

Gyógynövény- és drogismeret gyakorlatok: növényi drogok morfológiai és analitikai vizsgálata

Szerzők:

Rédei Dóra

Vasas Andrea

Veres Katalin

Lektorálta:

Prof. Dr. Deli József, intézetigazgató egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem, Farmakognóziai Intézet

Szeged, 2015.

A tananyag az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával készült, a TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001 azonosítószámú, „Az élettudományi-klinikai felsőoktatás gyakorlatorientált és hallgatóbarát korszerűsítése a vidéki képzőhelyek nemzetközi versenyképességének erősítésére.” című projekt keretében.

Tartalomjegyzék

Előszó.....	1
1. Munka- és balesetvédelem	2
2. Alapvető növénykémiai ismeretek, elválasztástechnikai műveletek.....	4
2.1. Növényi drogok (Plantae medicinales).....	4
2.2. Kivonás (extrakció)	7
2.3. Kromatográfia.....	9
2.3.1. A kromatográfia definíciója, kromatográfiás elválasztás	9
2.3.1.1. A kromatográfiás elválasztás folyamata.....	10
2.3.1.2. A kromatográfiás módszerek felosztása.....	10
2.3.2. A kromatográfiás módszerek osztályozása a mozgófázis halmazállapota alapján .	11
2.3.2.1. Gázkromatográfia	11
2.3.2.2. Szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC).....	15
2.3.2.3. Folyadékkromatográfia	17
2.3.3. A kromatográfiás módszerek osztályozása az állófázis térbeli elrendeződése alapján.....	18
2.3.3.1. Planáris kromatográfiás módszerek.....	18
2.3.3.1.1. Papírkromatográfia	18
2.3.3.1.2. Rétegekromatográfia (Thin Layer Chromatography, TLC)	18
2.3.3.2. Oszlopkromatográfiás módszerek	32
2.3.3.2.1. Klasszikus (folyadék) oszlopkromatográfia (CC)	32
2.3.3.2.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	35
2.3.4. A kromatográfia felosztása a kromatográfiás elválasztás alapját képező fiziko-kémiai folyamatok, elválasztási mechanizmusok alapján	42
2.3.4.1. Adszorpciós kromatográfia	43
2.3.4.2. Megoszlásos kromatográfia.....	44
2.3.4.3. Ioncserés kromatográfia	44
2.3.4.4. Gélkromatográfia.....	45
2.3.4.5. Affinitási kromatográfia	47
2.3.5. A kromatográfiás módszerek osztályozása a mozgófázis áramoltatása, a ható erők alapján.....	48
2.3.6. A kromatográfiás módszerek osztályozása a kifejlesztés alapján.....	48
2.3.7. A kromatográfiás módszerek osztályozása a mozgófázis változása alapján	48

3. Drogok vizsgálata	54
3.1. Szénhidráttartalmú drogok vizsgálata	54
3.2. Zsíros olajok vizsgálata	66
3.3. Aszkorbinsav-tartalmú drogok vizsgálata	69
3.4. Alkaloidtartalmú drogok vizsgálata.....	75
3.5. Illóolajtartalmú drogok vizsgálata	97
3.6. Iridoidokat, keserűanyagot tartalmazó drogok vizsgálata	114
3.7. Szaponintartalmú drogok vizsgálata.....	119
3.8. Szívreható glikozidokat tartalmazó drogok vizsgálata	123
3.9. Triterpéneket tartalmazó drogok vizsgálata	127
3.10. Antranoidtartalmú drogok vizsgálata	132
3.11. Flavonoidtartalmú drogok vizsgálata	136
3.12. Cserzőanyagtartalmú drogok vizsgálata	144
3.13. Hidrokinontartalmú drogok vizsgálata	148
3.14. Ginseng-szaponin tartalmú készítmények vizsgálata	151
4. Irodalomjegyzék.....	155
5. Melléklet.....	156

Előszó

A *Gyógynövény- és drogismeret gyakorlatok: növényi drogok morfológiai és analitikai vizsgálata* című jegyzet a Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziai Intézete által gyógyszerészhallgatóknak oktatott Gyógynövény- és drogismeret gyakorlatokon elvégzendő feladatokhoz nyújt segítséget. A jegyzet elején lévő *Alapvető növénykémiai ismeretek, elválasztástechnikai műveletek* című fejezet a legfontosabb általános drogvizsgálati módszereket foglalja össze, majd egy részletes áttekintést nyújt a növénykémiaiában leggyakrabban alkalmazott kromatográfiás módszerek elméletéről és gyakorlatáról. A harmadik fejezet a hallgatók által vizsgált drogok leírását, azonossági és tartalmi vizsgálatainak receptúráit tartalmazza. A gyakorlatokon elvégzett feladatok eredményeit és a velük kapcsolatos tapasztalatokat, megfigyeléseket a hallgatók külön jegyzőkönyvben vezetik. A kurzus sikeres teljesítéséhez szükséges további elméleti tudnivalók a szemináriumokon elhangzottak révén sajátíthatók el. Ehhez nyújt további segítséget a jegyzet végén található képlet-, drogfotó- és növényábra-gyűjtemény.

Prof. Hohmann Judit

1. Munka- és balesetvédelem

1.1. Laboratóriumi munkavégzéssel kapcsolatos általános szabályok, munkavédelmi előírások

A kémiai laboratóriumi gyakorlatokon veszélyes, mérgező vegyszerekkel is dolgozunk, de kellő körültekintéssel és az előírások pontos betartásával a balesetek megelőzhetőek, elkerülhetőek.

- ! A laboratóriumban egyedül dolgozni, és engedély nélkül kísérleteket végezni tilos.
- ! A laboratóriumi munka során begombolt köpeny viselése kötelező, a hosszú haját megfelelő módon össze kell kötni.
- ! A laboratóriumban étkezni és inni szigorúan tilos.
- ! Tilos eszközöket, vegyszereket a laboratóriumból kivinni.
- ! A laboratóriumi asztalon csak a szükséges eszközök és a jegyzőkönyv lehet.
- ! A laboratóriumi asztal tisztaságára mindig vigyázzunk! Az asztalra került vegyszert papírtörülkövel azonnal töröljük le!
- ! A munkát csak akkor lehet elkezdni, ha tudjuk az elvégzendő munka legfontosabb lépéseit, ismerjük a felhasználandó vegyszerek tulajdonságait, károsító hatásait.
- ! Minden vegyszert mérgezőnek kell tekinteni, és felcímkézett, zárt edényben kell tárolni.
- ! A kísérletek elvégzése előtt győződjünk meg arról, hogy a megfelelő vegyszert, reagenst használjuk!
- ! Kézzel semmilyen vegyszerhez ne nyúljunk, használjunk spatulát, csipeszt, vegyszeres kanalat, pipettázáskor pedig dugattyús pipettát! Különösen veszélyes anyagok esetén használjunk gumikesztyűt!
- ! Az oldószerek, vegyszerek használata után azonnal zárjuk le az edényt! Ügyeljünk arra, hogy ne keverjük össze az üvegek dugóit!
- ! A gyakorlat során a vegyszereket, reagenseket – amelyekre már nincs szükség – mindig tegyük vissza a helyére!
- ! Használat előtt minden üvegeszközt át kell vizsgálni, nincs-e rajta törés, repedés. Sérült üvegeszközt ne használjunk!
- ! A reakciók elvégzésekor a kémcsövet sose fordítsuk magunk, vagy a társaink felé!
- ! A Bunsen-égő meggyújtásánál először az égő gyufát tartjuk az égő fölé, és csak ezután nyissuk ki a gázcsapot!
- ! Elektromos eszköz használatakor ügyeljünk arra, hogy azt a munka során nedves kézzel ne érintsük meg!

- ! Gyúlékony oldószerekkel (pl. étérrel, hexánnal, alkohollal) történő munkavégzés esetén a laboratóriumban nyílt láng használata tilos. A szerves oldószereket tartalmazó reakcióelegyek forró vízfürdőn történő melegítését, illetve növények szerves oldószerrel vízfürdőn történő kivonását mindig működő vegyifülkében végezzük!
- ! A laboratóriumban található lefolyókba vegyszert önteni tilos. A használt oldószerek gyűjtésére szolgáló egyéb oldószeres és halogénezett oldószeres gyűjtők megtalálhatóak minden laboratóriumban.
- ! A gyakorlat végén a használt üvegeszközöket tisztára mosva tegyük vissza a szekrényekbe!

