**Содержание**

1. Теоретическая часть. Понятие бумажной хроматографии

1.1 Классификация

1.2 Носитель

1.3 Методика

1.4 Сущность метода

1.5 Аппаратура и материалы

1.6 Подготовка к испытанию

1.7 Проведение испытаний

1.8 Сорбенты

2. Практическая часть

2.1 Идентификация ЛРС, содержащего кумарины

2.2 Идентификация ЛРС, содержащего алкалоиды

2.3 Идентификация ЛРС, содержащего антраценпроизводные

Вывод

Список литературы

**1. Теоретическая часть. Понятие бумажной хроматографии**

**Бумажная хроматография** – метод анализа состава исследуемого образца. Был открыт в 1944 году Констоном, Гордоном, Мартином и Сенджем, которые использовали его для анализа смесей аминокислот. Мартин и Сендж впоследствии были удостоены Нобелевской премии за открытие распределительной хроматографии. В последующие 10 лет этот метод получил огромное распространение, но с 1952 года бумажную хроматографию начал вытеснять новый метод тонкослойной хроматографии (являющийся по сути обобщением бумажной). Последний оказался эффективнее благодаря большей скорости эксперимента, пригодности для препаративных целей и более широким возможностям обнаружения. Поэтому сейчас бумажная хроматография уже практически не применяются, а методы её давно не совершенствуются.

## 1.1 Классификация

Бумажной хроматографию, как и хроматографию вообще, можно разделить на распределительную, адсорбционную и ионообменную, а также на препаративную и аналитическую. В распределительной бумажной хроматографии можно выделить нормальную и обращённо-фазную хроматографию. В последнем случае (в отличие от нормального подхода) неподвижная фаза более липофильна, чем подвижная. Этот метод применяется для разделения липофильных веществ.

## 1.2 Носитель

При распределительной БХ носителем неподвижной фазы является целлюлоза в виде листов бумаги, которая даже в высушенном виде содержит значительное количество связанной воды. Распределение происходит между связанной водой и растворителем, хотя присутствуют и адсорбционные эффекты. Для БХ применяется качественная бумага, которая может быть модифицирована в соответствии с поставленными задачами. Также используется бумага из стекловолокна, которая устойчивы к коррозионно-активным реагентам и обладает низкой адсорбционной способностью.

Один из наиболее ранних способов модифицирования хроматографической бумаги – ацетилирование. Бумага, полученная таким образом, используется для обращённо-фазной хроматографии. Позднее было обнаружено, что эта бумага пригодна и для разделения рацемических смесей, так как ацетилцеллюлоза сама является хиральным веществом и потому энантиомеры перемещаются по ней с различной скоростью. Как носители неподвижной липофильной фазы применяются также силиконы.

## 1.3 Методика

В бумажной хроматографии вещества различаются по их относительному положению на бумаге после того, как растворитель пройдёт определённое расстояние. Небольшое количество раствора смеси (10-20 мкл), которую нужно разделить, наносят в отмеченную точку на бумаге и высушивают. Полученное пятно называют стартовым. Затем бумагу помещают в герметичную камеру и один её конец погружают в растворитель, который является подвижной фазой. Под действием капиллярных сил растворитель движется по бумаге, растворяя и увлекая за собой компоненты образца. До начала движения образец должен полностью раствориться, поэтому скорость растворения компонентов в подвижной фазе является одним из факторов, определяющих эффективность разделения. После того, как растворитель пройдёт определённое расстояние, лист вынимают и сушат. Затем образовавшиеся пятна, которые могут быть как видимые, так и невидимые, обнаруживают и отмечают.

Отношение расстояния, пройденного пятном, к расстоянию, пройденному растворителем стандартно обозначается **Rf**. Эта величина зависит от вещества, бумаги и природы растворителя. Бумажные хроматограммы могут проявляться в восходящем, нисходящем и горизонтальном токе растворителя, что слабо отражается на их качестве. Поэтому выбор определяется другими факторами: по сравнению с восходящей хроматографией нисходящая имеет определённые преимущества. А именно, она требует меньше времени и не ограничена по длине пробега. С другой стороны, для нисходящей БХ играет важную роль тщательность подготовки камеры, так как загрязнение или плохой контакт бумаги в месте соприкосновения со стенкой лодочки может приводить к неоднородному току и, как следствие, образованию полос.

