

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

О. М. ВЕРГУН, Н. Д. ЯРАНЦЕВА

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Практикум для студентов фармацевтического факультета



Минск БГМУ 2018

УДК 543.544(076.5)(075.8)

ББК 24.4я73

В31

Рекомендовано Научно-методическим советом университета в качестве практикума 20.12.2017 г., протокол № 4

Р е ц е н з е н т ы: канд. биол. наук, зав. химико-токсикологической лабораторией Городской клинической больницы скорой медицинской помощи Л. Н. Боровикова; канд. тех. наук, доц. каф. фармацевтической технологии Белорусского государственного медицинского университета Н. Ф. Шакуро

Вергун, О. М.

В31 Хроматографические методы анализа : практикум для студентов фармацевтического факультета / О. М. Вергун, Н. Д. Яранцева. – Минск : БГМУ, 2018. – 30 с.

ISBN 978-985-567-956-2.

Включены контрольные вопросы, основные термины и понятия; закрытые и открытые тесты для самоконтроля; рисунки, таблицы и задания по хроматографическим методам анализа.

Предназначен для студентов 2-го курса фармацевтического факультета.

УДК 543.544(076.5)(075.8)

ББК 24.4я73

ISBN 978-985-567-956-2

© Вергун О. М., Яранцева Н. Д., 2018

© УО «Белорусский государственный медицинский университет», 2018

В лабораторном практикуме по хроматографии студенты выполняют различные по цели и объектам лабораторные и зачётные работы с применением различных моделей хроматографов, приведены основные этапы выполнения лабораторных работ с использованием разных методов качественного и количественного анализа.

Темы лабораторных работ	Оценка. Подпись преподавателя
1. Физико-химические основы хроматографического разделения	
2. Газовая хроматография. Варианты метода. Теоретические основы метода. Устройство газового хроматографа	
3. Газовая хроматография. Влияние условий проведения на параметры процесса разделения. Методы приготовления хроматографических колонок. Применение метода газовой хроматографии в фармацевтическом анализе.	
4. Жидкостная хроматография. Классификация. Теоретическое описание процесса разделения.	
5. Колончатая хроматография	
6. Тонкослойная хроматография	
7. Высокоэффективная жидкостная хроматография	
8. Другие виды хроматографии.	
9. Количественный хроматографический анализ.	

Отчет по лабораторной работе должен быть составлен в рабочей тетради по плану:

1. *Название работы и дата выполнения.*
2. *Цель работы с указанием полученного задания.*
3. *Краткое описание основных этапов эксперимента.*
4. *Результаты измерений и расчеты.*
5. *Выводы.*

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Хроматография — это динамический метод разделения и определения веществ, основанный на многократном распределении компонентов между двумя фазами — подвижной и неподвижной.

Подвижной фазой может служить жидкость или газ, протекающие под давлением через слой неподвижной фазы.

Неподвижная фаза (сорбент) представляет собой твёрдое пористое вещество с развитой поверхностью или плёнку жидкости, нанесённую на поверхность твёрдого инертного носителя.

Разделение при хроматографировании начинается, когда вещество поступает в слой сорбента вместе с потоком подвижной фазы. При этом вещество сорбируется, а затем при контакте со свежими порциями подвижной фазы десорбируется. Перемещение подвижной фазы происходит непрерывно, поэтому непрерывно происходит сорбция и десорбция вещества. При этом часть вещества находится в неподвижной фазе в сорбированном состоянии, а часть — в подвижной фазе и перемещается вместе с ней. В результате скорость движения вещества оказывается меньше, чем скорость движения подвижной фазы. Чем сильнее сорбируется вещество, тем медленнее оно перемещается.

Отличия хроматографии от других методов разделения, основанных на распределении компонентов между фазами:

- сочетание термодинамического (*установление равновесия между фазами*) и кинетического (*движение компонентов с разной скоростью*) аспектов;
- многократность повторения элементарных актов (*сорбция-десорбция, осаждение-растворение, испарение-растворение, экстракция-реэкстракция*) при прохождении подвижной фазы через слой неподвижной;
- динамические условия разделения компонентов.

Эти особенности хроматографического процесса обуславливают большую эффективность хроматографического метода разделения по сравнению с одноступенчатыми методами разделения (сорбция и экстракция в статических условиях).

Выбор конкретных условий проведения хроматографического анализа определяется природой и составом анализируемого объекта.

Методы газовой хроматографии, включающие *газоадсорбционную* и *газожидкостную*, позволяют анализировать летучие термостабильные вещества с молекулярной массой меньше 400 независимо от их агрегатного состояния.

Методы жидкостной хроматографии в различных вариантах используются для анализа многокомпонентных смесей нелетучих веществ в растворах. Жидкостная хроматография применима для более широкого круга веществ, чем газовая, так как большинство соединений не обладает летучестью и термостабильностью.

Хроматографическое разделение смесей на современных анализаторах отличается высокой точностью и скоростью, обладают высокой чувствительностью: разделение нескольких компонентов можно осуществить за минуты и даже секунды.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Цель: изучить понятие хроматографии, историю развития, основные принципы разделения, способы классификации хроматографических методов анализа.

Выполнение работы:

1. Классификация хроматографических методов. Заполните:

По агрегатному состоянию фаз:			
По механизму межфазового разделения			
По способу проведения			
По способу перемещения сорбата			
По целям и задачам			

2. Изучите:

- физические явления, лежащие в основе методы. Силы Ван-дер-Ваальса;
- необходимые условия для проведения хроматографического разделения;
- влияние полярности неподвижной фазы на последовательность элюирования;
- влияние условий проведения на параметры процесса разделения: тип колонки, температура колонки, природа подвижной фазы, внутренний диаметр колонки, длина колонки, толщина пленки капиллярной колонки;
- требования к веществам, определяемым методом газовой хроматографии.

3. Запишите:

Колонка — содержит

Элюент — *подвижная фаза* —

Сорбент — *неподвижная фаза* —

Детектор — устройство

Хроматограф —

Хроматограмма —

Хроматографический пик —

Газовая хроматография — метод разделения летучих, термостабильных соединений. Этим требованиям отвечает около 5 % известных органических соединений, но именно эти соединения оставляют 70–80 % соединений, которые использует человек в производстве и быту. Подвижной фазой служит инертный газ (газ-носитель), протекающий через неподвижную фазу, имеющую большую поверхность. В качестве подвижной фазы можно использовать водород, гелий, азот, аргон и углекислый газ. Наиболее часто используют азот как более доступный и дешевый. Газ-носитель обеспечивает перенос разделяемых компонентов по хроматографической колонке и не взаимодействует ни с разделяемыми веществами, ни с неподвижной фазой.

Стабилизация и очистка газовых потоков происходит в системе подготовки газов, которая состоит из баллона с газом-носителем и блока подготовки газов. Блок подготовки газов включает регулятор давления и регулятор потока.

Дозирование и ввод пробы осуществляется с помощью микрошприца (для парообразной или жидкой пробы соответственно), дозирующей петли или автосемплера. Пробу вводят через резиновую мембрану (септу) в *испаритель* — специальное устройство для испарения пробы (температура испарителя должна быть 10–15 °С). Затем потоком газа-носителя проба переносится в *колонку*, которая помещена в термостат.

При введении пробы должны соблюдаться следующие условия:

- минимальный водимый объем;
- проба не должна быть направлена навстречу потока газа-носителя и исказить характеристики потока;
- воспроизводимость пробы с большой степенью точности;
- испарение без разложения;
- смеси компонентов должны вводиться и испаряться без изменения состава;
- количество вещества в пробе должно быть намного меньше емкости колонки.