1.2. Baleset- és tűzvédelmi tudnivalók, elsősegélynyújtás

- ! Minden hallgató ismerje a tűzoltó készülék, tűzoltó homok, biztonsági zuhany és tűzoltó pokróc helyét és használatát, az elsősegélynyújtó doboz helyét!
- ! Minden hallgató ismerje a laboratóriumi menekülési útvonalakat és vészkijáratokat!
- ! Minden sérülést és balesetet azonnal jelentsünk a laboratórium személyzetének!
- ! Ha kisebb mennyiségű oldószer gyullad meg, a tüzet az edény szájának óraüveggel történő lefedésével olthatjuk el. Nagyobb tűz esetén a laboratóriumban található kézi tűzoltó készüléket használjuk. Tilos vízzel oltani a vízzel nem elegyedő oldószert, a vízzel reagáló anyagot és feszültség alatti elektromos berendezést.
- ! Égési sérülés esetén az égett bőrfelületet csapvízzel hűtsük!
- ! Vágási sérülés esetén a sebből az esetleges szennyeződést, üvegszilánkot távolítsuk el, a vágott seb környékét fertőtlenítsük, és a sebet steril kötéssel lássuk el!
- ! A bőrre kerülő vegyszereket bő vízzel azonnal mossuk le! Savak esetén azt követően nátrium-hidrogénkarbonát oldattal, lúgok esetén bórsav oldattal semlegesítsük az érintett bőrfelületet! Végül ismét vízzel öblítsük le!
- ! A bőrre kerülő koncentrált kénsavat először száraz ruhával töröljük le, és csak utána mossuk le a bőrfelületet bő vízzel, illetve semlegesítsük nátrium-hidrogénkarbonát oldattal!
- ! Szemsérülés esetén a szembe került vegyszert bő vízzel azonnal mossuk ki! Bármilyen természetű szemsérülés esetén a legrövidebb időn belül vigyünk a sérültet szakorvoshoz!
- ! Ha a mérgező anyag belégzéssel jut a szervezetbe, a sérültet azonnal vigyünk friss levegőre, és intézkedjünk orvosi ellátásáról!
- ! Áramütésnél legfontosabb a helyiség áramtalanítása.

2. Alapvető növénykémiai ismeretek, elválasztástechnikai műveletek

Drognak nevezzük azokat a növényi, vagy állati részeket (levél, gyökér), termékeket (tejnedv, gyanta, kígyóméreg, méz), melyet gyógyításra vagy betegségmegelőzésre alkalmaznak.

2.1. Növényi drogok (*Plantae medicinales*)

A növényi drogok általában feldolgozatlan, egész, darabolt vagy aprított növények, növényi részek, moszatok, gombák vagy zuzmók, amelyeket többnyire szárított, olykor friss állapotban használnak fel. Növényi drogok közé sorolnak ezen kívül bizonyos, még feldolgozatlan növényi váladékokat is.

A Gyógyszerkönyvek cikkelyei az adott drogra azonosító vizsgálatokat (morfológiai és kémiai) és sok esetben tartalmi vizsgálatokat írnak elő. Drogok azonosítása, minősítése, mennyiségi értékelése fizikai, biológiai, kémiai módszerek segítségével történhet. Fizikai módszerek közé tartozik pl. az összes hamu-, sósavban nem oldódó hamu- (homok-), szárazanyagtartalom, ill. szárítási veszteség meghatározása. Biológiai módszer pl.: organoleptikus és morfológiai vizsgálat, biológiai értékmérés. Kémiai módszerek: növénykémiai vizsgálatok, amelyekkel az egyes vegyülettípusok kimutathatók. Ezekkel a kvalitatív módszerekkel azonosíthatók a drogok, kimutathatók a hatóanyagok, mérgező anyagok, szennyezések. Kémiai eljárás segítségével kvantitatív meghatározás is elvégezhető.

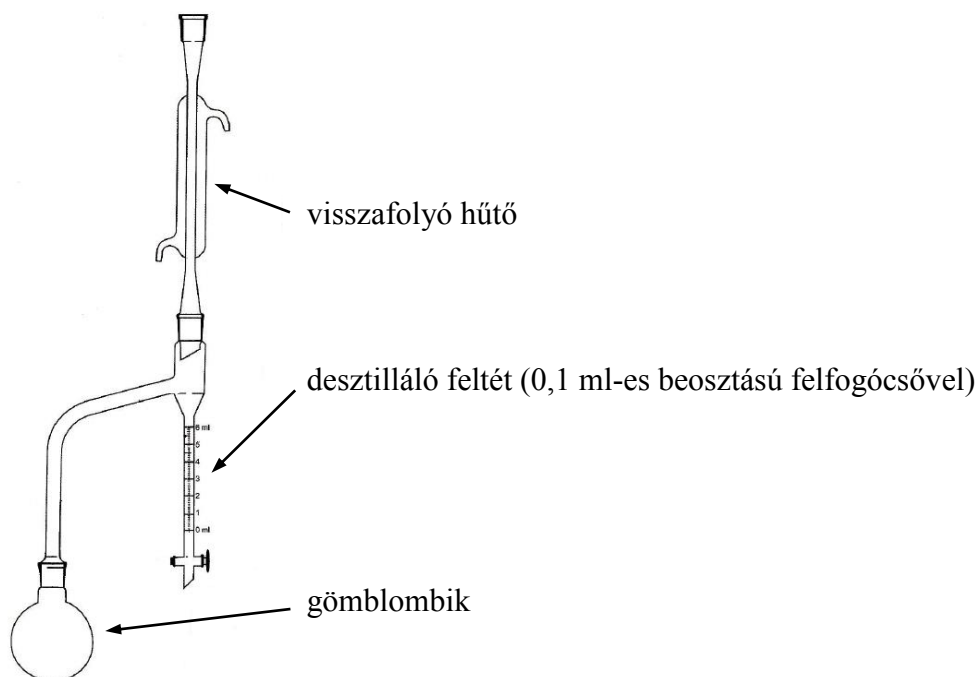
1, *Szárítási veszteség*

Szárítási veszteségnek a tömegszázalékban (%(m/m)) kifejezett tömegvesztiséget nevezzük (a drogból adott körülmények között eltávolítható víz mennyisége).

A szárítási veszteség meghatározásához 0,50 g finoman porított drogot, vagy vizsgálandó kivonatot gyorsan egy kb. 50 mm átmérőjű és kb. 30 mm magas, lapos aljú bepárlócsészébe mérünk. Az anyagot 3 órán át szárítószekrényben 100-105 °C-on szárítjuk, exsikkátorban R foszfor(V)-oxid vagy R vízmentes szilikagél felett hagyjuk lehűlni, majd lemérjük. A szárítási veszteséget tömegszázalékban (%(m/m)) fejezzük ki.

2, *Víz meghatározás desztillációval*

A nagy illóolajtartalmú drogok víztartalmát a szárítási veszteség vizsgálat helyett ezzel a módszerrel határozzuk meg.



1. ábra Készülék a desztillációval történő vízmeghathározáshoz

Vizsgálat menete: A készülék felfogócsővét és hűtőjét alaposan kitisztítjuk, vízzel átöblítjük, és kiszárítjuk. A kiszárított gömbloblikba 200 ml R toluolt és kb. 2 ml R vizet öntünk. A keveréket 2 órán át desztilláljuk, ezután kb. 30 percig hűlni hagyjuk, majd a víz térfogatát 0,05 ml potossággal leolvassuk. A vizsgálandó anyag várhatóan 2-3 ml vizet tartalmazó mennyiségét 1% pontossággal lemérjük, és a lombikba juttatjuk. Ha az anyag kenőcs állományú, fémfólia csónakba mérjük. A lombikba néhány horzsaköszemcsét szórunk, és óvatosan 15 percen át melegítjük. Amikor a toluol forni kezd, kb. 2 csepp/másodperc sebességgel addig desztilláljuk, amíg a víz zöme át nem desztillál, majd a desztilláció sebességét kb. 4 csepp/másodpercre változtatjuk. Amikor a víz teljes mennyisége átdestillált, a hűtőcső belső felületét R toluollal leöblítjük. A desztillációt még 5 percig folytatjuk, majd a melegítést abbahagyjuk, és a felfogócsövet szobahőmérsékletre hagyjuk lehűlni. A felfogócső falán maradt vízcseppeket a már összegyűjtött vízhez juttatjuk. A toluol és a víz teljes szétválása után a víz térfogatát leolvassuk, és az alábbi képlettel kiszámoljuk az anyag ml/kg-ban kifejezett víztartalmát:

$$\frac{1000(n_2 - n_1)}{m}$$

ahol:

m = a vizsgálandó anyag tömege grammban

n_1 = az első desztillációkor kapott víz térfogata milliliterben

n_2 = a két desztillációból együttesen kapott víz térfogata milliliterben

Hamutartalom: a drog hevítése, majd 600 °C-on történő izzítása (elégetése) után mért szervesetlen maradék.

Kvarc- vagy platinatégelyt 30 percen át vörösizzáson hevítünk. Exszikkátorban hagyjuk lehűlni, majd mérjük. Ha csak nincs más előírás, a vizsgálandó anyag, vagy elporított növényi drog 1,00 g-ját egyenletesen elterítjük a tégelyben, 100-105 °C-on 1 órán át szárítjuk, majd izzítókemencében 600 ± 25 °C-on tömegállandóságig izzítjuk. A tégelyt minden egyes izzítás után exszikkátorban hagyjuk lehűlni. Az izzítások során az anyag nem gyulladhat meg. Amennyiben a hamu többszöri kiizzítás után is tartalmaz fekete részecskéket forró vízzel felvesszük, hamumentes szűrőpapíron megszűrjük, és a maradékot a szűrőpapírral együtt elégetjük. A szüredéket a hamuval egyesítjük, óvatosan beszárítjuk, és a maradékot tömegállandóságig izzítjuk.

Sósavban nem oldódó hamutartalom (homoktartalom): a sósavban nem oldódó hamu a szulfáthamu vagy az összes hamu R tömény sósavban nem oldódó maradékának 100 g drogra vonatkoztatott mennyisége.

