов хроматографии.

Адсорбционный слой может содержать флуоресцентный индикатор, позволяющий более удобно детектировать положение зон веществ. При облучении индикатора ультрафиолетовым излучением при длине волны 254 нм индикатор испускает зелёное (F254) или бледно-голубое (F254 s) излучение. При этом зона вещества, поглощающего ультрафиолет, выглядит тёмной на фоне флуоресцирующего слоя.

ХОД РАБОТЫ

В отдельной хроматографической камере возгоняется кристаллический йод до достижения сине-фиолетового тумана. Камера закрыта притертым покрывным стеклом во время всего анализа.

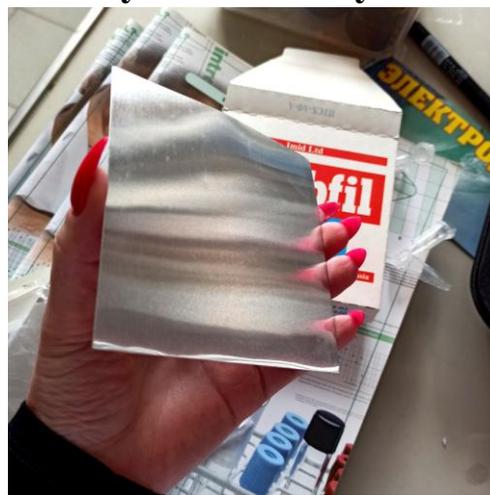
Приготовьте смесь для элюирования: ацетонитрил – вода в соотношении 1:1.

На пластинке с сорбентом отмечается линия старта с помощью карандаша и линейки на уровне 1 см от края, на линию старта наносятся капли исследуемых растворов (аналита и стандарта). Пластинка высушивается.

На дно хроматографической камеры наливают небольшое количество элюента, чтобы жидкость покрыла дно, приблизительно на 0,5 см.

В хроматографическую камеру помещаются хроматографические пластинки.

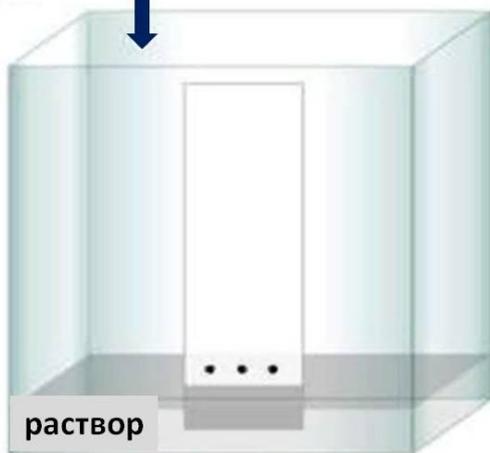
Внимание! Держать хроматографическую пластину необходимо за края не касаясь основного поля, как показано на рисунке ниже. Обратите внимание наносить образец на белую сторону, а не на металлизированную подложку!



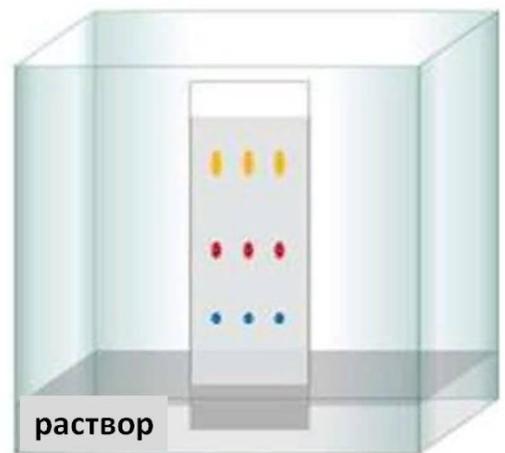
Внимание! Линия старта должна быть выше уровня элюента в камере. Камера накрывается покрывным стеклом на все время хроматографирования.

Хроматографирование останавливается, когда фронт прохождения элюента достигает уровня 1-0,5 см от верхнего края пластинки, как показано на схеме.

Камера для хроматографии



Начало хроматофирования



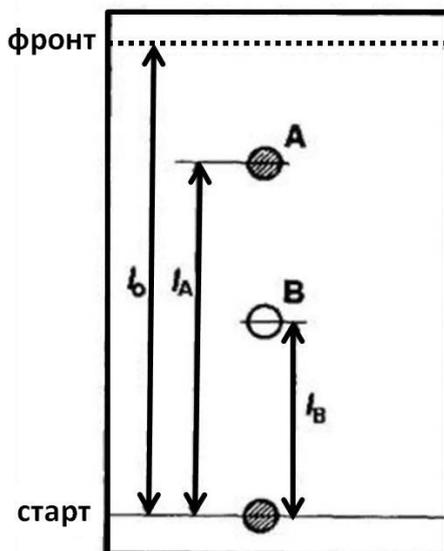
Окончание хроматофирования

Пластика извлекается и на ней отмечается финишная линия.

Далее пластинка высушивается феном или при комнатной температуре 30-40 минут.

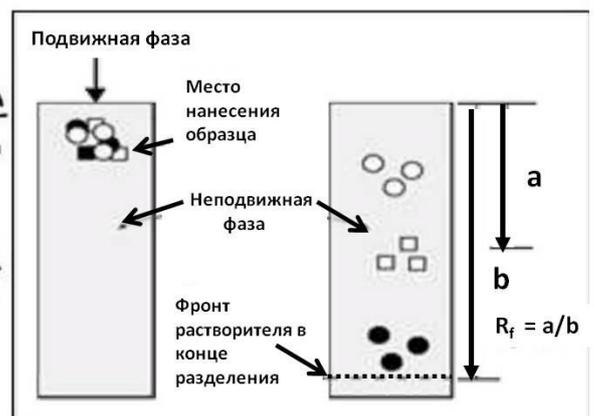
После полного высыхания, пластинка помещается в камеру с УФ-облучением (254 нм) или в камеру с парами йода для проявления пятен исследуемых веществ.

Пятна отмечаются на хроматограмме механически (карандошом). И далее хроматограмма подвергается измерению и обсчёту, как показано на рисунках.



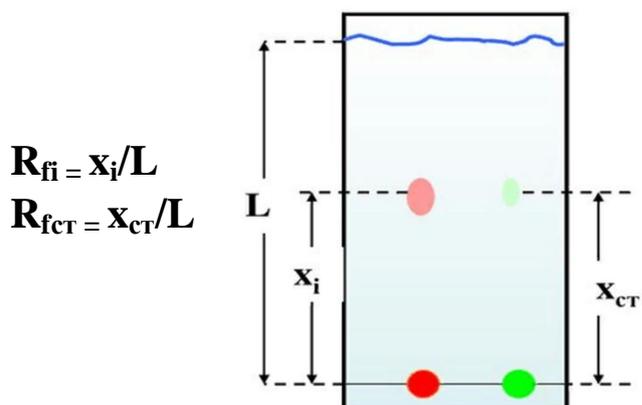
$$R_f(A) = \frac{l_A}{b}$$

$$R_f(B) = \frac{l_B}{b}$$



Качественный анализ

Сравнение величины R_f соединения, находящегося в смеси (R_{fi}), со значением R_f стандартного образца (R_{fct})



Рассчитать R_f для компонентов анализируемого раствора и раствора стандарта и по значениям R_f сделать заключение о присутствии антрацена в анализе.