Буш и Кроушоу предложили методику *скоростной БХ*. Эта методика предусматривает применение более узких камер, горизонтальное хроматографирование, насыщение атмосферы камеры парами растворяющей системы, а главное – предварительную пропитку бумаги водной неподвижной фазой. Нередко весьма эффективна оказывается т. н. *двумерная БХ*, которая заключается в том, что после проведения хроматографии в одном направлении бумагу высушивают и повторно хроматографируют с другим растворителем под прямым углом к первоначальному направлению. При этом часто происходит разделение веществ, которые не разделяются в первом растворителе.

## Обнаружение

Пятна на хроматограммах могут быть обнаружены по цвету, флуоресценции, с помощью химических реакций, для чего бумагу опрыскивают или погружают в различные реагенты, или же по радиоактивности. Идентификацию проводят обычно путём сравнения с образцами с известными величинами **Rf** или после элюирования, которое сводится к вырезанию зоны, содержащей пятно, и последующему промыванию её соответствующим растворителем.

**1.4 Сущность метода**

Метод заключается в разделении на хроматографической бумаге смеси веществ в потоке растворителя, основанном на различной скорости перемещения компонентов смеси.

**1.5 Аппаратура и материалы**

* Камера (сосуд) хроматографическая, закрытая герметичной крышкой.
* Лампа ультрафиолетовая для обнаружения веществ с использованием флуоресценции при длине волны от 254 до 366 нм.
* Микропипетка вместимостью 0,002–0,010 см3 или микро шприц вместимостью не более 0,01 см3.
* Пульверизатор для распыления проявителя.
* Бумага хроматографическая.
* Денситометр.
* Устройство для сканирования пятен на бумаге.

**1.6 Подготовка к испытанию**

Подготовка хроматографической бумаги.

В зависимости от размеров хроматографической камеры из хроматографической бумаги вырезают полоски с ровной или зубчатой кромкой или кружки соответствующих размеров, на которых мягким карандашом обозначают пробу, систему растворителей, дату и линию старта с точками для нанесения пробы. Рекомендуемое расстояние между точками для нанесения пробы 20-30 мм, расстояние от линии старта до кромки бумаги – 30 мм.

При необходимости перед испытанием бумагу обрабатывают специальным раствором и высушивают при комнатной температуре в вертикальном положении стартом вниз.

В точки, отмеченные на линии старта, наносят с помощью калиброванной микропипетки или микрошприца 0,002-0,010 см3 испытуемого раствора, если в нормативно-технической документации на испытуемые реактив нет других указаний. При необходимости в точки на линии старта наносят таким же образом растворы веществ, соответствующих предполагаемым компонентам смеси, для идентификации и количественной оценки этих примесей. Допускается наносить пробу не в виде точки, а чертой с применением микропипетки или капилляра. После нанесения пробы на непропитанную бумагу растворителю дают свободно испариться. Если проба не содержит летучих компонентов, а бумага не пропитана органической неподвижной фазой, испарение растворителя можно ускорить струей горячего воздуха. Бумагу с нанесенной пробой помещают в хроматографическую камеру (пропитанные бумаги помещают в камеру сразу после нанесения раствора пробы).

При круговой хроматографии пробы наносят на окружность, описанную на расстоянии нескольких сантиметров от центра хроматограммы.

**1.7 Проведение испытаний**

Хроматографирование.

Хроматографическое разделение веществ проводят в хроматографической камере, в замкнутой системе, насыщенной парами подвижной фазы, при температуре, указанной в нормативно-технической документации на испытуемый реактив, поместив эту фазу в чашку на дно камеры. Если в нормативно-технической документации на испытуемый реактив нет других указаний, хроматографирование заканчивают, когда фронт подвижной фазы достигнет определенного расстояния от старта, например 250 мм. Хроматографирование проводят одним из указанных ниже способов.

*Нисходящая хроматография*

В камере для нисходящей хроматографии должен быть желобок или лодочка. Конец листа хроматографической бумаги с нанесенными пробами, ближний к линии старта, дважды перегибают, помещают в желобок или лодочку, закрепляют стеклянной палочкой, как показано на черт. 5 приложения 1. Затем в желобок помещают подвижную фазу.

*Восходящая хроматография*

Хроматографическую бумагу подвешивают в хроматографической камере так, чтобы ее нижний конец был погружен в слой подвижной фазы на дне сосуда, как показано на черт. 4 приложения 1, а уровень подвижной фазы находился в 10 мм ниже линии старта.