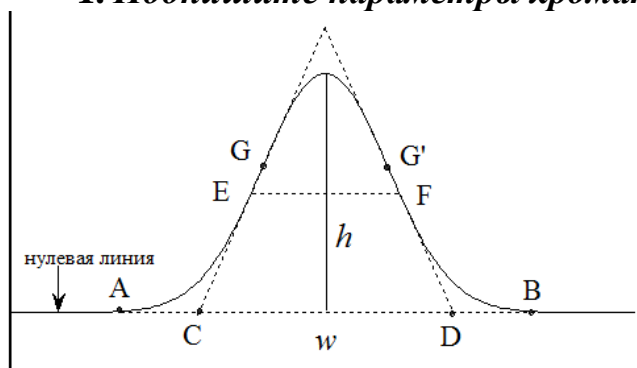
Система детектирования состоит из *детектора* с блоком питания, усилителя сигнала детектора и регистрирующего устройства (самописец, компьютер). Испаритель и детектор, как и колонку, термостатируют. В газовой хроматографии используют насадочные, капиллярные колонки. В газовой хроматографии используют широкий круг детекторов, которые можно подразделить на интегральные и дифференциальные. *Интегральные детекторы* регистрируют изменение во времени суммарного количества всех компонентов, *дифференциальные* — измеряют мгновенную концентрацию компонентов. Дифференциальные детекторы в свою очередь подразделяют на концентрационные и потоковые. В *концентрационном детекторе* сигнал определяется текущей концентрацией в ячейке и многократно регистрируется, зависит от скорости потока. Детектор такого типа — катарометр. *Потоковый детектор* регистрирует сигнал однократно, сигнал определяется мгновенным значением концентрации, не зависит от скорости потока. Пример такого детектора — пламенно-ионизационный детектор.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. ВАРИАНТЫ МЕТОДА. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА. УСТРОЙСТВО ГАЗОВОГО ХРОМАТОГРАФА

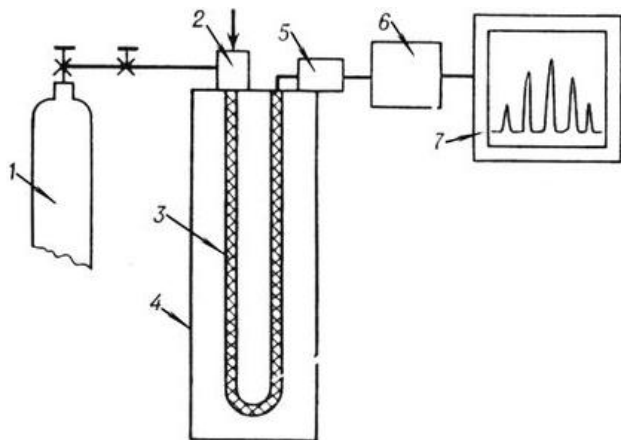
Цель: приобретение знаний, связанных: 1) с вариантами метода ГХ; 2) теоретическими основами метода; 3) устройством газового хроматографа;

Выполнение работы:

1. Подпишите параметры хроматографического пика, рассчитайте площадь пика:



2. Подпишите основные узлы газового хроматографа



3. Решите задачу по расчету теоретических тарелок (стр. 23–24 приложения № 1 к занятию 2).

Порядок работы на газовом хроматографе:

1. Редуктором высокого давления на баллоне с газом установите давление на выходе из баллона 3–5 МПа. Проверьте целостность прокладок испарителя.

2. Проверьте газовую схему прибора на герметичность и проверьте герметичность мест соединений мыльной пеной. Если пузыри не образуются в течение 10–15 мин, система герметична. Установите необходимые расходы газа-носителя с газового редуктора на баллоне. (Из-за медленной реакции регуляторов расходов газа-носителя процесс настройки довольно длительный).

3. Включите тумблер «Сеть» на блоке анализатора и на всех других блоках хроматографа (должны загореться сигнальные лампочки и включиться вентилятор циркуляции воздуха, что определяется по характерному шуму).

4. Установите выбранные значения температуры термостата и испарителя (через программное обеспечение).

5. В приборах «Цвет» при использовании пламенно-ионизационного детектора пламя необходимо поджечь вручную, с помощью специального приспособления.

6. Прибор можно считать вышедшим на режим, если дрейф и флуктуации нулевой линии не будет превышать 1 % шкалы регистратора (прибор выходит на стабильный режим работы примерно через 60 мин). После выхода прибора на режим можно приступать к выполнению анализа. В хроматограф можно вводить подготовленные газообразные и жидкие пробы с помощью соответствующего шприца через испаритель, газообразные пробы вводятся также с помощью крана-дозатора или автосемплера.

Для анализа жидкой пробы промывают несколько раз микрошприц анализируемой смесью, отбирают необходимый объем смеси, а затем вводят иглу шприца через резиновую прокладку в испаритель на максимально возможную глубину. Проба быстро выдавливается поршнем. При дозировании надо придерживать иглу пальцами, а усилие направлять строго по оси микрошприца. Несоблюдение этих условий ведет к деформации и поломке поршня. Микрошприц нельзя применять для дозирования жидкостей, содержащих механические примеси. Не забывайте промывать микрошприцы подходящими растворителями и просушивать с последующим охлаждением перед каждым очередным впуском анализируемого образца. Пренебрежение этими процедурами может привести к значительному искажению результатов анализа.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ НА ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА РАЗДЕЛЕНИЯ. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КОЛОНОК. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Цель работы: провести анализ вещества методом газовой хроматографии, изучить состав и примеси. Изучить методы качественного и количественного анализа.

Оборудование: газовый хроматограф с принадлежностями, описание к нему, технические руководства.

Выполнение работы:

1. Подготовка прибора к работе (включение, настройка).
2. Подготовка образца (стр. 25 приложения № 2 к занятию 3).
3. Качественное исследование (параметры удерживания).
4. Влияние температуры и давления на время выхода веществ. Заполнить таблицу, сформулировать выводы.

Таблица влияния параметров удерживания от температуры и давления

Вещество	Начальная температура колонки -°С		Повешение температуры на 10 °С	
	Время удерживания	Площадь пика	Время удерживания	Площадь пика

Выводы:

Разделение и обнаружение катионов методом бумажной хроматографии

Метод хроматографического разделения катионов основан на различном сродстве катионов к подвижной и неподвижной фазе. Метод бумажной хроматографии является разновидностью распределительной хроматографии. Неподвижной фазой является вода, удерживаемая хроматографической бумагой. Бумага является *носителем* неподвижной фазы. В качестве подвижной фазы используется смесь соляной кислоты с ацетоном (**8 % конц. HCl, 5 % воды, 87 % ацетона**). Во время проведения хроматографического процесса подвижная фаза движется вдоль бумаги и происходит распределение катионов, нанесенных на бумагу, между подвижной фазой и водой, содержащейся в хроматографической бумаге. В результате чего катионы, характеризующиеся большим сродством к подвижной фазе, быстрее движутся вдоль бумаги, нежели катионы, характеризующиеся большим сродством к воде и дольше удерживаемые ею.

