

АО Медицинский Университет Астана,
кафедра фармацевтических дисциплин т.

Тема: Бумажная и тонкослойная хроматография

Выполнила - Калиева Аида, фарм 203 группа
Проверила: Арыстанова Т.А.

2016 год, г.Астана

Глоссарий.

- Неподвижная фаза – элюент, твердый носитель, покрытый пленкой;
- Подвижная фаза - поток жидкости, флюида или газа, перемещающий компоненты разделяемой смеси вдоль неподвижной фазы.
- Сорбция – явление концентрирования вещества в одной из смежных фаз.
- Адсорбция – концентрирование вещества (жидкости или газа) на поверхности твердой фазы.
- Абсорбция – поглощение вещества (газа или жидкости) жидкостью.
- **Сорбенты** — твердые тела или жидкости, избирательно поглощающие (*сорбирующие*) из окружающей среды газы, пары или растворённые вещества.
- Элюирование – это извлечение вещества, вымыванием его подходящим растворителем – элюентом.

- Хроматографическим методом называется такой физико-химический метод разделения смесей, который основан на различном распределении компонентов между двумя фазами – неподвижной (носитель) и подвижной (элюент).



Служит для идентификации и количественного определения органических и неорганических веществ.

По способу разделения компонентов
анализируемой смеси и аппаратного
оснащения

На колонке

На бумаге

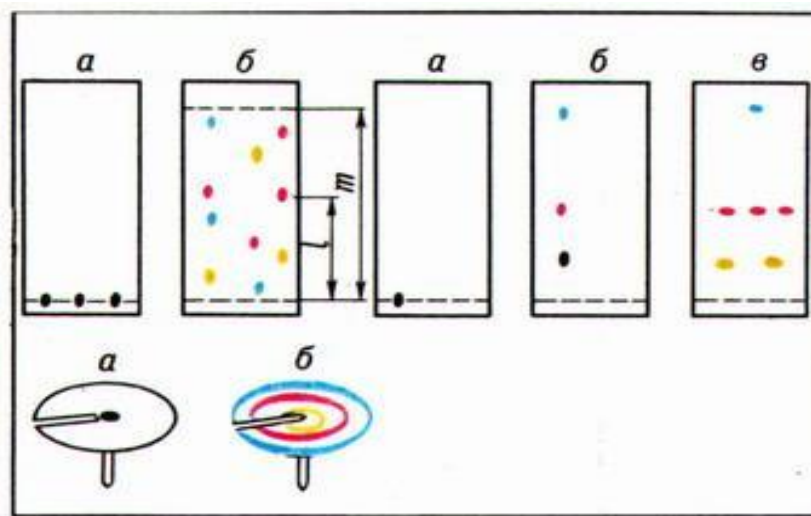
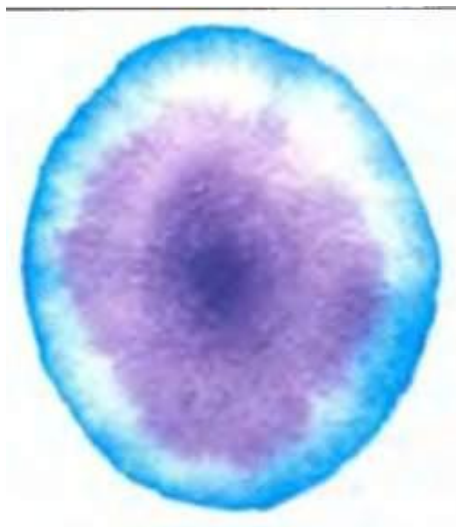
В тонком
слое
сорбента

Газовая

Жидкостная

Хроматография на бумаге.

Хроматография на бумаге является вариантом распределительной хроматографии, при этом специальная фильтровальная бумага служит носителем неподвижной фазы. Подвижная фаза перемещается по бумаге под действием капиллярных сил. Во время движения подвижная фаза растворяет вещества, нанесенные на бумагу, и перемещает их с собой. Деление компонентов смеси достигается за счет различной скорости их перемещения, зависящей от величины коэффициента распределения между подвижной и неподвижной фазами.