*Горизонтальная хроматография*

Испытания проводят, как показано на черт. 2 приложения 1.

*Круговая хроматография*

При круговой хроматографии подвижную фазу помещают в середину хроматограммы, откуда она передвигается к периферийной части, как показано на черт. 3 приложения 1. В качестве хроматографической камеры допускается использовать две чашки Петри или эксикатор.

*Проточная хроматография*

Если хроматографируемые вещества имеют в определенной системе низкие значения Rf, нижнюю кромку исходящей хроматограммы делают зубчатой. Когда подвижная фаза достигнет конца хроматограммы, разделение продолжают так, чтобы элюирующий растворитель стекал по каплям на дно камеры.

*Повторная хроматография*

Метод, при котором по завершении первого продвижения подвижной фазы хроматограмму высушивают и хроматографирование повторяют (возможно несколько раз).

*Многомерная хроматография*

Метод, при котором по завершении первого продвижения подвижной фазы хроматограмму поворачивают (например под углом 90°) и снова проводят хроматографирование. Перед повторным хроматографированием испаряют подвижную фазу.

**Сушка хроматограмм**

По окончании разделения хроматограмму вынимают из камеры и отмечают фронт мягким карандашом, после чего сушат при комнатной температуре в вертикальном положении, стартом вниз. Продолжительность сушки зависит от скорости испарения подвижной фазы и химической стабильности хроматографируемых веществ.

**Проявление хроматограмм**

Проявление компонентов на хроматограмме проводят одним из способов, приведенных ниже.

*Физические методы*

Визуально, при дневном свете, отмечают на хроматограмме положение пятен – цветных веществ. При наличии флуоресцирующих веществ проявление проводят в УФ-свете.

*Химические методы*

Хроматограммы проявляют жидкими игазообразными проявителями, используя реакцию имеющихся на хроматограмме соединений с подходящим реагентом-проявителем с образованием окрашенного или флуоресцирующего вещества. Жидкие проявители наносят пульверизатором или используют реагенты в аэрозольной упаковке, газообразные применяют, поместив хроматограмму в пары проявителя.

Хроматограмму кладут горизонтально на лист фильтровальной бумаги или оставляют подвешенной на стеклянной палочке и опрыскивают как можно более мелкими каплями (туманом) проявителя всю площадь хроматограммы вначале с одной, а потом с другой стороны.

При проявлении газообразным проявителем хроматограмму подвешивают в камере, в которую помещен летучий реагент (например, кристаллы йода), или на дне которой проявитель получают химическим путем (например, оксиды азота получают путем добавления твердого нитрита натрия к раствору соляной кислоты).

*Биологические методы*

Хроматограммы проявляют, используя биологическую активность хроматографируемых веществ.

### 1.8 Сорбенты

Силикагель – гидратированная окись кремния, образующаяся при действии минеральных кислот на силикат натрия и сушкой образовавшегося золя. После размалывания золя используют фракцию определенной зернистости (указанную на пластинке, обычно 5-20 мкм). Силикагель является полярным сорбентом, у которого в качестве активных центров служит группы -ОН. Он легко сорбирует на поверхности воду и образует водородные связи.

Окись алюминия. Окись алюминия является слабо основным адсорбентом и используется в основном для разделения соединений слабоосновного и нейтрального характера. Недостатком пластин на окиси алюминия является обязательная активация поверхности перед использованием в сушильном шкафу при высокой температуре (100-1500С) и низкая, по сравнению с силикагелем адсорбционная емкость слоя.

Кизельгур – адсорбент, полученный из природных минералов: диатомовых земель. Сорбент обладает гидрофильными свойствами, но более низкой адсорбционной емкостью слоя по сравнению с силикагелем.

Кремнекислый магний менее полярный чем силикагель и обычно используется в случаях, когда более полярные адсорбенты не дали эффективного разделения.

Целлюлоза – тонкослойные пластины с нанесенной целлюлозой очень эффективны для разделения сложных органических молекул. Адсорбент представляет собой в основном шарики целлюлозы диаметром до 50 мкм, закрепленные на носителе крахмалом. Но, как и в бумажной хроматографии, подъем фронта растворителя происходит очень медленно.