Для оценки хроматографического поведения веществ в определенных условиях используют величину подвижности R_f , которая равна отношению расстояния l , пройденного веществом, к расстоянию, пройденному растворителем, L :

$$R_f = \frac{l}{L}. \quad (1)$$

Для используемой системы фаз подвижности катионов (R_f) имеют следующие значения:

Катион	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Al ³⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Bi ³⁺	Fe ³⁺
R_f	0,02	0,13	0,15	0,25	0,54	0,70	0,77	0,94	1,00	1,00	1,00

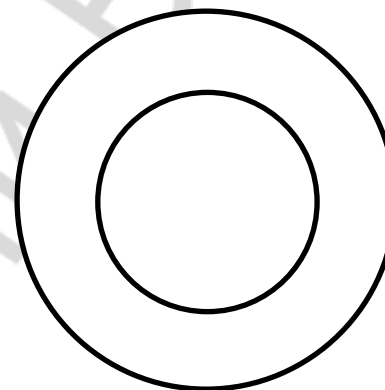
Значения подвижностей могут изменяться с изменением свойств бумаги, а также в зависимости от температуры проведения процесса, поэтому следует определить величины R_f экспериментально. Для этого на полоску бумаги наносится капля раствора хлорида исследуемого металла (1–1,5 см от нижнего края), простым карандашом отмечается стартовая линия (на уровне центра нанесенной капли), после чего пятно высушивается. Раствор наносится в то же место и высушивается 2–3 раза, причем, нанося раствор капилляром на бумагу, не следует капать раствор, а лишь слегка прикасаться кончиком капилляра к бумаге. Это позволит получить пятно небольшого диаметра (2–3 мм), а, значит, и получить более четкую хроматограмму. Высушенная бумага помещается в хроматографическую камеру (стеклянную емкость с крышкой), содержащую подвижную фазу. Бумага закрепляется в верхней части емкости таким образом, чтобы нижний ее край погружался в растворитель не более чем на 0,5 см и не касался стенок камеры. Время хроматографирования обычно составляет 1–1,5 ч. Процесс прекращается после того, как растворитель пройдет от линии старта не менее 10 см. После этого отмечают положение фронта растворителя и бумагу высушивают.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. КЛАССИФИКАЦИЯ. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕССА РАЗДЕЛЕНИЯ. ПЛОСКОСТНАЯ БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Обнаружение катионов Cu^{2+} и Zn^{2+}

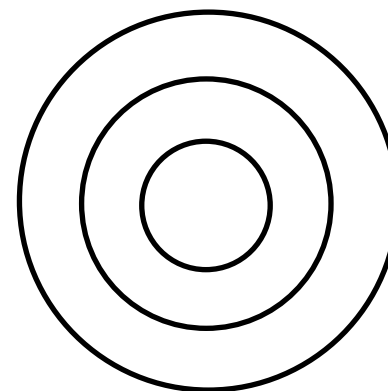
В пробирку вносят 2–3 капли раствора соли меди и 4–5 капель раствора соли цинка. На бумагу, пропитанную 5%-ным раствором тиомочевины, помещают 1 каплю приготовленной смеси растворов солей и через некоторое время, когда раствор впитается, в центр пятна помещают 1–2 капли воды (**какую роль в данном случае выполняет вода?*). Хроматограмму проявляют 0,5%-ным раствором дитизона в хлороформе. В центре образуется грязно-фиолетовое пятно, соответствующее ионам меди, ионы цинка образуют розовую зону на периферии.

Зарисуйте полученные результаты



Обнаружение катионов Cd^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+}

В пробирку вносят по 2–3 капли растворов солей цинка, кадмия и никеля. На бумагу, пропитанную 5%-ным раствором тиомочевины, помещают 1 каплю приготовленной смеси растворов солей, смачивают 1–2 каплями воды. Хроматограмму проявляют 0,5%-ным раствором дитизона в хлороформе. В центре образуется оранжевая зона, соответствующая ионам кадмия. Находящаяся на периферии серая зона соответствует ионам никеля. Красная зона, находящаяся в середине, соответствует ионам цинка.



Жидкостная хроматография (ЖХ) — метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкостной хроматографии выполняет двоякую функцию: 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии); 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируется на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. В ЖХ природа подвижной фазы имеет существенно большее значение. В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа различных по составу подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого числа встречающихся на практике задач. Метод ЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие вещества неустойчивы при высоких температурах. В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре. ЖХ подразделяется на варианты в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий:

- в ситовой хроматографии разделение компонентов осуществляется за счет разницы в растворимости молекул при их прохождении (фильтрации) через слой сорбента;
- в адсорбционной хроматографии — за счет разницы в адсорбируемости молекул, проходящих через слой частиц сорбента, покрытых неподвижной фазой в виде тонкого слоя или поверхностнопривитых радикальных групп;
- в ионообменной и ионной хроматографии — за счет разницы в способности к обмену ионами с ионообменниками.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕЕ ХАРАКТЕРИСТИК. ВЫПОЛНЕНИЕ АДСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПО МЕТОДУ ЦВЕТА

Цель работы: изучить метод колоночной хроматографии.

Оборудование и реактивы:

- | | | | |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|
| 1) фарфоровая ступка с пестиком; | 4) стеклянная воронка; | 7) вата; | 10) петролейный эфир; |
| 2) хроматографическая колонка; | 5) фильтровальная бумага; | 8) зеленые листья; | 11) крахмал; |
| 3) пробирки; | 6) пипетка; | 9) этиловый спирт; | 12) оксид алюминия. |

Выполнение работы:

Подготовка образца листьев. Растереть в ступке навеску (2 грамма) высушенных зеленых листьев (лучше всего крапивы). В пробирку перенести измельченные листья, прибавить 3 мл этилового спирта и оставить, периодически встряхивая, на 5 минут. Затем в пробирку добавить 10 мл петролейного эфира. После встряхивания раствор принимает темно-зеленую окраску. Прилить в пробирку 20 мл дистиллированной воды. Всплывший петролейный слой снять пипеткой и слить в чистую пробирку, снова промыть его водой для удаления спирта.

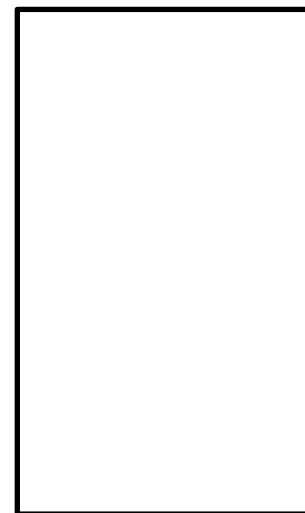
Подготовка колонки. На дно хроматографической колонки поместить ватный тампон толщиной около 0,5 см. Заполнить ее сухим крахмалом, внося его с небольшими порциями и уплотняя легким постукиванием колонки о стол. Колонка должна быть равномерно без пустот заполнена и закреплена в вертикальном положении.

Ход работы. 8–10 капель экстракта внести пипеткой в верхнюю часть колонки, стараясь, чтобы туда не попала вода. При перемещении экстракта вдоль колонки происходит его разделение на адсорбционные слои (первичная хроматограмма). Хроматограмму проявляют, добавляя сверху петролейный эфир, который увлекает с собой разделяемые вещества по степени их адсорбируемости.

Примечание: Основные пигменты зеленого листа должны располагаться сверху вниз в виде окрашенных зон: 1 — желтая (ксантофилл β), 2 — желто-зеленая (хлорофиллин β), 3 — зелено-синяя (хлорофиллин α), 4 — желтая (ксантофилл), 5 — желтая (ксантофилл α'), 6 — желтая (ксантофилл α), 7 — красная (каротин). Ксантофиллы слабо адсорбируются, а каротин на крахмале вообще не адсорбируется. Для получения зоны адсорбции каротина в нижнюю часть колонки на ватный тампон помещают небольшой слой прокаленного оксида алюминия.

После выполнения работы оформить отчет и ответить на контрольные вопросы.

Зарисуйте и обозначьте зоны адсорбции для отдельных пигментов хлорофилла, различимые на полученной хроматограмме.



Контрольные вопросы

Что собой представляет хлорофилл?

Неподвижная фаза —

Подвижная фаза —

Тонкослойная хроматография (ТСХ) является одним из наиболее простых и эффективных экспресс-методов разделения и анализа веществ в пищевых продуктах, биологических жидкостях и других объектах, не требующих сложного оборудования. В то же время метод обладает высокой избирательностью и чувствительностью (низким пределом обнаружения). Этим методом можно определить 10–20 мкг вещества с точностью до 5–7 %.