A szulfáthamu vagy az összes hamu meghatározásakor kapott maradékot tartalmazó tégelybe 15 ml R vizet és 10 ml R tömény sósavat öntünk. Az elegyet óraüveggel lefedve 10 percig óvatosan forraljuk, majd lehűtjük és hamumentes szűrőpapíron szűrjük. A maradékot forró vízzel addig mossuk, amíg a szüredék semleges nem lesz. Ezután megszáritjuk, elhamvasztjuk, majd vörösizzásig hevítjük. A maradékot exikátorban hagyjuk kihűlni, majd tömegét lemérjük. Az izzítást addig ismételjük, amíg két egymást követő mérés különbsége 1 mg.

Kivonatok szárazanyagtartalma: a szárazanyagtartalom meghatározásához 2,00 g vagy 2,0 ml vizsgálandó anyagot vagy kivonatot gyorsan egy kb. 50 mm átmérőjű és kb. 30 mm magas, lapos aljú bepárlócsészébe mérünk. Az anyagot vízfürdőn szárazra pároljuk, majd 3 órán át szárítószekrényben 100-105 °C-on szárítjuk. Exszikkátorban R foszfor(V)oxid vagy R vízmentes szilikagél felett hagyjuk lehűlni, majd lemérjük a tömegét. A szárítási maradékot tömegszázalékban (%(m/m)) vagy gramm/literben fejezzük ki.

2.2. Kivonás (extrakció)

Mivel a drogokban lévő vizsgálni kívánt anyagok egy rendkívül komplex környezetben, alacsony koncentrációban vannak jelen, fel kell dúsítani, esetleg izolálni kell őket. Ennek első lépése a kivonatkészítés lehet.

Az extrakció két fázis közötti anyagátvitel, amelynek célja egy sokkomponesű rendszerből (egyik fázis) egy vagy több komponens elkülönítése a másik fázisba; a fázisok közötti anyagátmenet a megoszlási egyensúly törvényszerűségein alapul. A kivonáshoz olyan oldószert használunk, amely előnyösen osztja meg a kivonandó komponenseket, a vegyületeket eredetileg tartalmazó fázis és önmaga között. Növénykémiai vizsgálatok során leggyakrabban szilárd-folyadék és folyadék-folyadék extrakciót alkalmazunk.

A kivonás célja lehet egyrészt a lehető legtöbbféle anyag kinyerése, másrészt csak egy anyag vagy speciális anyagkeverék elkülönítése. Az első esetben olyan kivonószert használunk, amely a legkülönbözőbb polaritású vegyületek kinyerésére alkalmas (pl. metanol).

Kivonatkészítés lépései

1. *Aprítás*: célja felületnövelés, a sejtek roncsolása. A drog aprításakor a drogrészek mérete csökken, nagyobb lesz a fajlagos felület. Ennek következtében nagyobb felületen érintkezik az oldószer (kivonószer) a droggal, így elősegíthető a kivonás. Aprítás során a sejtek egy részének sejtfaa sérül (roncsolódik). Ezen sejtekből a kivonás során a vegyületek szabad diffúzióval jutnak a kivonószerbe. Az ép sejtek esetén a vegyületek gátolt diffúzió során a sejtfaon (szemipermeábilis hártján) keresztül jutnak a kivonószerbe. Az aprítás mértékének növelésével nagyobb mennyiségben lesznek a porított drogon a roncsolt sejtek, ezért a kivonás gyorsabb, hatékonyabb lesz.
2. *Duzzasztás, nedvesítés*: a sejtfaa fellazítása, átjárhatóbbá tétele. A kivonást legtöbbször a duzzasztás előzi meg.
3. *Kivonás*

A kivonás hatékonyságát befolyásoló tényezők

- A drog aprítottságának mértéke.

Az aprítás fokának növelésével nő a drog fajlagos felületete, így könnyebb, gyorsabb, hatékonyabb a kivonás. A túlzott aprítás eredményeként azonban nehezebb lesz a szűrés.

- A kivonószer fajtája, anyagi minősége.

Elsősorban a kivonószer dipólusmomentuma, de más fizikai paraméterek is (viszkozitás, sűrűség, forráspont) befolyásolják a kivonás hatékonyságát.

- A kivonószer kémhatása befolyásolja a kivonandó anyag disszociációját, ami meghatározza az oldékonyságát (alkaloidok a drogban szerves savakkal képzett sók formájában vannak jelen, ásványi savakkal savanyítva vízzel sóformában nyerhetők ki, míg lúgosítva bázissá alakulnak, és szerves oldószerrel vonhatók ki).
- A kivonószer mennyisége.
- A kivonás időtartama.
- A kivonás során alkalmazott hőmérséklet.

A hőmérséklet emelésével nagyobb hatásfokú a kivonás. Hőérzékeny anyagok esetén csak szobahőmérsékleten vagy alacsonyabb hőmérsékleten lehet a kivonást végezni.

- Az alkalmazott kivonási eljárás.

Kivonási eljárások típusai

- a drog áll, a kivonószer áll [áztatás (maceráció), pállítás (digestió)]
- a drog mozog a kivonószerben (keverés, ráztatás)
- a drog áll, a kivonószer mozog (perkolálás, kivonás Soxhlet készülékkel)
- a drog és a kivonószer ellentétes irányban mozog (U-extraktor)

Kivonatkészítés perkolátorban

Szobahőmérsékleten történő kivonási módszer. Előnye: hőérzékeny anyagok kivonására is alkalmas. A perkolátorba töltött, duzzasztott drogra öntjük a kivonószert. Hátránya, hogy a teljes kivonáshoz sok oldószer szükséges.

Kivonatkészítés Soxhlet készülékkel

A Soxhlet készülék (2. ábra) szakaszosan működő kivonókészülék, amelyben a kivonószer forráspontján történik az extrakció. Kevés kivonószerezrel is igen hatékony, mert a többszöri kivonás mindig tiszta kivonószerezrel történik, magas hőmérsékleten. Hőre bomló anyagok kivonására nem alkalmas.



2. ábra Soxhlet készülék

2.3. Kromatográfia

2.3.1. A kromatográfia definíciója, kromatográfiás elválasztás

A kromatográfia speciális fizikai-kémiai elválasztási módszerek összessége, sokkomponensű minták összetevőinek egymástól való elkülönítésére. A komponensek elválasztásának alapja a minta komponenseinek ismételt megosztása két, egymással nem elegyedő, de egymással érintkező fázis között; a nagy felületű, rögzített álló- és a folyamatosan mozgásban tartott mozgófázis között.

Az állófázis lehet szilárd anyag egy csőbe töltve, vagy cső belső falán rögzítve, vagy sík réteget alkotva, de lehet szilárd felületen kötött folyadékréteg, vagy folyadék, a mozgó fázis pedig folyadék, szuperkritikus fluidum vagy gáz.

A mozgófázisba juttatott mintakomponensek a mozgófázissal az állófázisra jutnak, azzal különböző mértékű kölcsönhatásba kerülnek, visszatartódnak az állófázis által, ezért a mozgófázis áramlási sebességétől eltérő lesz a sebességük. Ezáltal jön létre elválasztásuk. Mozgási (migrálódási) sebességük tehát az álló és a mozgófázis közötti egyensúlyi megoszlásuk függvénye, és attól függ, hogy kölcsönhatásuk milyen mértékű az állófázissal, mennyi időt töltenek rajta.

A komponensek két fázis közötti megoszlásának (anyagátmenet) kialakulása egy reverzibilis szorpciós folyamat következménye. A komponensek adszorpcióval, abszorpcióval (megoszlással) vagy kemisorpcióval kerülnek az állófázisra, majd a mozgófázisba való visszajutásukhoz az ezeket követő deszorpció szükséges. A két fázis közötti megoszlás az egyensúlytól kissé eltérő kváziegyensúly létrejöttén keresztül valósul meg. Valódi megoszlási egyensúly beállítására nincs lehetőség, mert a mozgófázis folyamatos mozgásban van, de attól kissé eltérő, kvázi egyensúlynak megfelelő koncentráció viszonyok kialakulnak. A kvázi egyensúlynak megfelelően eltérő mértékben megosztott mintakomponenseket, amelyek a mozgófázisba visszakerültek, a mozgófázis újabb állófázis részre juttatja, ahol ismét beáll a kvázi egyensúly. A folyamat többször megismétlődik. A többszöri (kvázi) egyensúly beállítás és felbomlás következtében még a kis szerkezeti különbséggel rendelkező anyagok is elválaszthatók egymástól.

Az állófázis és a mintakomponensek közötti kölcsönhatáson kívül kölcsönhatás van még az elválasztási folyamat alatt a minta komponensei és a mozgófázis, valamint az álló- és a mozgófázis között is.

A **minta komponensei** és a **mozgófázis** közötti **kölcsönhatás** lényege, hogy az áramló mozgófázis minősége (pH-ja, ionerőssége, stb.) meghatározza az elválasztandó anyag állapotát (hidratáció-szolvatáció, virtuális molekulaméret, ionizáció, poláris-apoláris, dipólus hatások indukciója).

Az **álló-** és a **mozgófázis** közötti **kölcsönhatás** abban nyilvánul meg, hogy a mozgófázis megváltoztatja az állófázis szerkezetét, hidratáció-szolvatáció, polaritás változás, ionizáció, pórusméret változás jön létre. Nem változtatható meg a mozgófázis összetétele úgy, hogy ne változna meg az állófázis felülete, és ennek következtében kölcsönhatása a mintakomponensekkel.