В ионообменных хроматографических пластинках в качестве адсорбента используют ионообменные смолы, содержащие четвертичный аммоний или активные сульфогруппы, участвующие в ионном обмене. Тонкослойная хроматография с такого типа пластинками, проводится с подвижными фазами, содержащими сильные кислоты или щелочи. Данные пластинки эффективны для разделения высокомолекулярных и амфотерных соединений. Помимо вышеперечисленных существуют множество веществ, используемых как сорбенты.

**2. Практическая часть**

**2.1 Идентификация ЛРС, содержащего кумарины**

*Приготовление извлечения из растительного сырья.* 2 г измельченного сырья (плоды амми большой, пастернака посевного, псоралеи костянковой, корней горичника и порезника густоцветного и др.) заливают 20 мл этилового спирта и кипятят в течение 15 мин. с обратным холодильником. После охлаждения фильтруют.

*Хроматографическое определение.*

3а. После проведения качественных реакций из оставшейся части спиртового извлечения берут 0,01 мл и наносят на пластинку «Силуфол» или силикагеля (закрепленный слой) и хроматографируют в системе н-гексан – бензол – метиловый спирт (5:4:1) до тех пор, пока линия фронта не достигнет расстояния 10 см от линии старта. После этого хроматограмму высушивают на воздухе в течение 10 мин, опрыскивают 10%-ным КОН в метаноле и высушивают в сушильном шкафу при t= 110-120оСв течение 2-3 мин. Затем опрыскивают свежеприготовленным реактивом Паули по Кутачеку. При наличии кумаринов в сырье на хроматограмме проявляются яркие пятна от кирпично-красного до сине-фиолетового окрашивания в зависимости от структуры кумаринов.

3б. 0,01 мл спиртового извлечения наносят на полосу хроматографической бумаги марки «Б» размером 14 X 65 см, предварительно импрегнированной 10%-ным формамидом в метиловом спирте, и хроматографируют нисходящим методом в смеси растворителей петролейный эфир – бензол – метиловый спирт (5:4:1) в течение 3-4 ч. Хроматограмму высушивают на воздухе в течение 10 мин, опрыскивают 10%-ным КОН в метиловом спирте и высушивают в сушильном шкафу при *t* = 110-120°С в течение 2-3 мин, затем опрыскивают диазореактивом Паули по Кутачеку. При наличии кумаринов в сырье па хроматограмме появляются яркие пятна от кирпично-красного до сине-фиолетового окрашивания.

**2.2 Идентификация ЛРС, содержащего алкалоиды**

Алкалоиды в растительном сырье обычно содержатся в виде солей, поэтому до извлечения необходимо перевести соли алкалоидов в свободные основания, что достигается обработкой сырья различными щелочами (КН4ОН, КаОН, Са(ОН)2, Ва(ОН)2 и др.). При подборе щелочи учитывают свойства алкалоидов. Сильные щелочи, например NаОН, используют при выделении сильных оснований алкалоидов и алкалоидов, находящихся в растительном сырье в виде прочных соединений с дубильными веществами (кора хинного дерева, кора гранатового дерева), но не применяют при выделении алкалоидов, имеющих в молекуле фенольные гидроксилы. Такие алкалоиды, как, например, морфин, сальсолин, некоторые алкалоиды спорыньи, вследствие образования фенолятов органическим растворителем не извлекаются, так - как феноляты, как правило, хорошо растворимы в воде и нерастворимы в органических растворителях. Для переведения их солей в основания используют обычно аммиак. При выделении алкалоидов, имеющих сложноэфирную группировку (атропин, гиосциамин, скополамин и др.) также используют аммиак и другие слабые щелочи, так как сильные щелочи могут вызывать разложение алкалоидов. Не следует применять N3014 и при выделении алкалоидов из семян, содержащих жирные масла, так как едкие щелочи вызывают омыление жиров. Мыла же способствуют образованию эмульсий.

Разделение суммы алкалоидов. В растительном сырье обычно содержится не один, а несколько алкалоидов, и в большинстве случаев при обработке растительного сырья в извлечение переходят все или большинство алкалоидов (сумма). Отделить один «нужный» алкалоид от остальных, а тем более разделить сумму алкалоидов на индивидуальные соединения очень сложно. Так как большинство алкалоидов обладает различными физическими и химическими свойствами, предложить единую схему разделения трудно. Описано большое число методов и их различных модификаций, позволяющих разделить сумму алкалоидов на отдельные алкалоиды.

Разделение суммы алкалоидов на основании их различной растворимости в органических растворителях.