В зависимости от природы неподвижной фазы (НФ) тонкослойная хроматография может быть адсорбционной и распределительной. Наиболее широко применим в ТСХ первый вариант разделения.

Неподвижная твердая фаза (оксид алюминия, силикагель и др.) тонким слоем наносится на стеклянную, металлическую (алюминиевая фольга) или пластмассовую пластинку, закрепляется слой с помощью крахмала или гипса (иногда используют пластинки с незакрепленным слоем). Для хроматографирования могут использоваться готовые пластинки, выпускаемые промышленностью, размером 5×5 или 20×20 см.

На расстоянии 2 см от края пластинки на стартовую линию с помощью микропипетки или микрошприца наносят пробы анализируемого раствора (диаметр пятен 3–5 мм). После испарения растворителя край пластинки помещают в стеклянную камеру, на дно которой налит растворитель подвижная фаза (ПФ) в количестве, достаточном для образования слоя глубиной 0,5 см. Камеру закрывают крышкой.

Выбор растворителя (ПФ) зависит от природы сорбента и свойств анализируемых соединений. Например, разделение хлорорганических пестицидов на пластинке с силикагелем проводят в среде гексана. Часто применяют смеси растворителей из двух или трех компонентов. Так, при хроматографировании аминокислот используют смесь *n*-бутанола с уксусной кислотой и водой, при анализе неорганических ионов — водные буферные растворы, создающие постоянное значение pH.

При хроматографировании растворитель движется снизу вверх (восходящий вариант) вдоль слоя сорбента и с разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их пространственному разделению. После окончания хроматографического процесса пластинку вынимают из камеры, отмечают линию фронта растворителя (обычно « 10 см) и высушивают.

Если компоненты смеси окрашены, то они четко видны на пластине после разделения. Неокрашенные соединения обнаруживают различными способами. Если пластину поместить в камеру с парами йода, то четко проявляются коричневые пятна для органических соединений с неопредельными связями. Хроматограмму можно проявить, опрыскивая ее каким-либо реагентом, дающим с компонентами пробы окрашенные соединения. В состав нанесенного слоя в готовые пластины часто вводят люминофор. При облучении такой пластины ультрафиолетовым (УФ) светом она флуоресцирует, а разделенные компоненты пробы видны в виде темных пятен. Вещества, имеющие собственную флуоресценцию, также обнаруживают в УФ-свете (например, пестициды).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. АНАЛИЗ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ

Цель работы: изучение метода тонкослойной хроматографии и качественного анализа смеси аминокислот.

Реактивы:

1. Кислота глютаминовая, 0,1 % раствор в этаноле.
2. Нингидрин, 0,2 % раствор в н-бутаноле.
3. Н-бутанол.
4. Кислота уксусная концентрированная.
5. Этанол 96 %.
6. Йод

Выполнение работы:

1. Подготовка хроматографической пластинки с тонким слоем из силикагеля: разделяют смесь аминокислот проводят на пластинках с тонким слоем из силикагеля размером 30 × 50 мм. Мягким карандашом, стараясь не повредить слой сорбента, намечают линии «фитиля», старта и финиша на расстоянии 5, 10 и 45 мм от края пластинки соответственно.

2. Приготовление подвижной фазы и хроматографической камеры: в мерном цилиндре смешивают 4 мл этанола, 1 мл концентрированной уксусной кислоты и 1 мл н-бутанола. Смесь перемешивают. В камеру для тонкослойной хроматографии помещают подвижную фазу и закрывают крышкой. Насыщение камеры 10–15 мин.

3. Нанесение анализируемых веществ: стеклянными капиллярами, стараясь не повредить слой сорбента, на линию старта наносят на равном расстоянии (1 см друг от друга и от краев пластинки) растворы глютаминовой кислоты и контрольной смеси. Диаметр пятен проб не должен превышать 2–3 мм. Удаляют растворитель, подсушивая пластинку на воздухе около 5 мин.

4. Элюирование: пластинку с пробами веществ помещают в камеру. Уровень подвижной фазы в камере — около 2–3 мм. Пластинку вынимают из камеры после достижения ПФ линии финиша и подсушивают на воздухе (под тягой!).

5. Обнаружение хроматографических зон: проводят опрыскивание пластинки раствором нингидрина. Пластинку держат за отогнутый уголок пинцетом, после чего ее вновь подсушивают на воздухе, а затем помещают на слой асбеста, осторожно подогревая с помощью горелки (**Осторожно! Не обугливать крахмал!**) до появления цветных пятен.

6. Обработка хроматограммы: вычисляют значение R_f для всех обнаруженных хроматографических зон.

7. Запись результатов анализа проводят в соответствии с рекомендациями преподавателя.

8. Вывод.

Вывод о составе делают на основе анализа величин R_f хроматографических зон «свидетелей» и контрольной задачи.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

В зависимости от природы подвижной (ПФ) и неподвижной (НФ) фазы различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографию.

В нормально-фазовой ВЭЖХ неподвижная фаза — полярная (чаще всего силикагель), а ПФ — неполярная (гексан либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями — хлороформом, спиртами и т. д.). Удерживание веществ растет с увеличением их полярности. Разделения компонентов достигают, меняя элюирующую силу подвижной фазы, которая зависит от энергии взаимодействия компонентов ПФ с поверхностью НФ. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность ПФ увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза — неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами С8, С18); ПФ — полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Наименьшей элюирующей способностью обладает вода, а для повышения элюирующей способности в ПФ вводят ацетонитрил, метанол и другие растворители. Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.

Подвижная фаза, прежде всего, должна растворять разделяемые компоненты. Основными характеристиками подвижных фаз являются ее элюирующая способность и селективность. Элюирующая способность подвижной фазы — это ее способность вступать в межмолекулярные взаимодействия с разделяемыми соединениями и группами на поверхности сорбента. Эти взаимодействия способствуют десорбции разделяемых соединений, более быстрому перемещению хроматографических зон. Селективность подвижных фаз связана с их способностью к специфическим взаимодействиям с сорбатами, определяемыми их структурными признаками. Селективность, как и элюирующая способность, определяется в первую очередь природой более сильного компонента смеси.

Обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) имеет ряд преимуществ перед другими вариантами жидкостной хроматографии:

- это очень гибкий метод, так как, изменяя состав водно-органических смесей, используемых в качестве подвижной фазы, можно на одной колонке обеспечить разделение соединений различной природы;
- селективность данного метода почти всегда значительно выше, чем других вариантов хроматографии для всех соединений, кроме сильнополярных
- при использовании гидрофобизированных силикагелей быстро устанавливается равновесие между подвижной и неподвижной фазой, эти сорбенты отличаются высокой эффективностью разделения;
- можно осуществлять разделение соединений, растворимых как в воде, так и в органических растворителях;
- возможность использования в подвижной фазе буферных растворов может улучшить селективность и эффективность разделения ионогенных соединений.