По направлению движения подвижной фазы различают три способа хроматографии – круговой, нисходящий, восходящий.

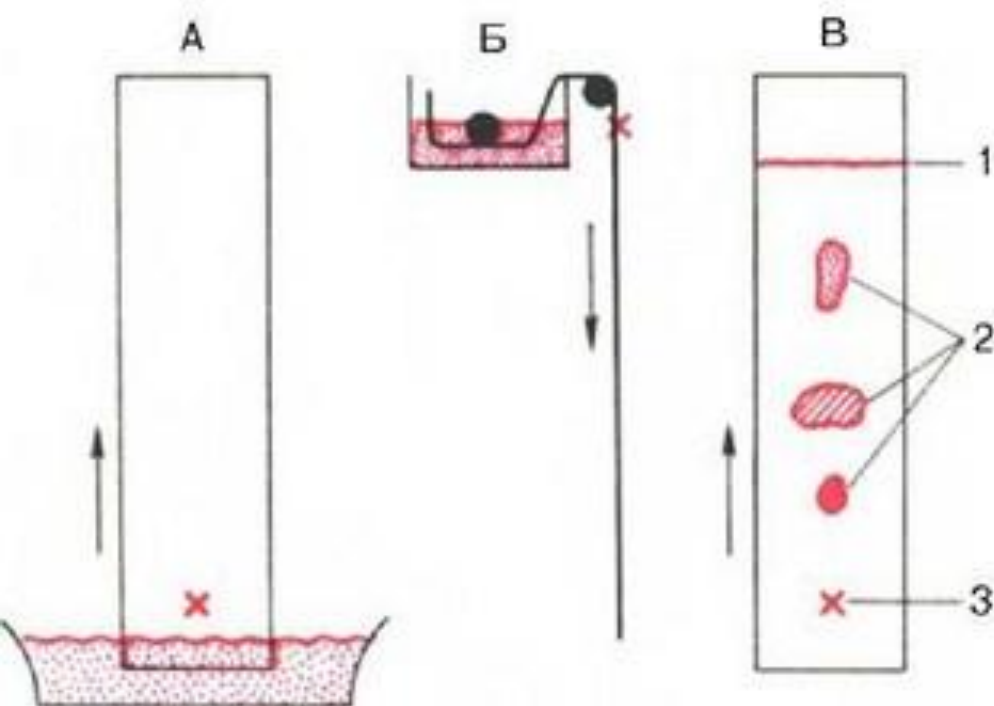
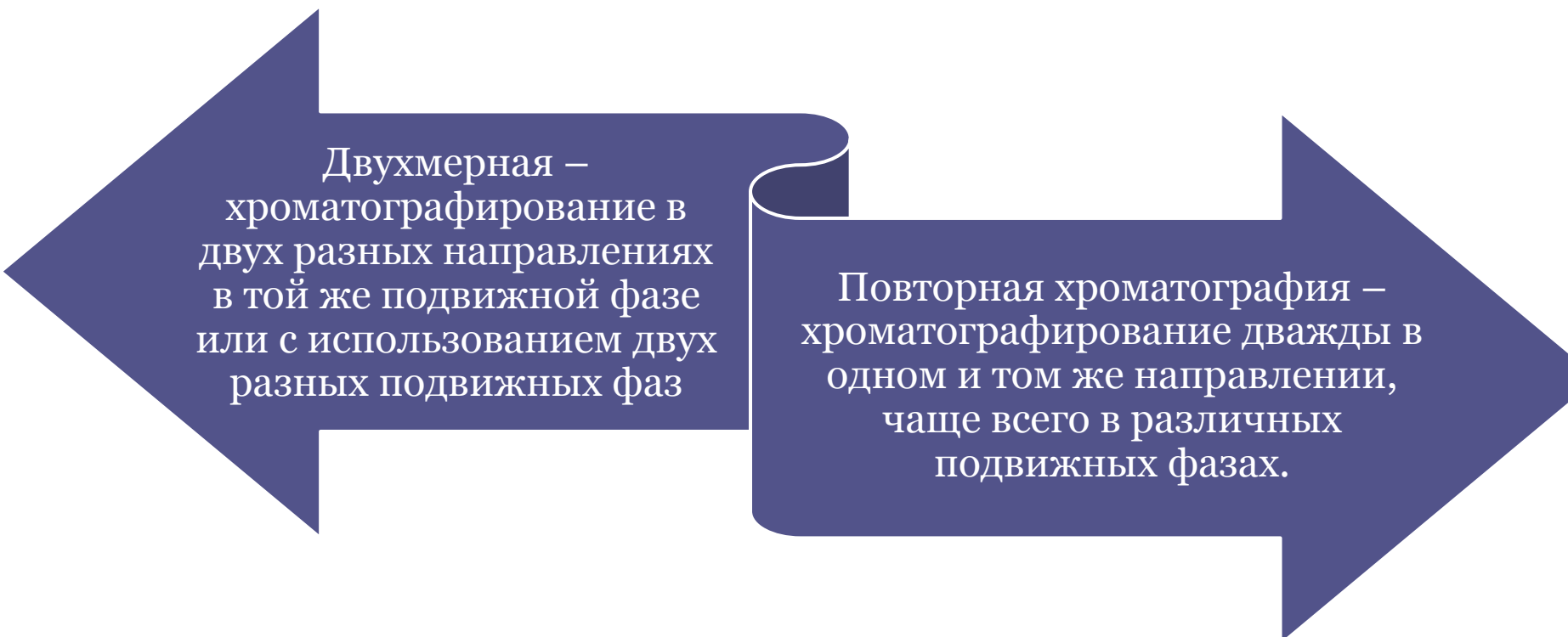


