

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Кафедра аналитической химии и химической экологии

**Разделение и определение глицирризиновой и олеаноловой кислот
методом тонкослойной хроматографии в мицеллярных подвижных
фазах**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента IV курса 411 группы

Направления 04.03.01 Химия

Института химии

Белых Елены Александровны

Научный руководитель

Профессор, д.х.н., профессор

Е.Г. Сумина

дата, подпись

Заведующий кафедрой

д.х.н., доцент

Т.Ю. Русанова

дата, подпись

Саратов 2017 год

Введение

Актуальность работы.

Сапонины - природные вещества, широко распространённые в различных видах растений. Водные растворы сапонинов (или извлечения из растительного сырья) образуют при встряхивании обильную стойкую пену, подобно мыльной, в результате чего эти вещества получили название сапонинов от латинского слова «sapo» -мыло. За всё время исследования сапонинов была установлена их разнообразная биологическая активность, а также возможность применения их с лечебной и профилактической целью. Следовательно, разработка способов разделения, идентификации и определения данных веществ в растительных объектах и лекарственных препаратах на их основе является актуальной задачей. С этой целью в настоящей работе использовалась планарная хроматография, осуществлённая в варианте нормально-фазовой тонкослойной хроматографии (ТСХ). В качестве объектов исследования служили глицирризиновая и олеаноловая кислоты, сравнение которых проводилось в водно-органических и мицеллярных подвижных фазах (ПФ).

Целью данной работы явилось сопоставление аналитических возможностей перечисленных ПФ для идентификации и количественного определения исследуемых сапонинов.

Объекты и методы исследования.

Объектом исследования явился водный раствор олеаноловой и глицирризиновой кислот. Для его исследования готовили и использовали различные органические растворители, а также поверхностно- активные вещества.

В ТСХ в качестве неподвижной фазы (НФ) были использованы коммерческие пластины с закрепленным слоем сорбента: полярные – Сорбфил на алюминиевой подложке, АО «сорбполимер» Россия, Сорбфил на полимерной подложке, АО «сорбполимер» Россия; неполярные – RP 18 на

алюминиевой подложке, «Merck», Германия. Объем наносимой пробы составил 10мкл. Измерения параметров хроматограмм проводили с помощью денситометра «Сорбфил» , АО Сорбполимер , Россия.

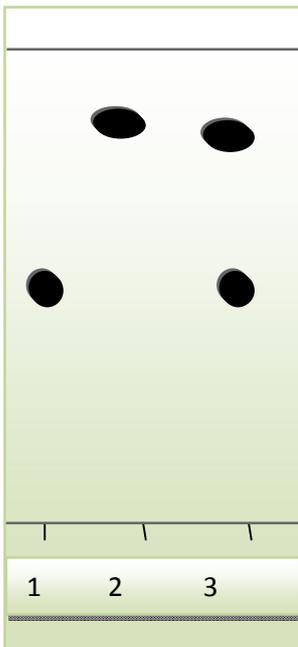
Структура работы включает Введение, главу 1 (Обзор литературы), главу 2 «Экспериментальная часть», в которой описаны объекты и методы исследования, приведена методика проведения эксперимента, а также выводы и список использованной литературы.

Научная новизна работы обусловлена разработкой методики определения олеаноловой и глицирризиновой кислот методом тонкослойной хроматографии.

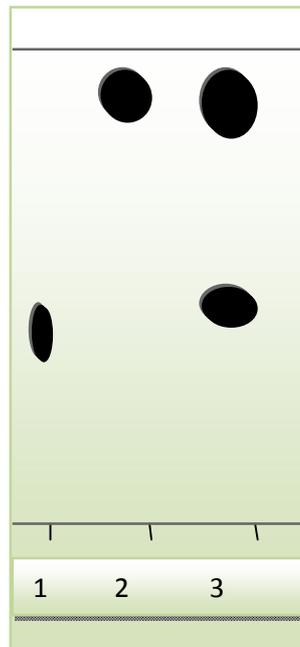
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выбор оптимальной неподвижной фазы