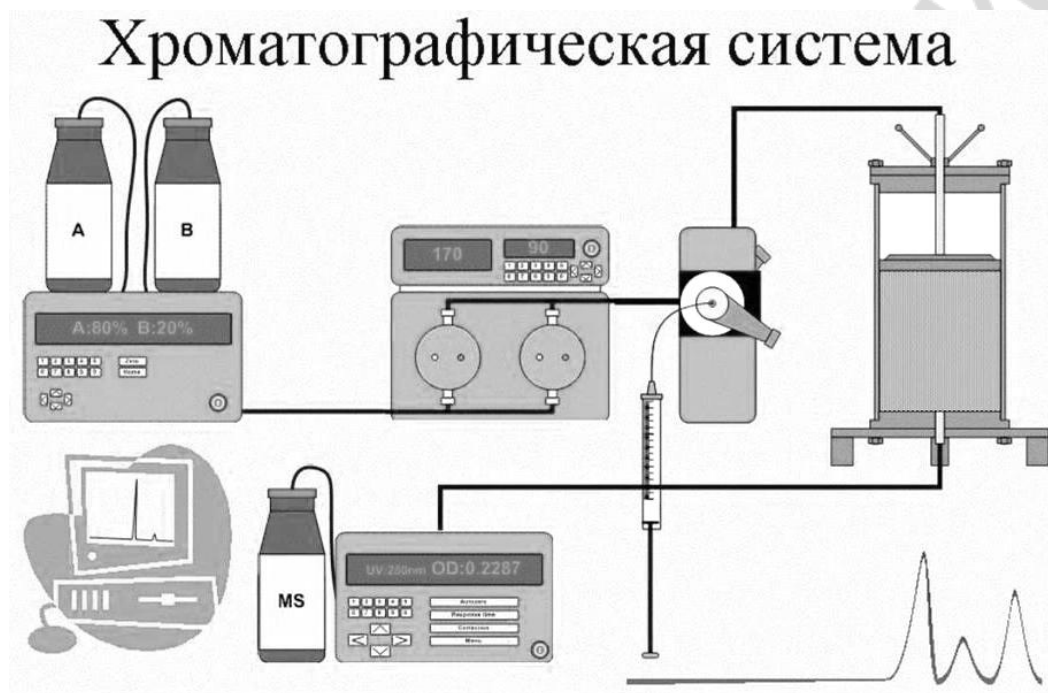
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Цель работы: освоение методики хроматографического анализа лекарственных образцов, содержащих кофеин.

Оборудование: жидкостной хроматограф, образцы кофеина для калибровки прибора и образцы лекарственных образцов для анализа.

Выполнение работы:

1. Приготовить подвижную фазу: вода – ацетонитрил (60 : 40) (профильтировать!).
2. Заполнить систему (подготовить промывочный раствор (бидистиллированная вода), контроль слива).
3. Подготовить образцы кофеина (различной концентрации).
4. Провести хроматографирование. Скорость подачи подвижной фазы — 1,0 мл/мин.
5. Подпишите блоки анализатора ВЭЖХ.



ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. ДРУГИЕ ВИДЫ ХРОМАТОГРАФИИ

Идентификация кофеина с помощью хроматомасс-спектрометрии методом метки.

Первый вариант метода основан на том, что в одинаковых условиях экспериментально определяют времена удерживания эталонных (метка) и анализируемых веществ и сравнивают их (если расход газа-носителя неодинаков, то используют приведённые параметры удерживания). Равенство параметров удерживания позволяет идентифицировать вещество.

Второй вариант метода метки заключается в том, что в анализируемую смесь вводят эталонный компонент (метка), присутствие которого в смеси предполагается. Увеличение высоты соответствующего пика по сравнению с высотой пика до введения добавки свидетельствует о наличии этого соединения в смеси.

Цель работы: освоение методики хроматомасс-спектрометрического анализа.

Оборудование: газовый хроматограф с хроматомасс-спектрометрическим детектированием, образцы кофеина.

Выполнение работы:

1. Включить оборудование, загрузить метод. Ввести образцы в хроматограф.

2. Расчет неизвестного компонента по индексам Ковача:

Неизвестное вещество: Время удерживания: 13.32 МФ 956

Время удерживания	МФ	Вещество	
4.44	956	Ундекан	C11
5.63	962	Додекан	C12
6.85	957	Тридекан	C13
8.05	955	Тетрадекан	C14
9.21	898	Пентадекан	C15
10.31	931	Гексадекан	C16
11.35	933	Гептадекан	C17
12.35	959	Октадекан	C18
12.92	975	КОФЕИН	
13.29	917	Нонадекан	C19
14.18	945	Эйкозан	C20
13.32			
15.01	944	Генэйкозан	C21

$$I_x = 100 \times Z + \frac{t_x - t_z}{t_{z+1} - t_z} =$$

где I_x — индекс удерживания;

z — число атомов углерода алкана;

t_x — время удерживания искомого вещества

t_z — время удерживания n -алкана до искомого вещества

t_{z+1} — время удерживания n -алкана после искомого вещества

3. Определить вещество по индексу удерживания (стр. 26 приложения 3).

4. Впишите результат в таблицу.

Метод абсолютной калибровки. Сущность метода заключается в том, что в хроматографическую колонку вводят известные количества стандартного вещества и определяют площади пиков. По полученным данным строят калибровочный график. Затем хроматографируют анализируемую смесь и по графику определяют содержание данного компонента.

Если график линеен, то можно также рассчитать результаты анализа с использованием **абсолютных калибровочных коэффициентов**. Для расчёта этих коэффициентов определяют площади пиков не менее 10 стандартных смесей с различным содержанием данного вещества i . Затем используют формулу: $k_i = \omega_i q / (S \cdot 100)$, где k_i — абсолютный поправочный коэффициент i -го вещества; ω_i — содержание i -го компонента в стандартной смеси (%); S — площадь пика; q — величина пробы (объём, см³ — для газов, мкл — для жидкостей или масса, мкг — для жидкостей и твёрдых веществ).

Полученные таким образом коэффициенты усредняют. Затем проводят анализ исследуемой смеси и рассчитывают результат по формуле: $\omega_i = k_i \cdot S \cdot 100 / q$, где k_i — абсолютный поправочный коэффициент i -го вещества; S — площадь пика; q — величина пробы.

Метод абсолютной градуировки довольно прост, но необходимыми условиями применения его являются точность и воспроизводимость дозирования пробы, строгое соблюдение постоянства параметров режима хроматографирования при градуировке прибора и при определении содержания хроматографируемого вещества.

Метод внутренней нормализации. Сущность метода заключается в том, что сумму площадей пиков всех компонентов смеси принимают за 100 %. Необходимым условием применения метода является регистрация всех компонентов (на хроматограмме присутствуют разделённые пики всех компонентов смеси). Концентрацию i -го компонента рассчитывают по формуле:

$$w_i = k_i \cdot S_i \cdot 100 / \sum(k_i \cdot S_i).$$

При расчёте поправочных коэффициентов по формуле для данного метода в качестве стандарта может быть выбрано одно из соединений, входящее в состав исследуемой смеси. *Калибровочный коэффициент для стандартного вещества приравнивается к 1.*

Метод внутреннего стандарта. Сущность метода заключается в том, что в анализируемую смесь вводят определённое количество стандартного вещества (вещества сравнения). Содержание i -го компонента анализируемой смеси вычисляют по формуле: $w_i = k_i \cdot S_i \cdot 100 \cdot r / S_{ct}$, где k_i — относительный поправочный коэффициент i -го компонента, рассчитанный по формуле (выше); S_i и S_{ct} — площади пиков i -го компонента и внутреннего стандарта; r — отношение массы внутреннего стандарта к массе анализируемой смеси (без стандарта): $r = m_{ct} / m_{смеси}$.

Требования к веществу, используемому в качестве внутреннего стандарта: оно не должно входить в состав исследуемой смеси; оно должно быть инертным по отношению к компонентам анализируемой смеси и полностью смешиваться с ними; пик стандарта должен быть хорошо разрешённым и располагаться в непосредственной близости от пиков определяемых соединений.

Внутренний стандарт выбирается из числа соединений, близких по структуре и физико-химическим свойствам к компонентам анализируемой смеси. **Относительные поправочные коэффициенты компонентов смеси определяются по отношению к внутреннему стандарту.** Метод применяется как при условии регистрации на хроматограмме всех компонентов анализируемой смеси, так и в случае не полностью идентифицированных смесей. Основная трудность заключается в выборе и точной дозировке стандартного вещества.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Цель работы — провести идентификацию компонентов анализируемой смеси с использованием метода метки, затем провести количественный анализ смеси методом внутренней нормализации.