Рис. 1.4. Хроматография на бумаге (схема).

А – восходящая хроматография; Б – нисходящая хроматография (вид сбоку); В – хроматограмма с разделенными и окрашенными веществами: 1 – фронт растворителя, 2 – разделенные вещества, 3 – место нанесения образца.

Разделение многокомпонентных смесей.



Двухмерная –
хроматографирование в
двух разных направлениях
в той же подвижной фазе
или с использованием двух
разных подвижных фаз

Повторная хроматография –
хроматографирование дважды в
одном и том же направлении,
чаще всего в различных
подвижных фазах.

Скорость перемещения вещества на хроматограмме оценивают по относительной величине удерживания.

- R_f = расстояние от стартовой линии хроматограммы до центра пятна вещества / расстояние пройденное фронтом подвижной фазы
- $R_s = R_f(\text{анализируемого вещества}) / R_f(\text{стандартного вещества})$

Выявление зон адсорбции (пятен) веществ на хроматограмме производится:

- Визуально, если вещества образуют окрашенные зоны;
- С помощью УФ – света, если вещества флуоресцируют;
- С помощью детектирующих реактивов – по образованию окрашенных зон.

Идентификация.

- Основное пятно на хроматограмме, полученное для испытуемого раствора, сравнивают визуально с соответствующим пятном на хроматограмме, полученной для раствора стандартного образца (раствора сравнения), сравнивая окраску (цвет флюоресценции), размер и относительную величину удерживания обоих пятен.

Воспроизводимость результатов достигается стандартизацией факторов:

Характеристики
бумаги

Конструкции и
размера камеры

Состава фаз

Объема наносимой
пробы

Характеристики
стандартных веществ

Способа
хроматографирования

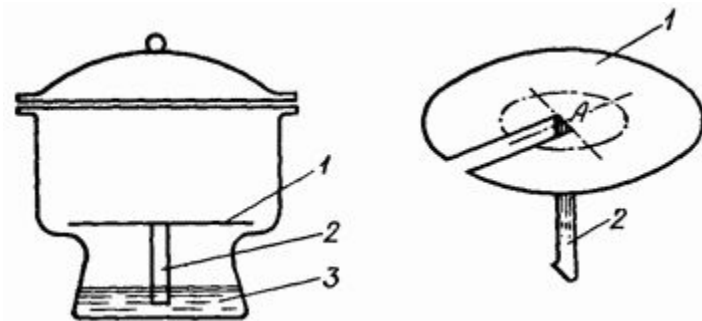
Степени насыщения
камеры

Расстояния
пройденного
подвижной фазой

Способа обнаружения

Восходящая хроматография

- Оборудование состоит из стеклянной камеры с плотно закрывающейся крышкой. В верхней части камеры имеется специальное устройство, удерживающее в подвешенном состоянии хроматографическую бумагу и способное опускать ее при закрытой камере. На дно камеры помещают лодочку с подвижной фазой, в которую опускают конец бумаги. Хроматографическую бумагу разрезают в направлении ее текстуры на полосы достаточной длины и шириной не менее 25 см

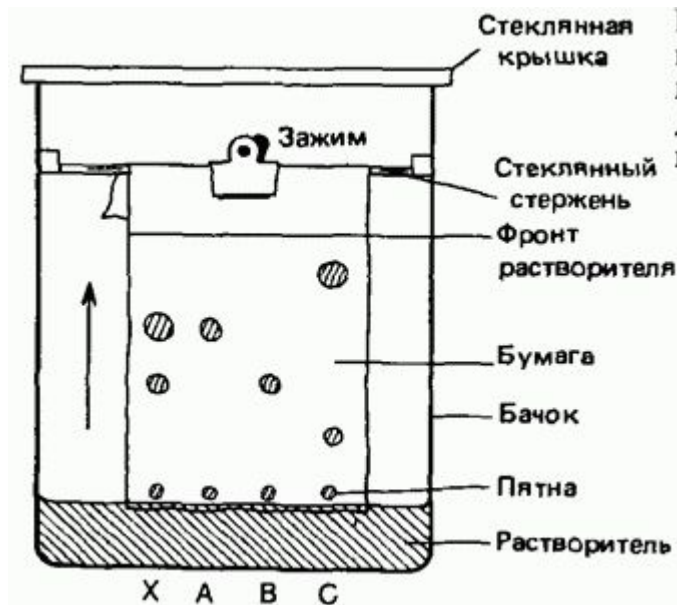


- Лодочку заполняют подвижной фазой до образования слоя глубиной 2.5 см. В соответствии с указаниями в частной статье внутренние стенки камеры выстилают фильтровальной бумагой, импрегнированной подвижной фазой. Для насыщения камеру закрывают и выдерживают в течение 24 ч при температуре от 20 °С до 25 °С. Камеру термостатируют при данной температуре в течение всего испытания.
- Отступив от края 3 см, на хроматографической бумаге карандашом проводят горизонтальную линию (линия старта), на которую микропипеткой наносят раствор в соответствии с описанием в частной статье. Поскольку диаметр пятна не должен превышать 10 мм, большой объем раствора наносят в несколько приемов, позволяя каждой порции высохнуть перед следующим нанесением. При совместном хроматографировании нескольких растворов расстояние между пятнами на линии старта должно быть не менее 3 см. Бумагу помещают в камеру, последнюю закрывают крышкой и выдерживают в течение 1 ч 30 мин. Затем конец полосы бумаги опускают в подвижную фазу таким образом, чтобы она не касалась нанесенного пятна. Хроматографируют в течение времени или до расстояния, указанным в частной статье. Бумагу вынимают из камеры, сушат на воздухе. Хроматографическую бумагу защищают от яркого света в течение всего процесса разделения.

Нисходящая хроматография

- Оборудование состоит из стеклянной камеры с плотно закрывающейся крышкой. В центре крышки должно быть отверстие диаметром около 1,5 см, закрытое тяжелой стеклянной пластиной или пробкой. В верхней части камеры подвешивают лодочку для растворителя. На каждой стороне лодочки параллельно и чуть выше ее верхних краев устанавливают два стеклянных регулирующих стержня, удерживающих бумагу таким образом, чтобы она не соприкасалась со стенками камеры.

Хроматографическую бумагу разрезают в направлении ее текстуры на полосы достаточной длины и шириной не менее 25 см и не более длины лодочки.