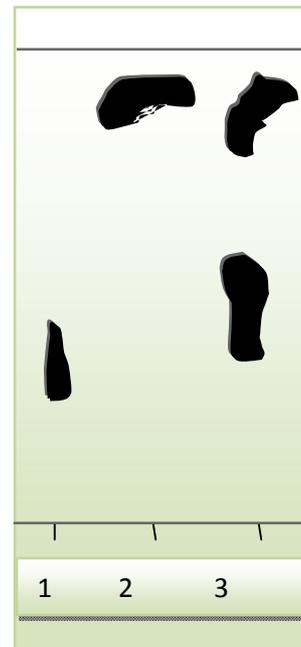
Для выбора оптимальных условий хроматографирования смеси сапонинов проводилось сравнение четырёх НФ: Сорбфил на алюминиевой подложке, Сорбфил на полимерной подложке, Сорбфил ТУ 26-11-17-89* высокоэффективные, Сорбфил на стеклянной подложке. . В качестве ПФ апробировали системы н-бутанол : уксусная кислота : вода (5:1:4) [17], ацетонитрил : вода (3:2) [17]. Результаты исследования приведены на рисунке



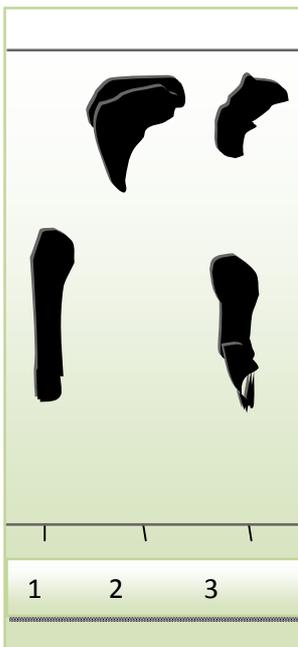
А



Б



В



Г

Рисунок 1– Влияние природы неподвижной фазы на хроматографическое поведение ол, гл кислоты. ПФ: а,б-н-бутанол : уксусная кислота : вода (5:1:4); в, г - ацетонитрил : вода (3:2). НФ: а, б – Сорбфил на алюминиевой подложке и высокоэффективный; в, г - Сорбфил на полимерной подложке и стеклянной подложке;

1 – ол, 2– гл, 3 – смесь ол и гл; $C_R=2$ мг/мл.

Как видно из рисунка 1 на Сорбфиле на полимерной подложке и хроматографические зоны размыты. В результате хроматографирования на Сорбфиле на стеклянной подложке хроматографические зоны веществ не проявились. Наилучшим вариантом является использование пластин Сорбфил на алюминиевой подложке, так как образуются наиболее компактные зоны.

3.1.2 Выбор оптимальной подвижной фазы

На пластинах Сорбфил на алюминиевой подложке изучено хроматографическое поведение олеаноловой, глицирризиновой кислот в водно-органических ПФ на основе изопропанола, н-пропанола и ацетонитрила, концентрацию органической составляющей в которых варьировали в интервале от 5 до 80 об. %. При определении оптимальной концентрации органического растворителя в подвижной фазе, было выявлено расслоение подвижных фаз, содержащих изопропанол при концентрации, большей 10 об. %. В связи с этим, в качестве гомогенизатора смеси была выбрана ледяная уксусная кислота, концентрации 18 об. % (выбрана экспериментально), которая, кроме того, переводит исследуемые нами сапонины в молекулярную форму, что позволяет с большей точностью оценить их хроматографическое поведение в выбранных системах. В таблицах 1, 2 а также на рисунках 1, 2 приведены контролируемые параметры подвижности сапонинов для различных водно-органических систем.