Сущность метода заключается в том, что сумму площадей пиков всех компонентов смеси принимают за 100 %.

Необходимым условием применения метода является регистрация всех компонентов (*на хроматограмме присутствуют разделённые пики всех компонентов смеси*).

Основные этапы работы:

1. Получить у лаборантов стандартную смесь веществ с известным количественным составом и узнать у преподавателя содержание каждого из веществ в смеси и порядок их выхода из колонки. Данные занести в таблицу: № пика, вещество ω , мас. %.

2. Провести хроматографирование пробы стандартной смеси не менее 3 раз, записать времена удерживания и площади пиков в таблицу:

Вещество ω , мас. %	Хроматограмма № 1		Хроматограмма № 2		Хроматограмма № 3	
	tR	S	tR	S	tR	S

3. Выбрать стандарт — любой компонент, пик которого хорошо разрешён и находится в средней части хроматограммы. Принять для него $k = 1$. Затем рассчитать относительные поправочные коэффициенты остальных компонентов смеси по формуле: $k_i = (\omega_i/\omega_{ст}) / (S_i/S_{ст})$, где ω_i — содержание i -го компонента в калибровочной смеси, %; $\omega_{ст}$ — содержание компонента, выбранного в качестве стандарта, %; S_i — площадь пика i -го компонента; $S_{ст}$ — площадь пика компонента, выбранного в качестве стандарта. Усреднить полученные значения коэффициентов.

Сопоставление площадей или высот хроматографических пиков позволяет оценить количественный состав смеси.

Концентрацию i -го компонента рассчитывают по формуле: $C_i = k_i \cdot S_i \cdot 100 / \Sigma(k_i \cdot S_i)$.

Выводы: концентрация веществ в смеси составляет: $C_1 = (tR_1 - \quad)$; $C_2 = (tR_2 - \quad)$; $C_3 = (tR_3 - \quad)$

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ, СДАЧИ ДОПУСКА И ЗАЧЕТА ПО ДИСЦИПЛИНЕ «ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ»

1. Определение хроматографии. Место хроматографии среди других процессов разделения веществ. Объекты хроматографического исследования.
2. Хроматограмма; подвижная фаза; неподвижная фаза; элюент; газ носитель; сорбент; колонка; время удерживания; объем удерживания; исправленное время удерживания; исправленный объем удерживания; адсорбция.
3. Понятия: коэффициент распределения; «мертвое» время; «мертвый» объем; фактор удерживания; фактор разделения; коэффициент емкости; эффективность, выраженная числом теоретических тарелок; высота, эквивалентная теоретической тарелке; разрешение.
4. Классификация хроматографических методов по цели; по агрегатному состоянию фаз; по характеру взаимодействий разделяемых соединений с неподвижной фазой; по способу проведения; по способу получения хроматограмм.
5. Распределение вещества между двумя фазами. Тарелочная теория. Параметры, описывающие хроматографический процесс. Динамическая теория.
6. Основные характеристики хроматографического пика. Ширина пика у основания. Ширина пика на половине высоты. Высота пика. Площадь пика. Стандартное отклонение и ширина пика.
7. Время и объем удерживания компонента. «Мертвое» время и объем. Исправленное время и объем удерживания компонента. Фактор удерживания. Фактор разделения (селективность). Число теоретических тарелок (эффективность). Разрешение.
8. Газо-адсорбционная хроматография. Газо-жидкостная хроматография. Физические явления, лежащие в основе методов. Силы Ван-дер-Ваальса. Подвижная и неподвижная фаза в газовой хроматографии.
9. Инжектор и особенности ввода пробы. Автосэмплер. Виды хроматографических колонок. Неподвижные фазы, используемые в колонках газовой хроматографии. Влияние полярности неподвижной фазы на последовательность элюирования. Обоснование выбора газа-носителя.
10. Детекторы, используемые в газовой хроматографии (детектор по теплопроводности, пламенно-ионизационный детектор, детектор электронного захвата, ионизационно-резонансный детектор, термоионный детектор).
11. Требования к веществам, определяемым методом газовой хроматографии. Качественный анализ лекарственных веществ (идентификация). Количественный анализ лекарственных веществ.

12. Теоретическое описание процесса разделения. Плоскостная хроматография: бумажная, тонкослойная. Двухмерная тонкослойная хроматография. Высокоэффективная тонкослойная хроматография. Пластинки для тонкослойной хроматографии. Качественный и количественный анализ. Применение в фармацевтическом анализе.
13. Колоночная хроматография. Нормально-фазовая и обращенно-фазовая хроматография. Параметры удерживания разделяемых соединений. Эффективность, селективность и разрешение хроматографической колонки. Сорбенты жидкостной адсорбционной хроматографии. Подвижная фаза. Требования к растворителям.
14. Теоретические основы и особенности метода Высокоэффективной жидкостной хроматографии. Эффективность метода. Устройство хроматографа. Особенности хроматографических колонок. Сорбенты высокоэффективной жидкостной хроматографии.
15. Детекторы (фотометрические детекторы, рефрактометрические детекторы, детектор по диэлектрической проницаемости, детекторы по электропроводности, флуориметрический детектор, детектор по теплоте сорбции, электрохимические детекторы, детекторы транспортного типа). Применение в фармацевтическом анализе.
16. Распределительная (жидко-жидкостная хроматография), ионообменная хроматография. Эксклюзионная хроматография. Аффинная хроматография. Сверхкритическая флюидная хроматография.
17. Методы количественного анализа в хроматографии. Метод градуировки. Метод нормализации. Метод внутреннего стандарта. Метод внешнего стандарта.
18. Достоверность результатов и источники погрешностей в хроматографии. Воспроизводимость метода.
19. Сочетание хроматографического разделения с другими аналитическими методами
20. ИК-Фурье спектроскопия. Масс-спектрометрия.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 к занятию № 2 Абсолютные параметры удерживания

Эти параметры могут быть использованы для идентификации соединений (качественный анализ) только при проведении анализа в строго определённых условиях. Каждый пик на хроматограмме характеризуется тремя основными параметрами:

1. **Время удерживания (t_R)** — это время от момента ввода анализируемой пробы до момента регистрации максимума хроматографического пика. Оно зависит от природы вещества и является качественной характеристикой.

2. **Ширина пика у основания (ω)** — равна основанию треугольника, образованного касательными к правой и левой ветвям пика.

3. **Высота (h) или площадь (S) пика.** Высота и площадь пика зависят от количества исследуемого вещества и являются количественными характеристиками.

$$S = \frac{1}{2} \omega \times h. \quad (1)$$

Время удерживания (t_R) складывается из двух составляющих — времени пребывания веществ в подвижной фазе (t_m) и времени пребывания в неподвижной фазе (t_s). Значение t_m («мёртвое время») фактически равно времени прохождения через ту же колонку подвижной фазы или несорбируемого вещества.

$$t_R = t_m + t_s. \quad (2)$$

С параметром t_R связан индекс удерживания R : $R = t_m/t_R$. (3)

Оценка эффективности хроматографического разделения

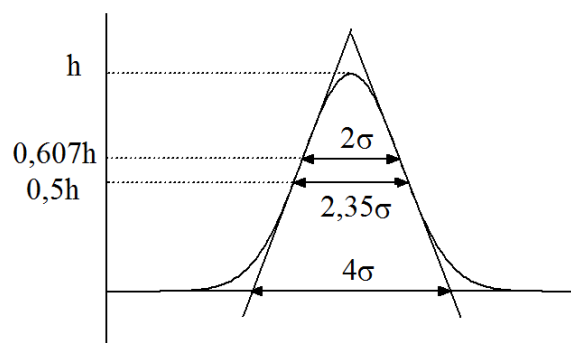
Разделение двух соседних пиков характеризуется **разрешением (R_s)**. Полнота разрешения и правильность определения зависят от того, насколько пики отделены друг от друга. Пики не должны перекрываться, в то же время расстояние между ними не должно быть большим, так как это неоправданно замедляет анализ.

