
Określenie tożsamości wybranych alkaloidów metodą chromatografii cienkowarstwowej

Chromatografia obejmuje techniki oparte na podziale składników mieszaniny pomiędzy dwie nie mieszające się fazy, z których jedną jest faza nieruchomą (stacjonarną; w TLC jest to cienka warstwa adsorbentu umieszczona na nośniku), a druga jest fazą ruchomą (rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników). Rozdział składników mieszaniny jest zależny od ich powinowactwa do obu faz. Większe powinowactwo składników do fazy ruchomej powoduje ich szybsze przemieszczanie się na chromatogramie, w przeciwieństwie do składników o większym powinowactwie do fazy nieruchomej.

W *analizie jakościowej* wykorzystuje się położenie pików (lub plamek) na chromatogramach. Obserwacje można prowadzić w zakresie UV dla składników nie wymagających barwienia, jak również po uprzednim wybarwieniu chromatogramów. Do identyfikacji wykorzystywane są także widma absorpcji zarejestrowane densytometrycznie bezpośrednio z chromatogramu, charakterystyczne dla badanych składników.

Wielkością charakteryzującą przemieszczanie się badanej substancji jest współczynnik opóźnienia (R_F), który określa stosunek drogi migracji danego składnika (A) do całkowitej drogi przebytej przez fazę ruchomą (B): $R_F = A/B$. Wartość R_F stanowi podstawę analizy jakościowej.

Natomiast *analiza ilościowa* opiera się na porównaniu wielkości plamek i intensywności ich zabarwienia (lub pól powierzchni pików zarejestrowanych na densytogramach) dla składników badanej mieszaniny oraz odpowiednich substancji wzorcowych.

Wykrywalność metody analitycznej określa najmniejsze stężenie lub ilość substancji, jaką można daną metodą wykryć.

Oznaczalność metody analitycznej określa najmniejszą ilość substancji lub jej najmniejsze stężenie, jakie można oznaczyć ilościowo daną metodą.

Do wyznaczenia granicy wykrywalności i oznaczalności w metodach chromatograficznych wykorzystuje się stosunek sygnału analitycznego do poziomu zakłóceń (szumów) tła.

Za *granicę wykrywalności* (limit of detection, **LOD**) przyjmuje się takie stężenie (ilość) analitu, który daje wartość sygnału analitycznego ok. 2-3 razy większą od poziomu szumów.

Za *granicę oznaczalności* (limit of quantitation, **LOQ**) przyjmuje się takie minimalne stężenie (ilość) analitu, które daje sygnał, umożliwiający uzyskanie precyzyjnych i dokładnych wyników. Akceptowany jest sygnał ok. 10 razy większy od poziomu szumów.

Granicę wykrywalności i oznaczalności można wyznaczyć metodą wizualną lub instrumentalną.

Odczynniki:

Roztwory wzorcowe: metanolowe roztwory wybranych alkaloidów:

- 0,5 % siarczan atropiny
- 0,5 % chlorek chininy
- 0,5 % fosforan kodeiny
- 0,5 % chlorowodorek lidokainy
- 0,5 % chlorowodorek polokainy

Faza stacjonarna:

płytki aluminiowe TLC pokryte żelem krzemionkowym (Kieselgel 60) z czynnikiem fluoryzującym F254

Faza ruchoma:

metanol – amoniak 25% (50 : 0,5 v/v)

Odczynnik Dragendorffa:

A. 0,85 g zasadowego azotanu(V) bizmutu(III) (hydroksyazotanu(V) bizmutu(III)) rozpuścić w 10 mL lodowatego kwasu octowego i 40 mL wody

B. 8 g jodku potasu rozpuścić w 20 mL wody

Roztwór podstawowy: roztwory A i B zmieszane w stosunku 1:1

Roztwór dodatkowy: mieszanina 2 mL lodowatego kwasu octowego i 10 mL wody

Odczynnik wywołujący stanowi mieszanina roztworu podstawowego i uzupełniającego zmieszanych w proporcji **1:3**

Wykonanie oznaczenia:

1. Na płytki nanieść za pomocą kapilary roztwory wzorcowe oraz badane mieszaniny, w odległości 1 cm od dolnej krawędzi płytki (linia startu) i 1 cm od jej brzegów. Między brzegami nanoszonych pasm zachować 0,5 cm odstępy. Roztwory nanosić porcjami, kilkakrotnie, po odparowywaniu rozpuszczalnika.
 2. Po całkowitym wyschnięciu plamek, płytki umieścić w komorze chromatograficznej (nasyconej fazą ruchomą przez 15 minut).
- Chromatogramy rozwijać do wysokości 0,5 cm od górnej krawędzi płytki.
3. Płytki wysuszyć w temperaturze pokojowej.
 4. Wybarwić płytki za pomocą odczynnika Dragendorffa, przygotowanego bezpośrednio przed użyciem.
 5. Obliczyć wartości współczynników opóźnienia dla każdej plamki; wzorców oraz wszystkich składników badanej próbki.

6. Na podstawie porównania wartości R_F uzyskanych dla substancji wzorcowych oraz składników próbek badanych określić tożsamość alkaloidów w otrzymanych do badania próbkach.