

Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное
учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Кафедра фундаментальной медицины и биологии

Отчетная работа

По результатам выполнения индивидуальных заданий учебной практики
«Профессиональная учебная практика по биохимии»
на тему:

« Принципы высокоэффективной жидкостной хроматографии. Основные
виды детекторов. Области применения в биомедицинских исследованиях.»

*Удобн (74)
Сформулированы не соответствующие
рекомендуемому количеству
области применения КС
аппаратов из статьи по
фармакокинетики.
З.И. Морковин Е.И.
20.07.2018*

Выполнили:
студенты 3 курса 302 группы
МБФ «Биология: профиль: Биохимия»
Лебедева Наталья Александровна
Магомедов Джабраил Магомедович

Проверил:
Доцент кафедры фундаментальной
медицины и биологии, к.м.н.
Морковин Евгений Игоревич

Волгоград
2018г.

Содержание

Введение	3
1. Сущность высокоэффективной жидкостной хроматографии	4
2. Детекторы для высокоэффективной жидкостной хроматографии	5
3. Применение	7
Заключение	9
Список литературы	10

Введение

Хроматографические методы часто оказываются незаменимыми для идентификации и количественного определения органических веществ со сходной структурой. При этом наиболее широко используемыми для рутинных анализов загрязнителей окружающей среды являются газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография. Газохроматографический анализ органических загрязнителей в питьевой и сточных водах сначала основывался на использовании насадочных колонок, позднее распространение получили и кварцевые капиллярные колонки.

Газохроматографические детекторы, используемые в мониторинге загрязнителей, часто подразделяют на универсальные, откликающиеся на каждый компонент в подвижной фазе, и селективные, реагирующие на присутствие в подвижной фазе определенной группы веществ со сходными химическими характеристиками. К универсальным относятся пламенно-ионизационный, атомно-эмиссионный, масс-спектрометрический детекторы и инфракрасная спектроскопия. Селективными детекторами, используемыми в анализе воды, являются электронно-захватный (селективен к веществам, содержащим атомы галогенов), термоионный (селективен к азот- и фосфорсодержащим соединениям), фотоионизационный (селективен к ароматическим углеводородам), детектор по электролитической проводимости (селективен к соединениям, содержащим атомы галогенов, серы и азота). Минимально детектируемые количества веществ - от нанограммов до пикограммов в секунду.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является идеальным методом для определения большого числа термически неустойчивых соединений, которые не могут быть проанализированы с помощью газовой хроматографии. Объектами анализа методом жидкостной хроматографии в настоящее время часто становятся современные агрохимикаты, в число которых входят метилкарбонаты и фосфорорганические инсектициды, другие нелетучие вещества. Высокоэффективная жидкостная хроматография получает все большее распространение среди других методов, применяемых в мониторинге окружающей среды, еще и потому, что имеет блестящие перспективы в плане автоматизации пробоподготовки.

1. Сущность высокоэффективной жидкостной хроматографии

В высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) характер происходящих процессов в хроматографической колонке, в общем идентичен с процессами в газовой хроматографии. Отличие состоит лишь в применении в качестве неподвижной фазы жидкости. В связи с высокой плотностью жидких подвижных фаз и большим сопротивлением колонок газовая и жидкостная хроматография сильно различаются по аппаратному оформлению.

В ВЭЖХ в качестве подвижных фаз обычно используют чистые растворители или их смеси.

Для создания потока чистого растворителя (или смесей растворителей), называемого в жидкостной хроматографии элюентом, используются насосы, входящие в гидравлическую систему хроматографа.

Адсорбционная хроматография осуществляется в результате взаимодействия вещества с адсорбентами, такими как силикагель или оксид алюминия, имеющими на поверхности активные центры. Различие в способности к взаимодействию с адсорбционными центрами разных молекул пробы приводит к их разделению на зоны в процессе движения с подвижной фазой по колонке. Достигаемое при этом разделение зон компонентов зависит от взаимодействия, как с растворителем, так и с адсорбентом.