Разрешение рассчитывают по параметрам хроматографических пиков, используя выражение:

$$R_s = (t_{R_1} - t_{R_2})^2 / (\omega_1 + \omega_2). \quad (4)$$



Рис. 1. Схема разрешения двух пиков



При $R_s = 0,75$ (рис. 1, а) разделение практически не произошло; при $R_s = 1,0$ (рис. 1, б) произошло частичное разделение; при $R_s = 1,5$ (рис. 1, в) можно считать, что оба вещества разделены полностью.

Значение $R_s = 1,5$ является оптимальным только для симметричных пиков. Если пики асимметричны (имеют фронт или хвост), то оптимальное значение R_s будет больше.

Если пик представляет собой кривую нормального распределения, то ширина пика у основания равна 4σ , на половине высоты — $2,35\sigma$, на 60,7 % высоты (между точками перегиба) — 2σ и т.д. При измерении ширины пика у основания коэффициент k_x будет равен $16 (4^2)$, на половине высоты — $5,54 (2,35^2)$.

По хроматограмме можно оценить также эффективность хроматографической колонки. Количественно она выражается числом теоретических тарелок (N) или высотой, эквивалентной теоретической тарелке (H). Число теоретических тарелок и ВЭТТ связаны соотношением,

$$H = L / N, \quad (5)$$

где L — длина колонки.

Из экспериментальных данных рассчитывают N по формуле:

$$N = 16(tR / \omega)^2. \quad (6)$$

Значения времени удерживания (tR) и ширины пика (ω) должны быть выражены в одних единицах: либо времени, либо длины.

ЗАДАЧИ для расчета количества теоретических тарелок

1. Рассчитайте число теоретических тарелок (N) и высоту, эквивалентную теоретической тарелке (H), по следующим данным хроматографирования: $tR = 100$ мм, $L = 150$ см, $\omega = 25$ мм.
2. Рассчитайте число теоретических тарелок (N) и высоту, эквивалентную теоретической тарелке (H), по следующим данным хроматографирования: $t_0 = 0,3$ см; $tR = 120$ см, $L = 80$ см, $\omega_{1/2} = 12$ мм.
3. Найдите число теоретических тарелок (N) в колонке длиной 2 м, если при $tR = 25$ мин пик имеет ширину 40 с. Рассчитайте значение H .

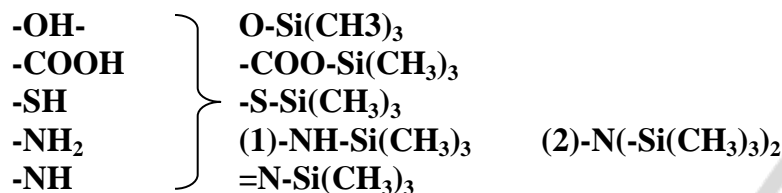
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 к занятию № 3 Реакционная газовая хроматография

В реакционной газовой хроматографии (РГХ) используются направленные химические превращения нелетучих соединений в летучие, а также неустойчивых в устойчивые. Используются несколько вариантов РГХ:

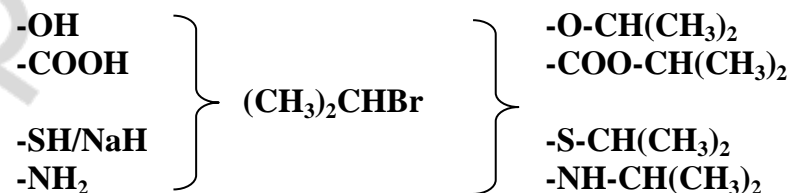
- химическое образование производных;
- пиролитическая РГХ (исследуемые вещества разлагаются при высоких температурах и затем хроматографически определяются образовавшиеся продукты);
- метод «вычитания» (мешающие компоненты поглощаются специфическими реагентами и не влияют на определение определяемых компонентов).

К положительным особенностям РГХ относятся: расширение области применения газовой хроматографии; улучшение разделения анализируемых соединений, т. к. индивидуальные свойства соединений более заметно проявляются в образующихся производных, чем в исходных соединениях; существенное улучшение количественных характеристик аналитических определений; увеличение чувствительности детектирования; лучшая сохранность хроматографической колонки. Недостатками РГХ являются: усложнение анализа, ухудшение эффективности разделения, увеличение времени анализа. **Наиболее широко применяется получение производных.**

1. Получение силильных производных.



2. Алкилирование.



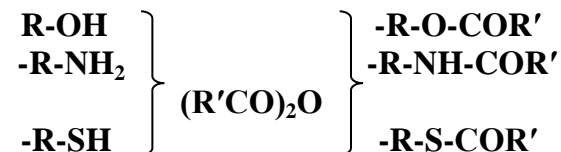
3. Получение сложных эфиров. На практике используют:

- *диазометановый метод*, где реакция дериватизации проходит по уравнению $\text{RCOOH} + \text{CH}_2\text{N}_2 \rightarrow \text{RCOOCH}_3 + \text{N}_2$;
- *метанольный метод* — $\text{RCOOH} + \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{RCOOCH}_3$;
- *пиролитический метод* — $\text{RCOOH} + (\text{CH}_3)_4\text{NOH} \rightarrow \text{RCOOCH}_3 + \text{H}_2\text{O} + (\text{CH}_3)_3\text{N}$.

4. Получение простых эфиров. Дериватизация соединений проходит по уравнению: $\text{ROH} + \text{CH}_3\text{I} \rightarrow \text{ROCH}_3 + \text{HI}$.

5. Получение ацильных производных. На схеме представлены процессы дериватизации:

Наиболее распространенные ацилирующие реагенты — ангидриды соответствующих кислот.



6. Образование оксимов и гидразинов.

7. Образование производных неорганических соединений (летучих хелатов металлов,

гидридов, хлоридов).

ПРИЛОЖЕНИЕ 3 к занятию № 8 Индексы удерживания Ковача (фрагмент табличных данных)