2.3.1.1. A kromatográfiás elválasztás folyamata

A vizsgálandó mintát feloldjuk a megfelelő oldószerben és az oldatot (vagy annak kis térfogatát) az állófázisra juttatjuk, majd a mozgófázist bevezetjük a rendszerbe. A minta komponensei, miközben keresztülhaladnak az állófázison a mozgófázis hatására, az állófázissal való specifikus fiziko-kémiai kölcsönhatások révén megosztódnak a két fázis között, visszatartódnak (retardálódnak) az állófázis által, így késleltetést szenvednek a mozgófázis migrálódási sebességéhez képest. A visszatartás mértéke a vizsgálandó anyag és az állófázis tulajdonságaitól, valamint a mozgófázis összetételétől függ.

Az állófázisról eluálódott, részben vagy teljesen elválasztott komponensek vizuálisan, vagy fizikai, vagy kémiai tulajdonságaik alapján megkülönböztethetők egymástól, és mennyiségük is meghatározható. Ha a rendszerbe detektort helyezünk, oszlop elrendezésű kromatográfia esetén a detektorjelnek az idő függvényében való ábrázolásakor a minta komponenseket reprezentáló csúcssorozatot fogunk észlelni, azaz a komponensek koncentrációjának változását az oszlopról való kilépésnél az idő függvényében. Ez a **kromatogram**. Sík elrendezés esetén kromatogramnak nevezzük a kifejlesztés után az egyes komponenseknek megfelelően valamilyen módszerrel láthatóvá tett foltok rendszerét.

2.3.1.2. A kromatográfiás módszerek felosztása

A kromatográfiás módszerek csoportosítása különböző szempontok figyelembevételével történhet. Így fel lehet osztani a kromatográfiás módszereket

- a mozgófázis halmazállapota,
- az állófázis térbeli elrendeződése

- a kromatográfias elválasztás alapját képező fizikai-kémiai folyamatok, elválasztási mechanizmusok
- a mozgófázis áramlását (migrálódását) megvalósító erő jellege
- a kifejlesztés
- a mozgófázis változása, vagy változatlansága alapján.

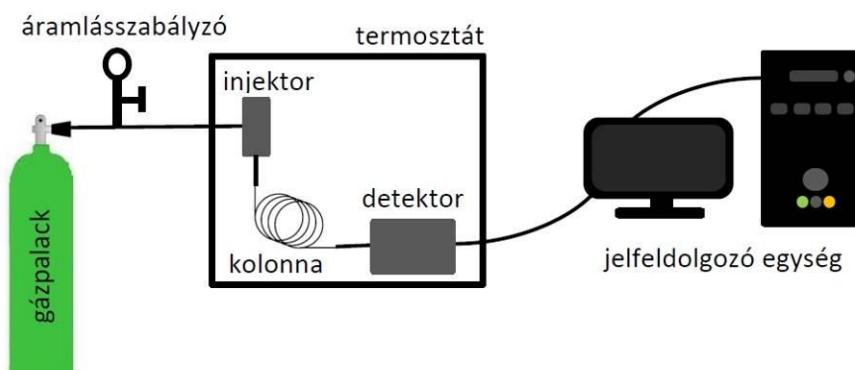
2.3.2. A kromatográfias módszerek osztályozása a mozgófázis halmazállapota alapján

A mozgófázis halmazállapota alapján megkülönböztetünk:

- gázkromatográfiát
- szuperkritikus fluid kromatográfiát
- folyadékkromatográfiát.

2.3.2.1. Gázkromatográfia

A gázkromatográfia olyan oszlopkromatográfias módszer, melynek állófázisa szilárd, vagy szilárd felületen kötött folyadék, mozgófázisa pedig nagy tisztaságú gáz. Egy gázkromatográf általános felépítését az 3. ábra szemlélteti.



3. ábra Egy gázkromatográf általános felépítése

A mozgófázis – amelyet a gázkromatográfiában vivőgáznak nevezünk – egy nagynyomású gázpalackból nyomáscsökkentő után, az áramlási sebesség folyamatos ellenőrzése mellett, 10-100 ml/perc térfogati sebességgel jut a kolonnára. A vivőgáz kis fajlagos szorpciójú gáz, ami nem kötődik az állófázison. Anyagi minőségét az alkalmazott detektor típusa határozza meg. Hővezetőképességi detektorhoz hidrogén vagy hélium, lángionizációs detektorhoz nitrogén vagy argon, elektronbefogásos detektorhoz pedig nagy tisztaságú héliumgáz alkalmazható.

A mintát, amely általában gáz, vagy folyadék (de lehet szilárd anyag is), gáz halmazállapotban juttatjuk a kolonnára. Tehát a mintabevitel során a folyadék, vagy szilárd halmazállapotú

mintákat el kell párologtatni, ezért a mérés ideje alatt a kolonnát és a detektort is olyan hőmérsékleten kell tartanunk (100-500 °C), hogy a minta mindvégig gáz halmazállapotú legyen. Ebből következik, hogy a gázkromatográfia olyan vegyületek elválasztására alkalmas, amelyek bomlás nélkül gázzá alakíthatók.

A mintaadagoló több okból is kritikus része egy gázkromatográfának. Egyrészt a hatékony elválasztás megköveteli a minta pillanatszerű elpárologtatását, vagyis hogy a minta egyszerre, a lehető leggyorsabban kerüljön be a vivőgáz áramba. Másrészt a kis térfogatú minták pontos, reprodukálható injektálása is nagy odafigyelést igényel. Ezen okok miatt többféle mintaadagoló rendszert is kidolgoztak. Ezek közül a legegyszerűbb az úgynevezett „on column” mintaadagolás, amely során a mintát egy fecskendő segítségével közvetlenül juttatjuk a kolonna bemenetére szerelt, gumiszeptummal lezárt fűtött kamrába. Ez a megoldás töltetes oszlopok esetén alkalmazható. Hőérzékeny vegyületek méréséhez programozottan fűthető mintaadagoló használható. Kapilláris kolonnák esetében a split/splitless injektálás a megfelelő megoldás. Az injektor split üzemmódjában a mintának csak egy kis része kerül a kolonnára, így megvalósítható a pillanatszerű injektálás. A minta feleslege gázáram segítségével távozik a split ágon. Az oszlopra kerülő minta mennyiségét a vivőgáz és a split ágon áramló gáz áramlási sebességének aránya határozza meg. A módszer hátránya, hogy nyomelemzéseknel ritkán alkalmazható, hiszen az egyébként is alacsony anyagmennyiség egy része elvész a split ágon. Splitless üzemmódban a minta legnagyobb része a kolonnára jut, ebben az esetben azonban romlik az elválasztás hatékonysága, hiszen a komponensek elpárologtatása nem lesz pillanatszerű. Ezért a mintakomponenseket fókuszálni kell az oszlop az elején, vagyis injektáláskor az oszlop hőmérsékletének legalább 20 °C-kal alacsonyabbnak kell lennie, mint a minta legillékonyabb komponensének a forráspontja. Az injektálás alatt és utána adott ideig (splitless idő) a split ág zárva van, ekkor a vivőgáz az injektorból ráöblíti a minta komponenseit az oszlopra, ahol fókuszálódnak. A splitless idő végén a split ág nyitott állásba kerül, az injektorban maradt anyagok távoznak a split ágon, az injektor gőztere kitisztul. Ezzel párhuzamosan megindul az előre beprogramozott hőmérsékletprogram, aminek következtében a minta komponensei forráspontjuk és polaritásuk szerint szeparálódnak az oszlopon.

Az elválasztásra szolgáló kolonna üveg-, vagy acélsőből készül, megjelenését tekintve lehet töltetes vagy kapilláris oszlop.

A töltetes oszlopok belső átmérője 2-6 mm, és viszonylag rövidek, hosszúságuk 1-5 méter, (körülményesebb előállításuk miatt). Ezen oszlopok hordozó töltete nagy fajlagos felületű, megfelelő mechanikai szilárdságú inert anyag (pl. polimerek), amelynek felületén egyenletes

filmet képezve jól tapad a megosztófolyadék. Előállításuk során a megosztófolyadékot megfelelő oldószerben feloldják, ehhez az oldathoz hozzáadják a szilárd hordozót, majd az oldószer lassan elpárologtatják. Végül az így elkészített állófázissal töltik meg az oszlopot. Töltetes kolonna előállítható még szilárd adszorbenssel (pl. alumínium-oxid, szilikagél, aktív szén) történő megtöltéssel. A töltetes kolonnák kapacitása méretükből adódóan nagy, így nagyobb (néhány μl) mintamennyiségekkel dolgozhatunk.