Таблица 1- Хроматографические параметры системы изопропанол-уксусная к(18%)-вода

W% изопр	Rf		Δ Rf
	олеан	глицир	

20	0	0,18	0,18
30	0,36	0,43	0,07
40	0,37	0,52	0,15
50	0,42	0,55	0,13
60	0,46	0,63	0,17

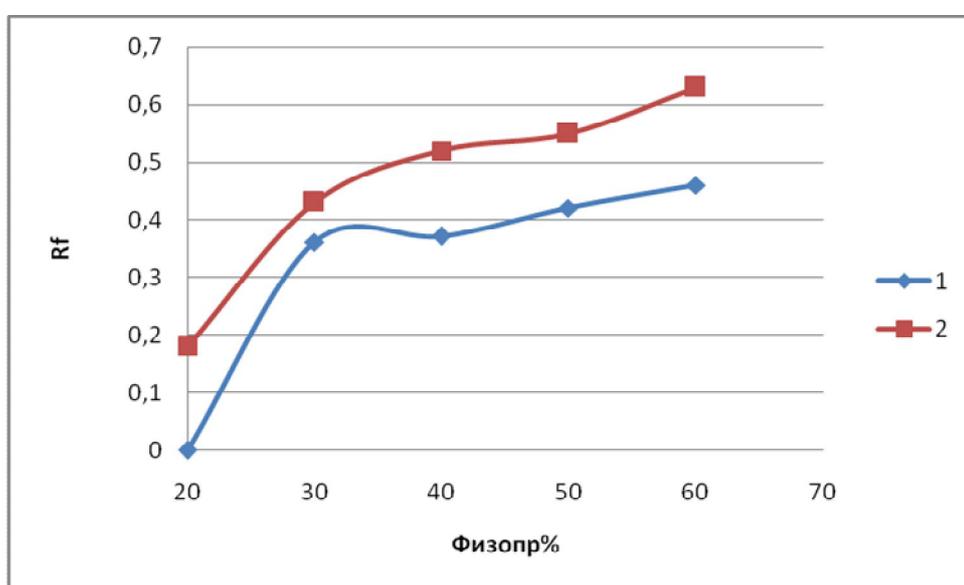


Рис 1- Графики зависимостей подвижности сапонинов системе системы изопропанол-уксусная к(18%)-вода

В таблице 1 и на рисунке 1 представлены данные поведения сапонинов в водно-изопропанольных смесях. Видно, что олеаноловая кислота незначительно изменяет значение R_f с увеличением концентрации изопропанола. Более резкие изменения в величинах R_f наблюдается для глицирризиновой кислоты.

Исходя из значений параметров ΔR_f установлено, что оптимальной концентрацией бутанола для разделения олеаноловой и глицирризиновой кислот является 40 % по объёму. До 40 об. % растворителя разделения не наблюдается, т.к. зоны олеаноловой кислоты остаются на линии старта. При

концентрации н-бутанола белее 40 об. % образующиеся зоны достаточно компактны.

Таблица 2-Хроматографические параметры системы н-пропанол-уксусная к.(18%)-вода; $C_R = 2$ мг/мл.

W% н-проп	Rf		ΔRf
	олеан	глицир	
20	0	0,57	0,57
30	0	0,64	0,64
40	0,41	0,67	0,26
50	0,46	0,78	0,32
60	0,51	0,86	0,35