Наибольшее применение в ВЭЖХ находят адсорбенты из силикагеля с разным объемом, поверхностью и диаметром пор. Значительно реже используют оксид алюминия и другие адсорбенты.

Основная причина этого:

- недостаточная механическая прочность, не позволяющая упаковывать и использовать при повышенных давлениях, характерных для ВЭЖХ; силикагель по сравнению с оксидом алюминия обладает более широким диапазоном пористости, поверхности и диаметра пор; значительно большая каталитическая активность оксида алюминия приводит к искажению результатов анализа вследствие разложения компонентов пробы либо их необратимой хемосорбции.

2. Детекторы для высокоэффективной жидкостной хроматографии

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) используется для детектирования полярных нелетучих веществ, которые по каким-либо причинам не могут быть переведены в форму удобную для газовой хроматографии, даже в виде производных. К таким веществам, в частности, относят сульфоновые кислоты, водорастворимые красители и некоторые пестициды, например производные фенил - мочевины.

Детекторы:

УФ - детектор на диодной матрице. «Матрица» фотодиодов (их более двухсот) постоянно регистрирует сигналы в УФ- и видимой области спектра, обеспечивая таким образом запись УФ-В-спектров в режиме сканирования. Это позволяет непрерывно снимать при высокой чувствительности неискаженные спектры быстро проходящих через специальную ячейку компонентов.

По сравнению с детектированием на одной длине волны, которое не дает информации о «чистоте» пика, возможности сравнения полных спектров диодной матрицы обеспечивают получение результата идентификации с гораздо большей степенью достоверности.

Флуоресцентный детектор. Большая популярность флуоресцентных детекторов объясняется очень высокой селективностью и чувствительностью, и тем фактором, что многие загрязнители окружающей среды флуоресцируют (например, полиароматические углеводороды).

Электрохимический детектор используются для детектирования веществ, которые легко окисляются или восстанавливаются: фенолы, меркаптаны, амины, ароматические нитро- и галогенпроизводные, альдегиды кетоны, бензидины.

Хроматографическое разделение смеси на колонке вследствие медленного продвижения ПФ занимает много времени. Для ускорения процесса хроматографирования проводят под давлением. Этот метод называют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЖХ)

Модернизация аппаратуры, применяемой в классической жидкостной колоночной хроматографии, сделала ее одним из перспективных и современных методов анализа. Высокоэффективная жидкостная хроматография является удобным способом разделения, препаративного выделения и проведения качественного и количественного анализа нелетучих термостабильных соединений как с малой, так с большой молекулярной массой.

В зависимости от типа применяемого сорбента в данном методе используют 2 варианта хроматографирования: на полярном сорбенте с использованием неполярного элюента (вариант прямой фазы) и на неполярном сорбенте с использованием полярного элюента - так называемая обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОфВЖХ).

При переходе элюента к элюенту равновесие в условиях ОфВЖХ устанавливается во много раз быстрее, чем в условиях полярных сорбентов и неводных ПФ. Вследствие этого, а также удобства работы с водными и водно-спиртовыми элюентами, ОфВЖХ получила в настоящее время большую популярность. Большинство анализов при помощи ВЖХ проводят именно этим методом.

Регистрация выхода из колонки отдельного компонента производится с помощью детектора. Для регистрации можно использовать изменение любого аналитического сигнала, идущего от подвижной фазы и связанного с природой и количеством компонента смеси. В жидкостной хроматографии используют такие аналитические сигналы, как светопоглощение или светоиспускание выходящего раствора (фотометрические и флуориметрические детекторы), показатель преломления (рефрактометрические детекторы), потенциал и электрическая проводимость (электрохимические детекторы) и др.

Непрерывно детектируемый сигнал регистрируется самописцем. Хроматограмма представляет собой зафиксированную на ленте самописца последовательность сигналов детектора, вырабатываемых при выходе из колонки отдельных компонентов смеси. В случае разделения смеси на внешней хроматограмме видны отдельные пики. Положение пика на хроматограмме используют для целей идентификации вещества, высоту или площадь пика - для целей количественного определения.