Klarke-2011.pdf - Adobe Acrobat Reader DC

Файл Редактирование Просмотр Окно Справка

Главная Инструменты Klarke-2011.pdf x Войти

2397 (2424 из 2609) 100%

1804	Physostigmine	1865	OH-Phenmetrazine Isomer 2	1930	Desipramine (ring)
1805	2,4-D-Isobutyl Ester	1866	Demeton-S-methylsulfone	1930	Imipramine (ring)
1805	Norephedrine-(AC ₂)	1870	Diphenhydramine	1930	Nortrimipramine (ring)
1805	Pheniramine	1870	Etomidate	1930	Prometryne
1805	Terbutylazine	1870	Lidocaine	1933	Prenalterol
1807	Dexpanthenol	1870	Mafenide-(Me ₄)	1935	Orphenadrine
1807	Theobromine	1870	Oxo-methypylon	1935	Primidone (diamide)
1808	Cotamine	1870	Oxprenolol	1938	Fenthion
1808	Trimiperidine	1875	OH-Ephedrine	1939	Azapetine
1810	Norketamine	1875	OH-Phenylglutethimide	1940	(3'-OH-)-Butobarbital-(AC)
1810	OH-Methoxymetamfetamine	1876	Alachlor	1940	(Indole Formic Acid)-Me
1810	Phenmetrazine-AC	1879	Ametryne	1940	OH-Butalbital
1810	Salicylic Acid (glycine conjugate-Me)	1880	(3'-Oxo-)-butobarbital	1940	Phenyltoloxamine
1811	Pipobroman	1880	(OH-)Methohexital	1940	Terbutryne
1815	(OH-)Aprobarbital	1880	(Desindane)-AC-aprindine	1940	Desamino-OH-prenylamine-(H ₂ O)
1815	Pentachlorophenol-Me	1880	Diuron-ME	1943	Aldrin
1816	Protionamide	1880	Heptachlor	1943	Tramadol
1819	Saccharin	1880	Ibomal	1945	Nystatin
1820	(p-Hydroxyhippuric Acid)-Me	1880	Phenylmethylbarbituric Acid	1948	Bunitrolol
1820	3'-OH-Pentobarbital-(Me ₂)	1883	Clorgiline	1949	Isocarboxazid
1820	Alprenolol	1884	PEMA	1950	Benzimidazolone
1820	Lobeline	1885	4-OH-Metamfetamine (pholedrine)	1950	Benzimidazolone-AC ₂
1823	Prilocaine	1885	Flurbiprofen (-Me)	1950	Flufenamic Acid
1825	Salicylic Acid (glycine conjugate)	1885	Fluvoxamine	1950	Normephenytoin
1825	Thiopental (-Me ₂)	1885	Norpethidine	1950	Parathion (ethyl)
1825	Trichlorophenoxyacetic Acid (-isopropyl ester)	1889	Mebutamate	1950	Tetracycline
1827	Bisnortilidate	1890	Hydroxyamfetamine-(AC)	1950	Tyramine-(AC ₂)
1830	Carisoprodol	1890	Malaoxon	1952	Harman
1830	Glutethimide	1890	Methylphenobarbital	1953	Phenobarbital
1830	Hexylresorcinol	1890	OH-Diphenhydramine	1955	(Bis-nor-)-aminophenazone
1830	Isoaminile	1890	Tolmetin	1955	3'-OH-Pentobarbital
1830	MDMA-PFP	1892	(Amino-)parathion	1955	COOH-Glibornuride ((sulfonamide)-Me ₃)
1830	Nortilidate	1895	Aminophenazone	1955	Chlorpyrifos
1830	OH-Phenmetrazine (isomer 1)	1895	Clenbuterol (-H ₂ O)	1955	Cyclobarbital
1830	OH-Phenmetrazine Isomer 1	1895	Oxo-prolantine	1955	Desacetylnifenazone
1830	Desamino-OH-phenyltoloxamine	1895	Paraoxon	1955	(HOOC-)Glidazide ((sulfonamide)-Me ₃)
1832	Moxisylyte	1895	Di-OH-diphenhydramine	1955	Niflumic Acid (-Me)
1833	Tetryzoline	1898	Dofamium Chloride	1955	Bis-desalkyl-dipyron
		1899	Thiamylal	1960	Fenylamidol

ТЕСТЫ

- 1. По принципу взаимодействия разделяемых компонентов смеси со структурными компонентами неподвижной фазы выделяют хроматографию:**
 - а) распределительную;
 - б) тонкослойную;
 - в) адсорбционную;
 - г) колоночную;
 - д) препаративную;
 - е) осадочную.
- 2. По расположению неподвижной фазы выделяют хроматографию:**
 - а) колоночную;
 - б) бумажную;
 - в) препаративную;
 - г) аналитическую;
 - д) плоскостную.
- 3. По сфере применения выделяют хроматографию:**
 - а) осадочную;
 - б) препаративную;
 - в) тонкослойную;
 - г) распределительную;
 - д) аналитическую;
 - е) разделительную.
- 4. Сопоставьте вид хроматографии и принцип взаимодействия разделяемых компонентов и неподвижной фазы, на котором он основан:**

1) адсорбционная;	а) образование малорастворимых соединений с различной степенью растворимости;
2) осадочная;	б) взаимодействие «антиген – антитело»;
3) ионообменная.	в) образование комплексных соединений с различной константой нестойкости;
	г) разделение за счёт различного заряда разделяемых молекул;
	д) сорбция и десорбция.
- 5. К плоскостной хроматографии относятся:**
 - а) тонкослойная хроматография;
 - б) газо-жидкостная хроматография;
 - в) сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография;
 - г) высокоэффективная жидкостная хроматография;
 - д) бумажная хроматография.

6. К колоночной хроматографии относятся:

- а) тонкослойная хроматография;
- б) газо-жидкостная хроматография;
- в) сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография;
- г) высокоэффективная жидкостная хроматография;
- д) бумажная хроматография.

7. В газовой хроматографии применяются следующие типы колонок:

- а) насадочные;
- б) ионообменные;
- в) капиллярные;
- г) металлические для хроматографии под давлением.

8. Методом газовой хроматографии можно разделять вещества:

- а) газообразные;
- б) летучие;
- в) водные растворы;
- г) термостабильные;
- д) термолабильные.

9. Метод хроматографии был изобретён:

- а) М. В. Ломоносовым;
- б) А. И. Несмеяновым;
- в) М. С. Цветом;
- г) А. Эйнштейном;
- д) А. Мартином и М. Сингом.

10. Хроматография — это процесс:

- а) разделения смесей веществ, основанный на химическом взаимодействии разделяемых компонентов со второй контактирующей фазой;
- б) разделения смесей веществ, основанный на необратимом смешивании разделяемых компонентов во второй контактирующей фазе;
- в) разделения смесей веществ, основанный на количественных различиях в поведении разделяемых компонентов при их непрерывном перераспределении между двумя контактирующими фазами, одна из которых неподвижна, а другая имеет постоянное направление движения.

11. Хроматографический метод анализа является методом:

- а) качественного анализа;
- б) количественного анализа;
- в) и качественного, и количественного анализа.

- 12. Хроматографический метод анализа является:**
а) физическим методом анализа;
б) химическим методом анализа;
в) физико-химическим методом анализа.
- 13. Что отличает газо-адсорбционную хроматографию от газожидкостной?**
а) аппаратное оформление; в) механизм разделения;
б) объект анализа; г) детекторы.
- 14. Какого вида хроматографии не существует?**
а) тонкослойной; в) потенциметрической;
б) ионообменной; г) газожидкостной.
- 15. В жидкостной хроматографии роль неподвижной фазы обычно играет:**
а) твердое тело; в) жидкость;
б) газ; г) жидкость на носителе.
- 16. Укажите виды хроматографии в зависимости от агрегатного состояния фаз:**
а) газожидкостная; д) жидкость-жидкостная;
б) газо-твердофазная; е) жидкость-твердофазная;
в) ионообменная; ж) адсорбционная;
г) распределительная; з) плоскостная.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Медведовская, И. И.* Хроматографический анализ : практикум / И. И. Медведовская, М. А. Воронцова ; под ред. В. И. Вершинина. Омск : Омский госуниверситет, 2002. 78 с.
2. *Хроматографические* методы анализа / А. Е. Соколовский [и др.] ; под ред. Е. В. Радион. Минск : БГТУ, 2002. 35 с.
3. *Шаповалова, Е. Н.* Хроматографические методы анализа / Е. Н. Шаповалова, А. В. Пирогов. Москва : МГУ им. М. В. Ломоносова, 2007. 103 с.

Учебное издание

Вергун Ольга Михайловна
Яранцева Наталья Дмитриевна

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Практикум для студентов фармацевтического факультета

Ответственная за выпуск Н. Д. Яранцева
Компьютерная верстка Н. М. Федорцовой

Подписано в печать 09.02.18. Формат 60×84/8. Бумага писчая «Discovery».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 1,53. Тираж 120 экз. Заказ 96.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.