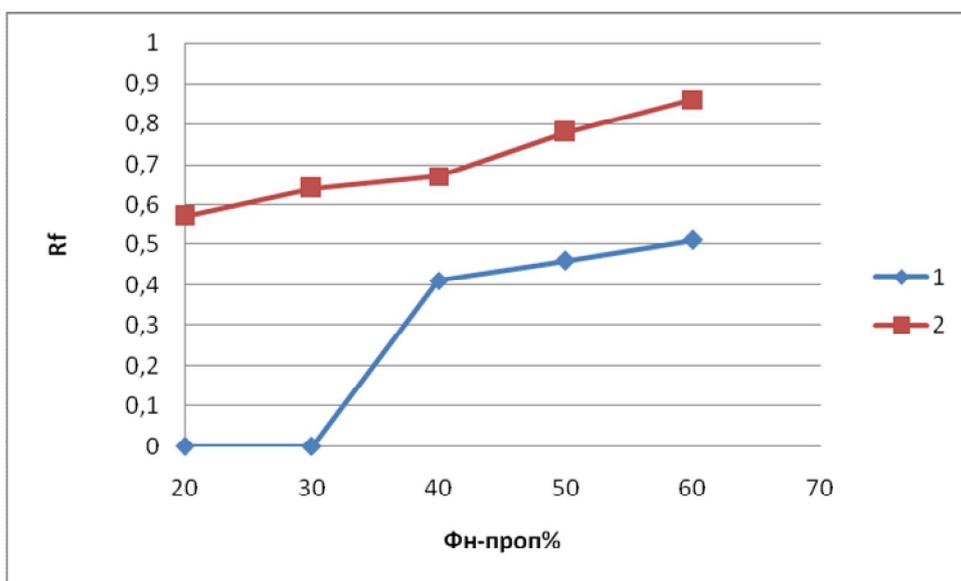


Рис 2- Графики зависимостей подвижности сапонинов в системе н-пропанол-уксусная к.(18%)-вода; $C_R = 2$ мг/мл.

В таблице 2 и на рисунке 2 представлены данные поведения олеаноловой и глицирризиновой кислот в водно-пропанольных смесях. Из графика видно, что олеаноловая кислота начинает свое движение при концентрации н-пропанола более 30 об.% причем при всех концентрациях зоны размыты и плохо разделены между собой, а, следовательно, не подходят для дальнейшего исследования.

Таблица 3 – Подвижность смеси сапонинов в системе ацетонитрил – вода

W% ацетонит	Rf		ΔRf
	олеан	глицир	
60	0,52	0,46	0,06
70	0,59	0,54	0,05
80	0,65	0,62	0,03

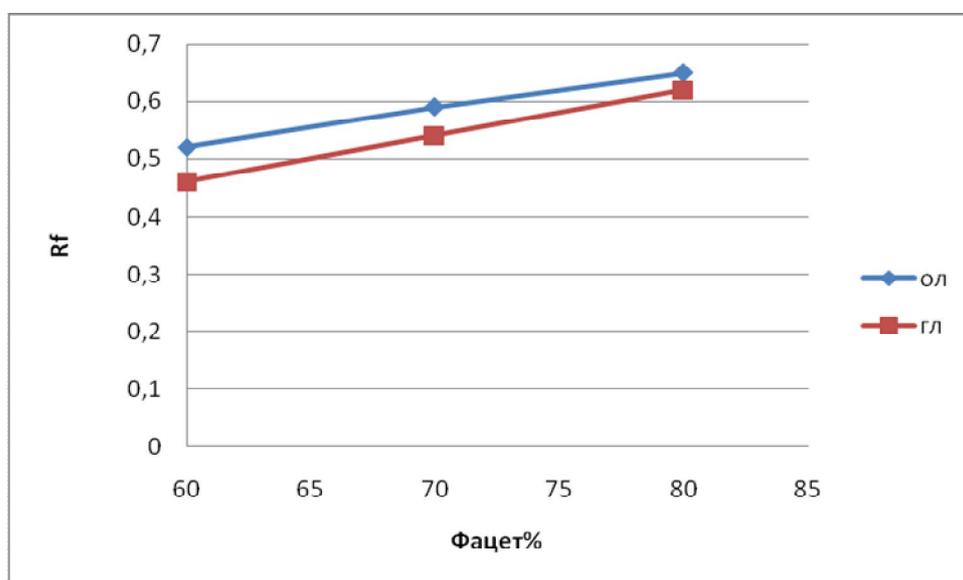


Рис 3-Графики зависимостей подвижности сапонинов системе ацетонитрил – вода. 1 – ол; 2 –гл; $C_R = 2$ мг/мл.

На графике представлены данные поведения глицирризиновой и олеаноловой кислот в ацетонитрильных смесях. До концентрации

ацетонитрила 60 об.% сапонины оставались на линии старта. Движение сапонинов началось при концентрации больше 60об.% ,при этом зоны плохо разделены между собой и сильно размыты, следовательно не подходят для дальнейшего исследования.

При исследовании водно-бутанольной системы зоны веществ олеаноловой и глицириззиновой кислот при любых концентрациях двигались вместе с фронтом элюента. Таким образом для разделения исследуемых веществ, нами был выбран изопропанол в концентрации 40 % по объёму в качестве органической составляющей подвижной фазы и уксусная кислота в концентрации 18 об. % для гомогенизации ПФ.