1. В некоторых случаях частичное разделение происходит уже при обработке органическим растворителем первоначального водно-кислотного извлечения после подщелачивания. При его обработке, например, этиловым эфиром в органический растворитель могут перейти не все, а только часть алкалоидов. Оставшиеся в первоначальном растворе алкалоиды можно извлечь, используя для этого другие органические растворители (хлороформ, дихлорэтан и др.). Иногда таким способом можно достигнуть хороших результатов. Но чаше у алкалоидов одного растения различие в растворимости бывает выражено не очень резко и поэтому достигается только частичное разделение. В таких случаях требуется или повторное проведение этой операции, или применение другого способа разделения.

2. При последовательной обработке остатка (суммы алкалоидов), полученного после отгонки растворителя, различными органическими растворителями (петролейный эфир, бензол, хлороформ и др.) в некоторых случаях можно достигнуть частичного разделения суммы алкалоидов.

Чаще всего используют следующие системы растворителей;

1) м-бутанол – уксусная кислота – вода (5:1:4);

2) н-бутанол – уксусная кислота – вода (10:2:5);

3) н-бутанол – соляная кислота – вода (100:4: вода до насыщения);

4) этилацетат–уксусная кислота–вода (11 : 21 : 85);

5) н-бутанол – пиридин – вода (10 : 2 ; 5) и -др.

Для обнаружения алкалоидов высушенную хроматограмму обрабатывают каким-либо реактивом, дающим с алкалоидами окрашенные соединения. Чаще всего для этого используют реактив Драгендорфа. При обработке хроматограммы этим реактивом появляются оранжевые или оранжево-красные пятна (алкалоиды) на желтом фоне. Можно для обнаружения алкалоидов использовать пары йода (образуются бурые пятна). Для обнаружения стероидных алкалоидов можно использовать насыщенный хлороформный раствор треххлористой сурьмы с последующим нагреванием при 105оС. Появляется кирпично-красное окрашивание.

**2.3 Идентификация ЛРС, содержащего антраценпроизводные**

При исследовании состава антрагликозидов готовят водные извлечения: при анализе состава агликонов сырье экстрагируют бензолом, этиловым или метиловым спиртом, которые при нагревании более или менее удовлетворительно экстрагируют как свободные антраценпроизводные, так и их гликозидные формы.

0,3 г измельченного растительного материала нагревают с 3 мл этилового спирта в течение 5 мин, доводя до слабого кипения. После остывания фильтруют. 0,1 мл фильтрата наносят па линию старта и хроматографируют в системе этилацетат – метиловый спирт – Вода (100:17:13) на пластинках «Силуфол». Время хроматографирования 30-40 мин. Хроматограмму высушивают на воздухе, обрабатывают 5%-ным КаОН в этиловом спирте и рассматривают при дневном свете и УФ свете до и после обработки. Одновременно хроматографируют стандарт «свидетель», нанося его раствор рядом с исследуемым извлечением. По величине *R1,* характеру окраски и флуоресценции пятен идентифицируют антраценпроизводные исследуемого сырья.

**Вывод**

Использование хроматографии на бумаге имеет ряд существенных недостатков: зависимость процесса разделения от состава и свойств бумаги, изменение содержания воды в порах бумаги при изменении условий хранения, очень низкая скорость хроматографирования (до нескольких суток), низкая воспроизводимость результатов, поэтому сейчас бумажная хроматография уже практически не применяются, а методы её давно не совершенствуются.

Метод тонкослойной хроматографии оказался эффективнее благодаря большей скорости эксперимента, пригодности для препаративных целей и более широким возможностям обнаружения

**Список литературы**

1. Химический анализ лекарственных растений. / Под ред. Н.И. Гринкевича, Л.Н. Сафронича. − М., 1983. − 176 с.
2. Избранные лекции по фармакогнозии. Учеб. пособие. / Левинова В.Ф., Решетникова М.Д., Хлебников А.В. / Под ред. Олешко Г.И. изд. 3-е. – Пермь, 2006. – 305 с.
3. Избранные лекции по токсикологической химии. / Под ред. Малковой Т.Л. − Пермь, 2005. – 152 с.
4. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия. – М.: Медицина, 2007. − 656 с.
5. Зайчикова С.Г., Самылина И.А. Химико-фармацевтический журнал. Т. 35. − №5. – 2001.
6. ГОСТ 28365-89. Реактивы. Метод бумажной хроматографии.