A kapilláris oszlopok belső átmérője 0,1-0,5 mm, hosszúságuk pedig 10-100 méter. Ezek az oszlopok nem tartalmaznak szemcsés töltetet, a megosztófolyadékot vékony filmként viszik fel közvetlenül a cső belső falára. Az előállítás során a megosztófolyadékot megfelelő oldószerben oldják, majd nyomás alatt átpréselik az oszlopon. A modernebb kapilláris kolonnákban a megosztófolyadékot valamilyen kémiai kötéssel, általában szilanizálással rögzítik a cső falához, ami megakadályozza a folyadék vivőgázzal történő lehordását, így növelve a kolonna élettartamát. Ezen oszlopok kapacitása kicsi, ezért csak igen kis (a μl törtrésze) mintamennyiség injektálható rájuk. Az elválasztáshoz használt oszlopot az elválasztandó mintakomponensek anyagi minősége, kémiai tulajdonságai alapján választjuk ki. Poláris vegyületekhez poláris állófázist (pl. polietilén-glikolok), míg apoláris komponensekhez apoláris állófázist (pl. polipropilén) alkalmazhatunk.

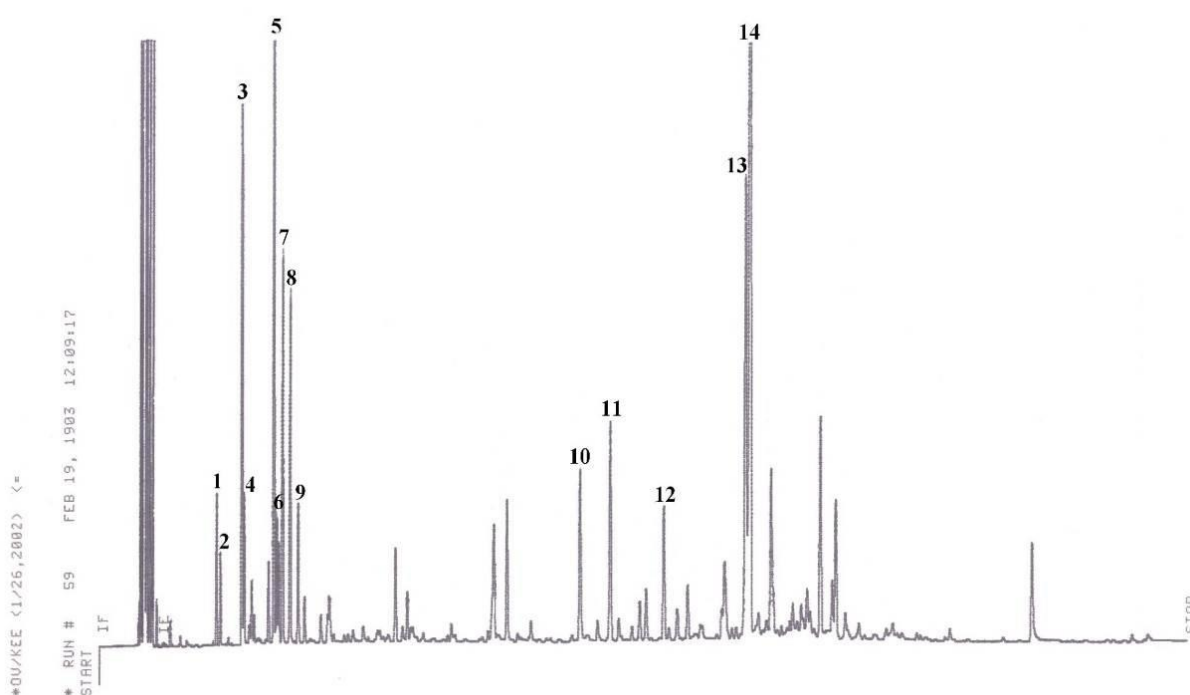
Az elválasztást követően a mintakomponensek a kolonnáról a detektorba jutnak, amely az analit tömegáramára érzékeny jelképző egység. Számos, a vegyületek különböző fizikai és kémiai tulajdonságainak mérésén alapuló detektortípust dolgoztak ki. Ezek közül az alábbiakban csak a két legelterjedtebben használt detektor ismertetésére kerül sor.

A *hővezetőképességi detektor* (TCD) érzékelője egy fűtött fémszál, amelyet egy kisméretű cellában helyeznek el. A fémszál hőmérséklete a körülötte áramló gáz hővezetőképességétől függ, ellenállása pedig hőmérsékletével arányos. A mérés kezdetén, amikor csak tiszta vivőgáz áramlik a fémszál körül, egy adott ellenállásérték mérhető. Ha a cellába rosszabb hővezetőképességű gázok (a mintakomponensek) jutnak, a szál kevésbé hűl le, így nagyobb ellenállás mérhető. A TCD detektor univerzális detektor, vagyis a vivőgázon kívül minden egyéb komponens mérésére alkalmas.

A *lángionizációs detektor* (FID) egy H_2 /levegő eleggyel táplált láng, amely fölött egy elektród pár található. Az elektródok közé akkora feszültséget kapcsolnak, hogy a nehezen ionizálható vivőgázban nem jön létre szikrakisülés, azonban az oszlopról érkező mintakomponensek a lángban oxigén segítségével ionizálódnak. Az ionok keletkezésének hatására az elektródok között áram folyik, amely megfelelő erősítés után mérhető, és arányos a

vegyületek mintabeli koncentrációjával. A FID detektor szintén univerzális gázkromatográfiás detektor.

Az adott detektorral mért jelet az idő függvényében ábrázolva egy, a minta összetettségétől függő csúcssorozatot kapunk, amelyet kromatogramnak nevezünk. A 4. ábrán egy tipikus gázkromatogram látható. Egy kromatogram minőségi és mennyiségi információt is hordoz magában.



4. ábra *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* illóolaj FID detektorral kapott gázkromatogramja (1 = α -tujén, 2 = α -pinén, 3 = szabinén, 4 = β -pinén, 5 = *p*-cimén, 6 = limonén, 7 = β -fellandré, 8 = (*Z*)- β -ocimén, 9 = γ -terpinén, 10 = β -burbonén, 11 = β -kariofillén, 12 = germakrén D, 13 = spatulenol, 14 = kariofillén-oxid)

A legegyszerűbb minőségi meghatározás során a redukált retenciós időket (t_R') használjuk fel:

$$t_R' = t_R - t_0$$

ahol t_R a retenciós idő (az az idő, amely a mintának a mozgófázisba juttatásától a komponens által adott csúcs maximális értékének megjelenéséig eltelik), t_0 pedig a holtidő (az az idő, amely a mozgófázisnak az állófázison való átjutásához szükséges). Ha rendelkezünk a mintáról előzetes információval, akkor a mintakomponensek könnyen azonosíthatók, ha redukált

retenciós idejüket összehasonlítjuk ugyanazon a rendszeren mért ismert anyagok redukált retenciós idejével. Ha nincs előzetes információnk a mintáról, már nehezebb dolgunk van, hiszen hasonló anyagok hasonló retenciós idővel rendelkezhetnek, így a meghatározás bizonytalansága nagy lehet. Az ilyen esetekben célszerű valamilyen kiegészítő mérés elvégzése vagy szelektív detektor (pl. tömegspektrométer) alkalmazása. A gázkromatográfiás minőségi analízisben eredményesen alkalmazható még a homológ sorok módszere, mely szerint a szénhidrogén-származékok homológ során a redukált retenciós idők exponenciálisan változnak a szénatomszámmal. Vagyis ha a $\log t_R'$ értékeket ábrázoljuk a szénatomszám függvényében, akkor egy egyenest kapunk, amelyről, az ismeretlen komponens redukált retenciós idejének ismeretében leolvasható annak szénatomszáma.

A fenti megfigyelésen alapul a gázkromatográfiás minőségi meghatározások során szintén jól alkalmazható Kováts-féle retenciós index (I_x) is. Ezen módszer az egyes komponensek retenciós adatait egy összetett képlet segítségével n -alkán homológok retenciós idejéhez viszonyítja. Ezáltal, ha az ismeretlen komponensünk I_x indexét méréssel meghatározzuk és összehasonlítjuk adatbázisokban található értékekkel, meghatározhatjuk annak anyagi minőségét.

A kromatogramok mennyiségi értékelése során azt használjuk ki, hogy a komponensek által szolgáltatott csúcsok területe (keskeny és hegyes csúcsok esetén a magasságuk) arányos a mintabeli koncentrációjukkal. Így kalibrációs görbe felvétele után az ismeretlen koncentrációja a görbéről egyszerűen visszaolvasható, és számítható. A csúcsterületek meghatározása napjainkban számítógépes adatgyűjtő programok segítségével történik.