Водно-мицеллярные подвижные фазы

В настоящем разделе исследованы ПФ на основе поверхностно-активных веществ. Концентрацию ПАВ в ПФ выбирали выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), т. е. использовали мицеллярную ТСХ.

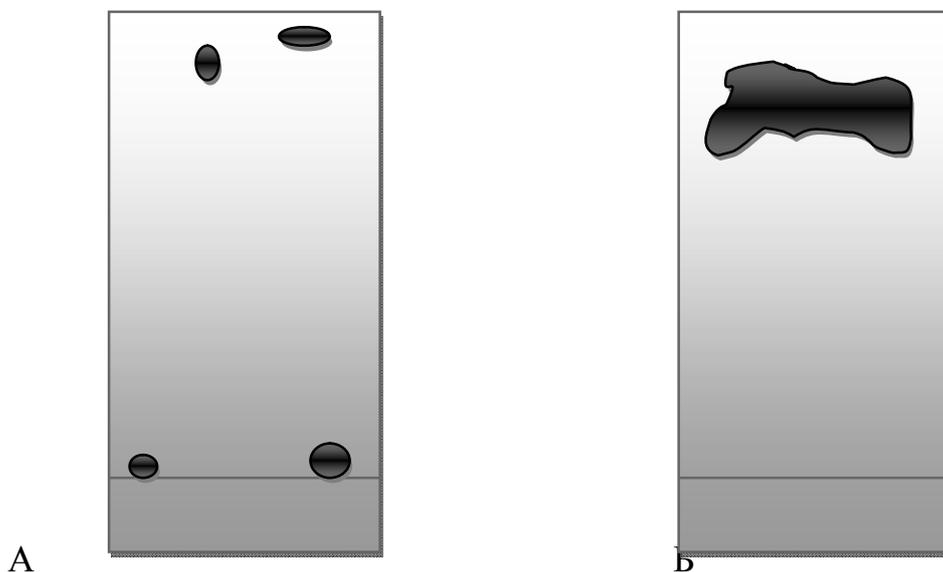


Рисунок 4-Влияние природы подвижной фазы на хроматографическое поведение ол,гл. кис ПФ: а-ЦПХ-вода($C_{\text{ПАВ}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$) ; б-ДДС – вода ($C_{\text{ПАВ}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$). ПФ: Сорбфил на алюминиевой подложке. 1 – ол, 2 – гл, 3 – смесь ол, гл; $C_{\text{R}} = 2 \text{ мг/мл}$.

На рисунке 4 приведены хроматограммы исследования сапонинов в водно-мицеллярных ПФ. Видно, что хроматографируется только глицирризиновая кислота из смеси в системе ЦПХ – вода ($C_{\text{ЦПХ}} = 1 \cdot 10^{-3}$ М), в то время как в ДДС – вода ($C_{\text{ДДС}} = 1 \cdot 10^{-2}$ М) хроматографические зоны всех веществ продвигались с фронтом элюента и сливались друг с другом.

Установлены зависимости подвижностей хроматографических зон двух веществ от природы и концентрации ПАВ в МПФ (таблица 4, рисунок 4-5).

Таблица 4-Подвижность смеси сапонинов в системе ЦПХ-вода:

$C \cdot 10^3$ (ЦПХ), М	$Rf_{\text{ол}}$	$Rf_{\text{гл}}$
1	0	0,88
2,5	0	0,93
5	0,07	0,89
7,5	0,09	0,86
10	0,03	0,81