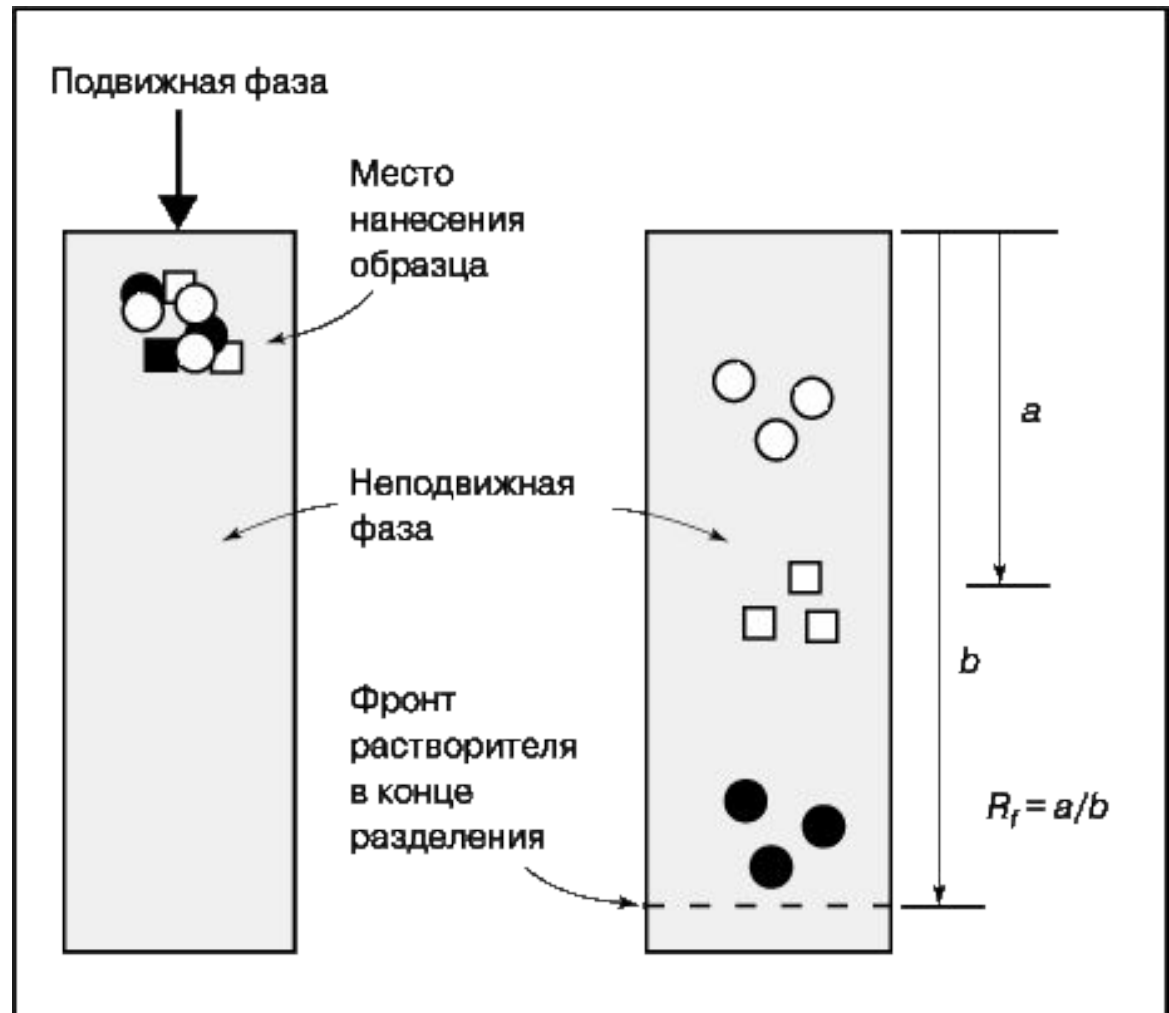


- В камеру наливают растворитель до образования слоя глубиной 2.5 см, закрывают крышкой и выдерживают в течение 24 ч при температуре от 20 °С до 25 °С. Камеру термостатируют при данной температуре в течение всего испытания. Карандашом проводят линию старта на одном конце бумаги, отступив от ее края на такое расстояние, чтобы линия находилась на несколько сантиметров выше регулирующего стержня и была параллельна ему после закрепления конца бумаги в лодочке. Остальная часть листа бумаги должна свободно свисать над регулирующим стержнем. Бумагу помещают в камеру, последнюю закрывают крышкой и выдерживают в течение 1 ч 30 мин. Затем через отверстие в крышке заполняют лодочку растворителем, закрывают отверстие и хроматографируют в течение времени или до расстояния, указанного в частной статье. Бумагу вынимают из камеры и сушат на воздухе. В процессе разделения хроматографическую бумагу защищают от яркого света.

Тонкослойная хроматография.

Тонкослойная хроматография в фарм. анализе используется для идентификации и контроля чистоты(примесей) ЛС.

Тонкослойная хроматография представляет собой метод разделения, в котором используется неподвижная фаза, состоящая из подходящего материала, нанесенного в виде стандартизованного тонкого слоя и зафиксированного на подложке (пластинке или пластине) из стекла, металла или пластмассы.



- Разделение основано на процессах адсорбции, распределения, ионного обмена или их комбинации.
- Сорбенты в порядке возрастания адсорбционной силы:



- Полярные сорбенты (гидрофильные) лучше адсорбируют вещества из неполярных, а неполярные лучше из полярных.
- Полярные сорбенты лучше адсорбируют из растворов те вещества, которые больше содержат полярных групп, и тем сильнее, чем выше степень их ненасыщенности. Адсорбционная способность соединений, содержащих функциональные группы, увеличивается в ряду:
 - $\text{CH}=\text{CH} < \text{OCH}_3 < \text{COOR} < \underset{\text{H}}{\text{C}}=\text{O} < \text{CHO} < \text{SH} < \text{NH}_2 < \text{OH} < \text{COOH}$
- Адсорбируемость веществ на том или ином сорбенте во многом зависит от растворителей. Лучшим является тот, который сам обладает очень малой адсорбируемостью на данном сорбенте.