2.3.2.2. Szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC)

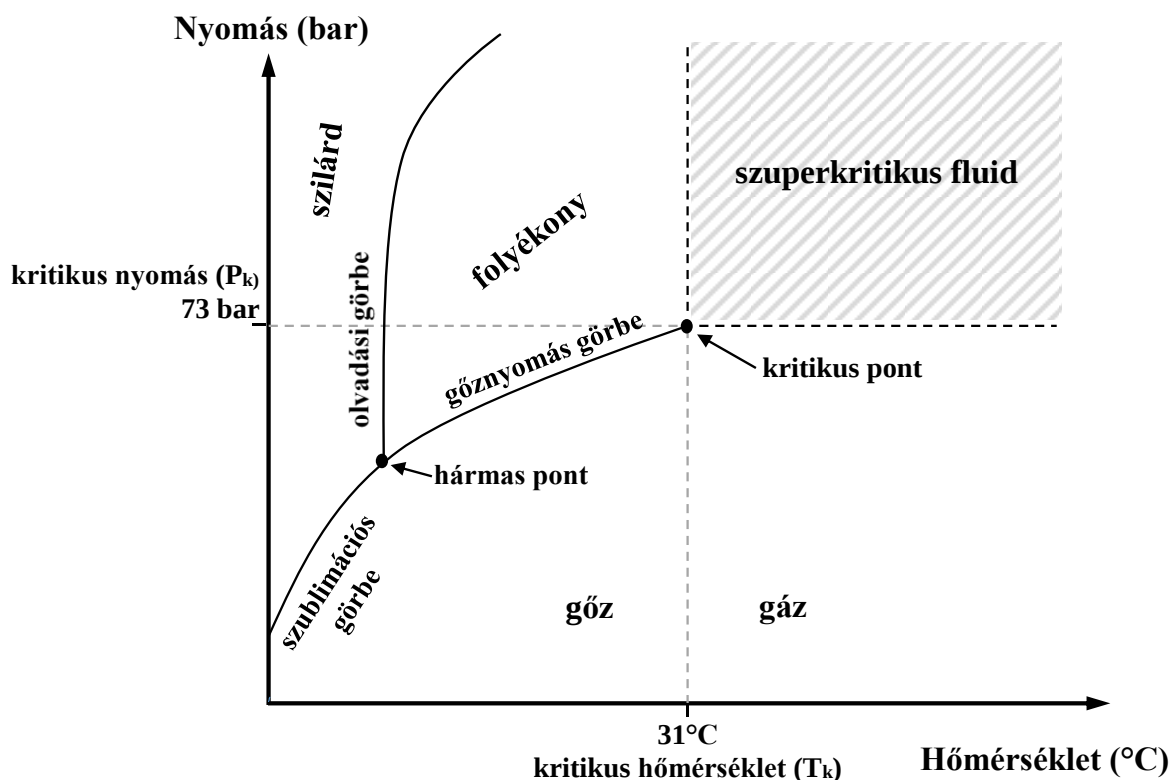
A szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC) olyan kromatográfiás elválasztási módszer, melyben a mozgófázis **szuperkritikus állapotú fluidum**.

Szuperkritikus fluid állapot

Egy adott hőmérsékleten (T_k) eltűnik a folyadék/gőz fázishatár, ezen T_k hőmérséklet érték felett az anyag semmilyen nyomáson nem cseppfolyósítható.

Ha az anyag hőmérséklete T_k érték felett van, és nyomása a T_k értékhez tartozó nyomást meghaladja, akkor az anyag szuperkritikus fluid állapotban van (5. ábra). A szuperkritikus állapotú anyag mind a folyadék, mind a légnemű állapot tulajdonságait mutatja. Diffúziós

tulajdonsága és viszkozitása a gázállapothoz áll közelebb, míg sűrűsége a folyadékállapothoz. Ezek a tulajdonságok okozzák, hogy a szuperkritikus fluid állapotú anyag jó oldószer.



5. ábra A CO₂ állapotdiagramja

A **mozgófázis** a szuperkritikus fluid kromatográfiában rendszerint szén-dioxid, amely poláris módosítót, mint például metanolt, 2-propanolt, vagy acetonitrilt is tartalmazhat. A mozgófázis összetétele, nyomása (sűrűsége), hőmérséklete és áramlási sebessége vagy az egész kromatográfiás eljárás során állandó (izokratikus, izodenz, izotermikus elúció), vagy egy adott program szerint változhat (a módosító mennyisége, a nyomás (sűrűség), a hőmérséklet vagy az áramlási sebesség szerinti gradiens elúció).

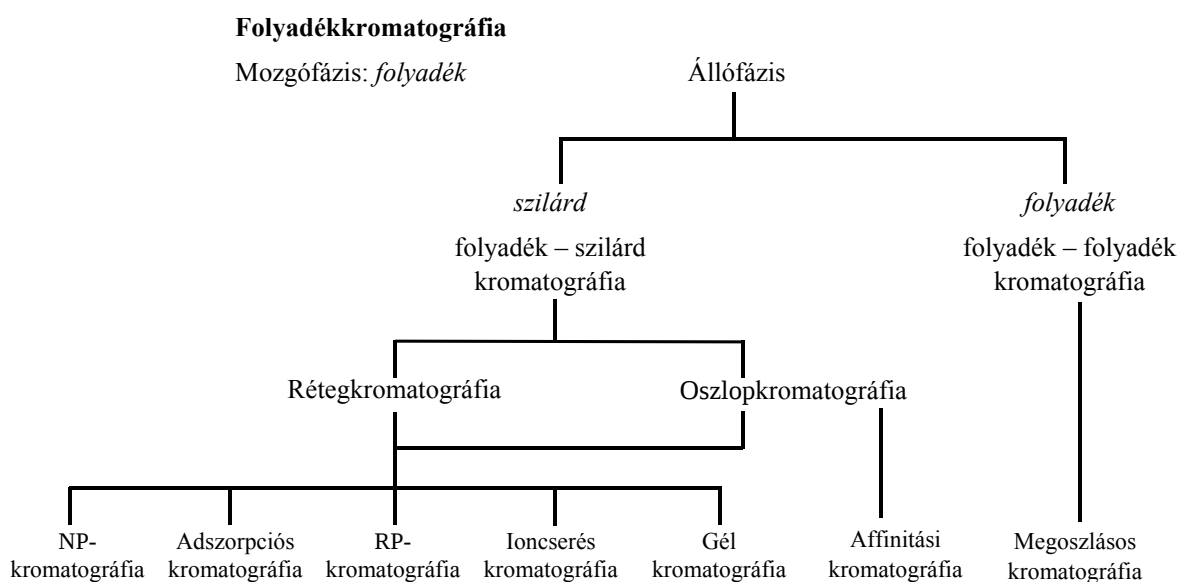
Az **állófázis** vagy kisméretű, szilárd szemcsékből áll, mint a folyadékkromatográfiában is használt szilikagél, vagy porózus grafit és kémiaiilag módosított állófázis, vagy kapilláris oszlopok esetében lehet térhálós folyadékfilm, amely egyenletes filmbevonatot képez az oszlop falán. A szuperkritikus fluid kromatográfiás elválasztás főleg **adszorpció**s és **megoszlásos** folyamatokon alapul.

2.3.2.3. Folyadékkromatográfia

A folyadékkromatográfiánál a mozgófázis folyadék, az állófázis lehet szilárd halmazállapotú, vagy folyadék. Tehát a folyadékkromatográfia tovább tagolódik:

- folyadék-szilárd
- folyadék-folyadék kromatográfiára.

Ez utóbbi esetben folyadék illetve a szilárd halmazállapotú vagy gél hordozó szemcsék felületén kialakított folyadékréteg képezi az állófázist és folyadék-folyadék közti megoszláson alapul az elválasztás.



6. ábra Folyadékkromatográfiás módszerek

A folyadékkromatográfiás módszerek közé számos elválasztási módszer tartozik, és átfedések vannak a különböző szempont szerinti módszercsoportosítások között (6. ábra). Az állófázis térbeli elrendeződése alapján külön csoportba sorolt réteg- és papírkromatográfia és oszlopkromatográfia (CC, HPLC) is folyadékkromatográfiás módszer, de ide tartoznak az adszorpciós-, megoszlásos-, gél-, ioncserés-, affinitási-, normálfázisú és fordított-fázisú kromatográfiás eljárások is, amelyeknél az elválasztás mechanizmusa szerint történt ezeknek a módszereknek egy külön csoportba sorolása.

2.3.3. A kromatográfiás módszerek osztályozása az állófázis térbeli elrendeződése alapján

Az állófázis térbeli elrendeződése alapján ismerünk

- planáris (sík elrendezésű) kromatográfiát, amelyek közé tartozik a papír- és rétegekromatográfia és
- oszlopkromatográfiát.

2.3.3.1. Planáris kromatográfiás módszerek

2.3.3.1.1. Papírkromatográfia

A papírkromatográfia a **megoszlásos folyadékkromatográfiás** módszerek közé tartozik, a megoszlásos oszlopkromatográfia „nyílt oszlopra” történő átvitelét jelentette. A domináló megoszlási folyamat mellett azonban szerepet játszhat az elválasztásban az adszorpció, valamint a cellulózon levő karboxil csoportok miatt az ioncsere is.

Az állófázis maga a ligninmentes cellulóz lap, vagy a cellulózlapon kötött folyadék, ami leggyakoribb esetben a víz. A kromatográfiás papír gyakorlatilag mindig tartalmaz bizonyos megkötött vizet, gyakran kerül azonban felhasználásra impregnált (hidrált) formában. A kereskedelmi forgalomban levő kromatográfiás papírok közül a leginkább használtak a Schleicher-Schüll, Whatman és a Macherey-Nagel márkájúak.

A papírkromatográfiás elválasztás mozgófázisaként számos oldószer, illetve oldószerkelet kombináció használható. Ezek közül az acetone, az alkoholok, az ecetsav, a fenol és a piridin a leginkább alkalmazottak. Közös tulajdonságuk, hogy vízzel többé-kevésbé elegyednek.

A mozgófázis a **kapilláris erők** hatására mozog a papíron, ami időigényes folyamat.

A módszer eszközigénye minimális.

A papírkromatográfiás módszer használata újabban háttérbe szorult, ritkán (pl. egyszerű cukrok szétválasztására) alkalmazzák.