3. Применение

Наиболее широкое применение ВЭЖХ находит в следующих областях химического анализа (выделены объекты анализа, где ВЭЖХ практически не имеет конкуренции):

- Контроль качества продуктов питания — тонизирующие и вкусовые добавки, альдегиды, кетоны, витамины, сахара, красители, консерванты, гормональные препараты, антибиотики, триазиновые, карбаматные и др. пестициды, микотоксины, нитрозоамины, полициклические ароматические углеводороды и т.п.

- Охрана окружающей среды — фенолы, органические нитросоединения, моно— и полициклические ароматические углеводороды, ряд пестицидов, главные анионы и катионы.

- Криминалистика — наркотики, органические взрывчатые вещества и красители, сильнодействующие фармацевтические препараты.

- Фармацевтическая промышленность — стероидные гормоны, практически все продукты органического синтеза, антибиотики, полимерные препараты, витамины, белковые препараты.

- Медицина — перечисленные биохимические и лекарственные вещества и их метаболиты в биологических жидкостях (аминокислоты, пурины и пиримидины, стероидные гормоны, липиды) при диагностике заболеваний, определении скорости выведения лекарственных препаратов из организма с целью их индивидуальной дозировки.

- Сельское хозяйство — определение нитрата и фосфата в почвах для определения необходимого количества вносимых удобрений, определение питательной ценности кормов (аминокислоты и витамины), анализ пестицидов в почве, воде и сельхозпродукции.

- Биохимия, биоорганическая химия, геновая инженерия, биотехнология — сахара, липиды, стероиды, белки, аминокислоты, нуклеозиды и их производные, витамины, пептиды, олигонуклеотиды, порфирины и др.

- Органическая химия — все устойчивые продукты органического синтеза, красители, термолабильные соединения, нелетучие соединения;

неорганическая химия (практически все растворимые соединения в виде ионов и комплексных соединений).

- контроль качества и безопасности продуктов питания, алкогольных и безалкогольных напитков, питьевой воды, средств бытовой химии, парфюмерии на всех стадиях их производства;

- определение характера загрязнений на месте техногенной катастрофы или чрезвычайного происшествия;

- обнаружение и анализ наркотических, сильнодействующих, ядовитых и взрывчатых веществ;

- определение наличия вредных веществ (полициклические и другие ароматические углеводороды, фенолы, пестициды, органические красители, ионы тяжелых, щелочных и щелочно-земельных металлов) в жидких стоках, воздушных выбросах и твердых отходах предприятий и в живых организмах;

- мониторинг процессов органического синтеза, нефте- и углепереработки, биохимических и микробиологических производств; анализ качества почв для внесения удобрений, наличия пестицидов и гербицидов в почве, воде и в продукции, а также питательной ценности кормов; сложные исследовательские аналитические задачи; получение микроколичества сверхчистого вещества.

Заключение

Как научный метод познания окружающего нас мира хроматография постоянно развивается и совершенствуется. Сегодня она применяется столь часто и столь широко в научных исследованиях, медицине, молекулярной биологии, биохимии, технике и народном хозяйстве, что очень трудно найти область знаний, в которой бы хроматография не использовалась.

Хроматография как метод исследования с ее исключительными возможностями является мощным фактором познания и преобразования усложняющегося мира в интересах создания приемлемых условий обитания человека на нашей планете.

Список литературы

1. Горелик Д.О., Конопелько Л.А., Панков Э.Д. Экологический мониторинг. В 2 т. СПб.: Крисмас. 2000. – 260 с.
2. Столяров Б.В. и др. // Практическая газовая и жидкостная хроматография. СПб.: СПбГУ, 1998. - С. 81.
3. Гольдберг К.А., Вигдергауз М.С. Введение в газовую хроматографию. М.: Химия, 1990. – 329 с.
4. Айвазов Б.В. Введение в хроматографию. М.: Высш. шк., 1983. – 450 с.
5. «Практическая ВЭЖХ», В.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде, М.: Химия, 1986.