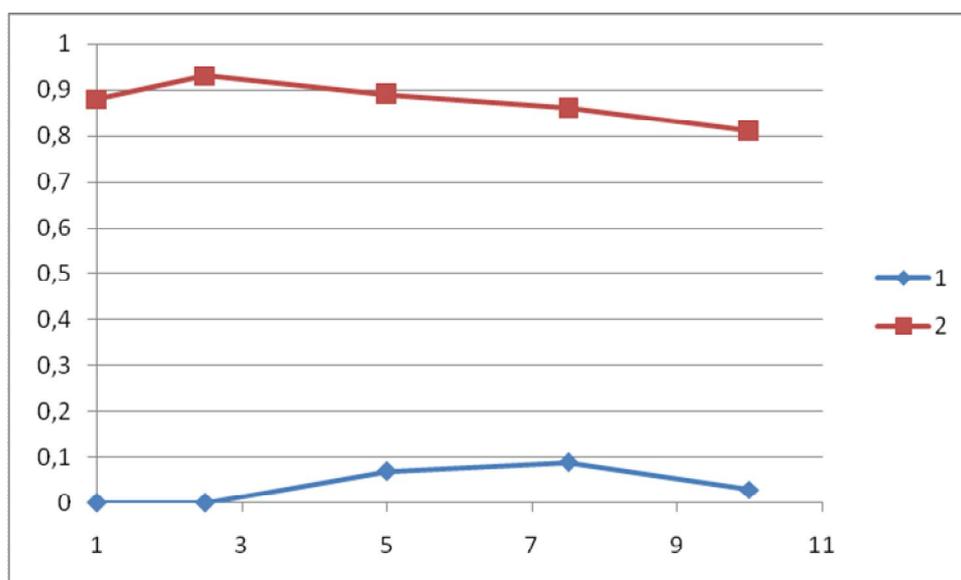


Рисунок 5- Графики зависимостей подвижности сапонинов в системе ЦПХ-вода.

Из графика 5 видно, что зоны олеаноловой кислоты остаются на старте, однако при концентрациях $5 \cdot 10^{-3}$ - $7,5 \cdot 10^{-3}$ М наблюдается их движение. При этом подвижность глицирризиновой кислоты незначительно уменьшилась с увеличением концентрации ПАВ.

Также было установлено, что в ПФ на основе ДДС все сапонины двигались с фронтом ПФ.

Исходя из представленных данных, можно сделать вывод, что система ЦПХ-вода более подходит для дальнейшей модификации органическим растворителем.

Количественное определение сапонинов в биологических объектах методом ТСХ

В данном разделе показана возможность применения мицеллярной и водно-органической ТСХ для количественного определения олеаноловой и глицирризиновой кислот в лекарственных растениях.

Таблица 5- Сравнение метрологических характеристик градуировочных графиков

Характеристики	Водно-органическая ПФ		Мицеллярная ПФ	
	олеаноловая кислота	глицирризиновая кислота	олеаноловая кислота	глицирризиновая кислота
Уравнение градуировочного графика	$y = 10575x + 66684$	$y = 12382x + 75082$	$y = 69006x + 3093$	$y = 10184x + 27189$
Коэффициент корреляции (R^2)	0,961	0,944	0,973	0,961
Интервал линейности, мг/мл	0,25-3,0	0,25-3,0	0,25-3,0	0,25-3,0
чувствительность ($\text{tg } \alpha$)	0,52	0,63	0,47	0,69

Выводы

1.Собраны, обобщены и проанализированы литературные данные по хроматографическим методам определения сапонинов в реальных объектах. Установлено, что наиболее перспективными в анализе являются методы ТСХ и ВЭЖХ.

2.Методом ТСХ изучено хроматографическое поведение олеаноловой и глицирризиновой кислот в водно-органических подвижных фазах. Установлено, что оптимальной водно-органической ПФ является система изопропанол (15%) – ледяная уксусная кислота (18%) – вода. Оптимальной НФ являются пластины Сорбфил на алюминиевой подложке.

3.Изучено хроматографическое поведение олеаноловой, глицирризиновой кислот в мицеллярных ПФ различной природы, модифицированных органическим растворителем. Установлено, что наиболее эффективными системами являются элюенты состава изопропанол (15%) –ЦПХ ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л), НФ – Сорбфил на алюминиевой подложке.

4.Методом модифицированной мицеллярной ТСХ определено содержание олеаноловой, глицирризиновой кислот в экстракте перечной мяты и настойки корней солодки. Значение S_r не превышало 0,08.