2.3.3.1.2. Rétegekromatográfia (*Thin Layer Chromatography, TLC*)

A módszer az utóbbi időben jelentősen modernizálódott, műszerezettség megnövekedett, a *high-tech* rétegekromatográfiás módszerek (*on-line* mintafelvitel, műszeres kifejlesztés, *on-line* detektálás, OPLC: Overpressure Liquid Chromatography, RPC: Rotation Liquid Chromatography, AMD^R: Automated Multiple Development) is igénybe vehetőek. A

kromatográfiás módszerek közül a rétegekromatográfia (klasszikus rétegekromatográfia) az egyedüli, ahol az egyszerű eszközökkel végzett elválasztások továbbra is létképesek maradtak.

A rétegekromatográfia számos előnnyel rendelkezik, ezért más módszerekkel szemben is előnyben részesített, gyakran alkalmazott technika. Előnyei:

- egyszerű kivitelezhetőség, nem kíván nagy szakértelmet
- olcsó berendezés
- gyors kifejlesztés
- kis mennyiségű mozgófázis
- kis mintamennyiség elegendő az analízishez
- megfelelő szelektivitás és reprodukálhatóság
- a detektálásnál agresszív reagensek alkalmazásának lehetősége
- számos minta (19-20 minta) párhuzamos analízise referencia anyagok mellett egy kifejlesztéssel
- mintaelőkészítés nem szükséges az elválasztás előtt, tehát nyers biológiai extraktumok használhatóak, szemben pl. a HPLC-vel
- detektálás sokfélesége, ami pontosabb értékelést tesz lehetővé
- flexibilis technika, amely a legegyszerűbb eszközök alkalmazásával, de *high-tech* módszerekkel is létképes
- speciális [ismételt, kétdimenziós (2D), túlfuttatásos] kifejlesztések
- a mozgó- és állófázisok sokfélesége
- mennyiségi és preparatív célú alkalmazás
- analitikai jellegű rétegekromatográfiával egyéb kromatográfiás módszerek (klasszikus oszlopkromatográfia, HPLC) kísérleti körülményei megtervezhetőek és átvihetőek.

2.3.3.1.2.1. A rétegekromatográfia helye a kromatográfiás módszerek között

Figyelembe véve a kromatográfiás módszerek osztályozási szempontjait, a rétegekromatográfiát a következőképpen helyezhetjük el a kromatográfiás módszerek között.

Az állófázis térbeli elhelyezkedése alapján **planáris** kromatográfia, a mozgófázis halmazállapota szerint **folyadékkromatográfia**. A mozgófázis áramoltatását megvalósító hatóerők jellege alapján folyadék-migrációs kromatográfia, ahol a hatóerő a **kapilláris** erő. Kifejlesztették a zárt térben végrehajtott ún. túlnyomásos **kényszeráramlásos** (OPLC) és a centrifugális (rotációs) rétegekromatográfiát (RPC), ahol a mozgófázis áramoltatását

kényszererő (nagy nyomású folyadékpumpa), illetve a **centrifugális erő** végzi a kapilláris erőkön kívül.

A **klasszikus** rétegekromatográfiánál az állófázis leginkább adszorbens, ahol az anyagok eltérő adszorpciós tulajdonságait használjuk ki az elválasztásra. Tehát a fő folyamat, amely alapját képezi az elválasztásnak elsősorban az **adszorpció**. Ténylegesen több fiziko-kémiai jelenség is végbemehet egyazon rétegen (pl. adszorpció, megoszlás, stb.) és a körülményektől függ, hogy melyiké a vezető szerep.

A rétegekromatográfia nem korlátozódik egyedül az adszorpciós tulajdonságok kihasználására, megfelelő állófázison és mozgófázissal megvalósítható megoszlásos, fordított fázisú, gél, ioncserés, stb. kromatográfia is. Például folyadék-folyadék megoszlás érvényesül, ha a rétegen folyadék állófázist alakítunk ki, pl. víz, formamid, fenol, stb. segítségével.

2.3.3.1.2.2. A rétegekromatográfia egyedi jellemzői

Három fontos tényező létezik, ami megkülönbözteti a rétegekromatográfiát az oszlop-folyadékkromatográfiás módszertől. Ezek

- a gőztér megléte,
- a mozgófázis előzetesen nem nedvesített állófázison halad végig,
- az állófázis könnyen hozzáférhető.

A rétegekromatográfiánál minden esetben figyelembe kell venni a kromatográfiás rendszer egyensúlyát a gőztérrel. Tehát egyensúly alakul ki a kromatográfiás rendszer minden alkotója között; a mintakomponensek, állófázis, mozgófázis, gőztér között.

A másik tényező, ami jellemző a rétegekromatográfiára, hogy míg az oszlopkromatográfiánál az állófázist a minta beadását megelőzően át kell mosni a mozgófázissal, hogy kialakuljon az egyensúly a mozgófázis és az állófázis között, addig a rétegekromatográfiánál a mozgófázis száraz állófázison áramlik előre. Elsősorban frontja előrehaladásával együtt nedvesedik az állófázis. Figyelembe kell venni azonban, hogy a gőztérből az oldószer kis mennyisége kondenzálódik a lemezre, ami bizonyos előnedvesítést eredményez.

A harmadik tényező, amely egyedülállóan a rétegekromatográfia jellemzője, hogy az elválasztás után a szeparálódott komponenseket egy nyitott lemezen kapjuk meg, amelyen az elkülönülő anyagok könnyen detektálhatók. A lemez tárolható, később elővehető, és ismételt értékelésre, újabb rétegekromatográfiás analíziseknél összehasonlításra felhasználható.

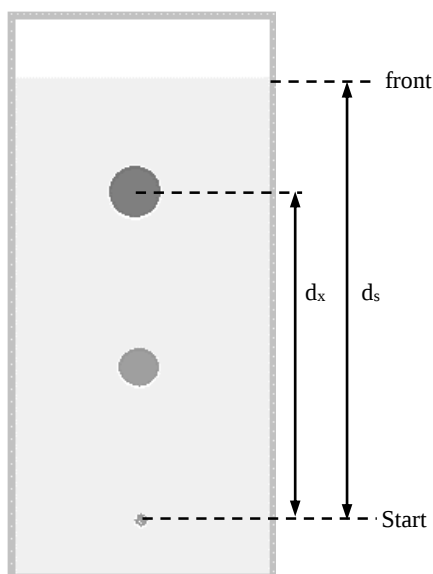
2.3.3.1.2.3. A rétegekromatográfia végrehajtásának lépései

- Állófázis választás, mintafelvitel
- Mozgófázis választás, kifejlesztés
- Detektálás (megjelenítés, értékelés)
- Minőségi azonosítás
- Mennyiségi kiértékelés

A rétegekromatográfia (klasszikus rétegekromatográfia) a legegyszerűbben a következő módon kivitelezhető.

A kiválasztott sík elrendezésű állófázisra, a rétegre (általában adszorbens) felvisszük a minta oldatát, és a gőzterével dinamikus egyensúlyban levő kifejlesztő elegyet tartalmazó, zárt kamrába helyezzük. A **mintafelvitel** történhet manuálisan, egyszerű kapilláris vagy pipetta segítségével, de történhet automatikus mintafelvívő segítségével (CAMAG Linomat 5) pontszerűen, vagy sáv formájában, apró részletekben, hogy a felvitel minél kisebb pontban vagy éles vonalban történjen. A mintafelvitel hossza a feladatnak megfelelő mértékű. A **kifejlesztés** során a választott mozgófázis a kapillaritás következtében átáramlik az állófázison (rétegen), miközben a mozgófázis és a minta komponensei között versengés, kompetíció folyik az állófázis aktív pontjaiért. Ezután a mintakomponenseknek az álló- és mozgófázis közötti anyagátadása következtében létrejön az elválasztás.

Az elválasztás kiértékelése, a **detektálás** elsősorban a visszatartási tényező (R_F , retardációs faktor) meghatározásával történik a lemez oldószermentesítése után. Az azonos utat megtevő molekulák egy zónát képeznek a lemezen, illetve a kifejlesztés irányához képest eltérő diffúzió miatt egy foltot. Így a retardációs faktor (R_F) a következő módon adható meg (7. ábra):



$$R_F = d_x/d_s, \quad 1 \geq R_F \geq 0, \text{ ahol a}$$

d_x : a mintakomponens folt középpontjának a távolsága a felviteli (start) ponttól

d_s : az oldószer fronttávolsága a felviteli (start) ponttól.

7. ábra A retardációs faktor (R_F) kiszámítása

A klasszikus rétegekromatográfiánál a mozgófázis frontsebessége a kifejlesztési távolsággal csökken, az oldószerfront távolsága a kifejlesztési idő négyzetével arányos.

$$d_s = kt^2$$

t: a kifejlesztés ideje

k: arányossági tényező, ami függ a mozgófázis viszkozitásától, sűrűségétől, a réteg (állófázis) vastagságától, hőmérséklettől, kamra telítettségétől, stb.