Методика.

- Хроматографирование проводят в предварительно насыщенных камерах вертикальным или горизонтальным элюированием. В случае двумерной хроматографии пластинку сначала хроматографируют в одном направлении, а затем после высушивания – во втором направлении, перпендикулярном первому.
- При необходимости проводят предварительную подготовку пластинок – перед использованием пластинки либо промывают путем хроматографирования в подходящем растворителе, либо активируют в термостате при температуре от 100 до 105 градусов в течении часа.

Методом ТСХ определяют:

- Идентифицируемые примеси – сравнивают пятна регламентируемых примесей на хроматограммах испытуемого раствора и растворов сравнения;
- Типичная регламентация содержания примеси выглядит в этом случае следующим образом:
 - «На хроматограмме испытуемого раствора, кроме основного пятна, допускается наличие дополнительного пятна, расположенного на уровне пятна на хроматограмме раствора сравнения и не превышающего его по величине и интенсивности поглощения или окраски (... %)».

- Общее содержание примесей – если они не токсичны. Метод внутренней нормализации – в качестве раствора сравнения – раствор самой испытуемой субстанции различной концентрации.
- «На хроматограмме испытуемого раствора любое пятно, кроме основного пятна, не должно превышать по величине и интенсивности поглощения или окраски пятно на хроматограмме раствора сравнения (... %)».

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- На хроматограмме раствора сравнения, используемого для проверки пригодности хроматографической системы, четко делятся пятна указанных в частной статье веществ;
- R_f основного пятна на хроматограмме испытуемого раствора должно быть около величины, указанной в частной статье;
- На хроматограмме раствора сравнения, используемого для проверки чувствительности хроматографической системы, должно быть четко видно пятно.

Преимущества тонкослойной хроматографии:

Позволяет
распознавать
многокомпонентные
смеси

Обладает большей
чувствительностью,
чем БХ

Позволяет
анализировать
почти все классы
органических
соединений

Использованная литература.

- Государственная фармакопея РК от 2008 года