Színes anyagok elkülönülése közvetlenül, vizuálisan értékelhető. UV-fény keltett fluoreszcenciával, vagy UV fény elnyeléssel számos további anyag detektálható, illetve modern szkennerekkel értékelhető. A rétegekromatográfiában a detektálásra ezen kívül ma már számos, egy-egy anyagcsoportra specifikus előhívó reagens áll rendelkezésre, amelyek pontos használata kézikönyvekben megtalálható. Előhívóreagenssel történő bepermetezéssel, *in situ* a lemezen létrehozott színreakciókkal értékelhető a mintakomponensek elválasztása. Az adszorbens rétegen még drasztikus reagensek is használhatóak. A reagensekkel történő bepermetezést egyes esetekben további hőkezelés, vagy kémiai kezelés (ammónia, klór gáz terébe állítás) követhet.

A rétegekromatográfia előnyei közé tartozik ezen kívül, hogy az eljárásnál kontakt módszerek (bioatográfia, autoradiográfia) is alkalmazhatóak.

Az OPLC-nél és a centrifugális rétegekromatográfiánál *on-line* és *off-line* kiértékelésre van lehetőség, és különböző detektorok használhatóak.

Az eljárást a **dokumentálás** fejezi be, feljegyezve a mintakomponens foltok rétegekromatográfiás paramétereit (R_F érték, szín, stb.), és a TLC eljárás és detektálás körülményeit (kifejlesztő elegy, szorbens, előhívó reagens, értékelés körülményei, stb.).

A **minőségi azonosítás** elsősorban a retardációs faktor, valamint a szín vagy egyéb optikai jellemzőnek a referencia anyagokkal való összevetésével történik.

A **menyiségi értékelés** a kérdéses anyag foltjának mérete és a színintenzitás-sűrűség mérése alapján hajtható végre **denzitometriával**. Ismert a pásztázó denzitometria, és a videodenzitometria. A pásztázó denzitometriánál a diffúz módon visszavert fénymennyiség mérése történik meg pásztázó optikai résszel. Egy adott standard (referencia) komponensre kalibrációs egyenest veszünk fel különböző koncentrációk segítségével a csúcsterület, vagy a

csúcsmagasság alapján. Az ismeretlen mintából ennek a komponensnek a mennyisége a kalibrációs egyenes segítségével meghatározható.

A videodenzitometriánál digitális képalkotás történik a rétegről.

2.3.3.1.2.4. A rétegekromatográfiás elválasztási rendszer részei

2.3.3.1.2.4.1. Rétegekromatográfiás állófázisok

A kromatográfiás rendszer egyik fontos része az **állófázis**. A rétegekromatográfiánál különböző hordozó lemezre (alumíniumlemez vagy üveglap) réteg formájában felvitt állófázist alkalmaznak. A rétegek az állófázisok szuszpenziójából manuálisan vagy kenőkészülék (Desaga, Camag) segítségével készíthetők el a laboratóriumokban, de a kész rétegek kereskedelmi forgalomban is megvásárolhatóak.

A rétegekromatográfiánál használt szilikagél

A leggyakrabban használt állófázis a klasszikus rétegekromatográfiánál a szilikagél. Az anyag kémiaiilag az ortoszilikasav polikondenzált termékének is felfogható, a szilikát oldatok savanyítása illetve szilikonok hidrolízise útján nyerhető víz eliminációval.

A szilikagél kromatográfiás tulajdonságait jelentős részben a szilika felülete, a felületen lévő szilanol csoportok, illetve a felülethez szorbeálódott víz szabják meg. A szilikagél hőkezelése nagyon fontos, s jelentősen hozzájárul a szilikagél felszínének kialakításához, ezzel adszorptív tulajdonságához. A szilikagél hőkezelése (hevítése) után kapott víztartalom pontos beállítása és állandó szinten tartása, a szilikagél aktiválásának foka nagyon fontos szerepet játszik a reprodukálható módon elérhető R_F értékek biztosításában. Nagyon fontos specifikus felülete, pórusmérete, illetve pórusméret eloszlása, kémhatása (10%-os vizes szuszpenziójának a pH-ja). Ez utóbbi általában savas, de előkezeléssel a pH-t 7 körülire állítják. Speciális esetekre létezik bázikus és savas pH-val rendelkező szilikagél. A Merck gyártmányú szilikagél lemezek G jelzése a réteg gipsz tartalmát, az F a fluoreszkáló anyag tartalmát jelzi. A gipszet kötőanyagként használják. A fluoreszkáló anyag hozzáadásával 254 nm-nél fluoreszkáló lemezt nyernek, amelyen a 254 nm-en UV elnyelő anyagok fluoreszkáló alapon sötét foltot adnak.

A rétegekromatográfiánál használt szilikagél szemcsemérete: 5-15 μm .

A nagyhatékonyságú réteggkromatográfiánál (HP-TLC) használt szilikagél

Az állófázis szemcseméretének csökkentésével javul az elválasztás. Ez vezetett a HPLC és a HP-TLC kifejlesztéséhez.

A nagyhatékonyságú réteggkromatográfia (HP-TLC), a finomszemcsés (1-7 μm) rétegeket használó, tipikusan műszeres jellegű elválasztási módszer, amelynél a mintafelvitel és a kiértékelés is *high-tech* eszközökkel történik. A rétegen rövid kifejlesztési távolságon gyors és hatékony elválasztást eredményez. A gyors kifejlesztési sebesség csak limitált távolságra érvényes, azaz egy bizonyos távolságnál hosszabb kifejlesztés után a gyors kifejlesztési sebesség csökkenni kezd. A minta térfogata ez utóbbinál 0,1-0,5 μm , a folt átmérője 1-1,5 mm, a front távolsága a felviteltől számítva 3-6 cm, az elválasztás időtartalma 3-20 perc. A TLC-nél a minta térfogata a HP-TLC térfogatának tízszerese, a folt átmérője 3-6 mm, a front távolsága a felviteltől számítva 10-15 cm, az elválasztás időtartalma 0,5-2,5 óra.

A kifejlesztési távolság a HP-TLC-nél is a kifejlesztési idő négyzetével arányos, $d_s = kt^2$.

A réteggkromatográfiánál használt további állófázisok

Az alumínium-oxid használata ritkább, mint a szilikagélé, de bizonyos anyagoknál (szteroidok, terpének, stb.) előnyös lehet. Létezik bázikus, semleges és savas formája.

A cellulóz rétegek viszonylag gyakrabban használatosak, mint az alumínium-oxid. Elsősorban a papírkromatográfiát helyettesítik, de annál gyorsabban, egyszerűbben kivitelezhetőek. A cellulóz rétegek készítésénél a szuszpenziót csak limitáltan szabad turmixolni (1 perc), és szobahőmérsékleten kell szárítani.

Gyakran alkalmazott a TLC-nél a poliamid is, és használatosak a gélkromatográfiás, valamint az ioncserélő rétegek is.

A szilikagél hordozóra vitt hosszú szénatomszámú alkil-láncot (C_8 , C_{10} , C_{18}) vagy fenil-, izopropilfunkciókat tartalmazó rétegek apoláris, tehát fordított állófázist (RP) képviselő, kémiaiilag kötött fázisú állófázisok. Általánosan megállapítható, hogy a lánc hosszával növekszik a szelektivitás, és csökken az állófázis polaritása. A fordított fázisú TLC használata egyre növekszik, különösen alkalmas olyan poláris molekulák elválasztására, amelyek a normál fázisokhoz túl erősen kötődnek. Kereskedelmi forgalomban nő a különböző gyártmányú RP rétegek elérhetősége.

A kötött fázisú állófázisok közé tartoznak a szilikagél hordozóra vitt, egyéb poláris funkciók csoportot (ciano, diol, nitro, imino, dimetilamino, stb.) tartalmazó normál fázisú rétegek is.

A rétegekészítés gyakorlata

A különböző TLC rétegek nagy számban találhatók meg kereskedelmi forgalomban, de laboratóriumokban is könnyen elkészíthetők.

A készítésnél a kimért állófázist a megfelelő oldószerben (általában vízben) homogenizáljuk, a szorbenshez adott leírat szerint (25 g szilikagél). A víz mennyiségének megváltoztatásával szabályozni lehet a réteg vastagságát. Vastagabb réteg (preparatív réteg) készítéséhez több szilikagél kell adni a szuszpenzióhoz.

A szuszpenziót dörzsmozsárban 2 perces intenzív dörzsöléssel készítjük el. Ezt a szuszpenziót egyenletesen felkenjük a zsírtalanított hordozó réteglapra. Kenőkészülékkel a rétegekészítés egyszerű és igen gyors, 5 db 20 × 20 cm-es réteg készíthető egy mozdulattal. Lehetséges, hogy a hordozó lapok mozdulnak el, vagy a gradiens kenő készüléknél ellentétes irányban mozdulnak el a réteglapok az öntés irányával szemben.

Kenés után a rétegeket szárítani, aktiválni kell (100-105 °C hőmérsékleten 60 percig hevítve).

2.3.3.1.2.4.2. Kifejlesztő kamrák (kádak)

A műanyag, alumínium vagy üveglap hordozóra felkent rétegekre felvitt minták komponenseire történő elválasztása a kifejlesztéssel történik kifejlesztő kamrákban. Tekintve, hogy a TLC-nél a gőztérnek fontos szerepe van az elválasztásban, a kamrák alakja, mérete hatással van az elválasztásra.

Vannak egyszerű kifejlesztőkamrák és speciális kifejlesztő készülékek.

Amennyiben a kád belsejében elhelyezünk egy szűrőpapír lapot, telítjük a kád gőzterét, különben telítetlen gőzterű kamráról beszélünk.

Más eredményhez jutunk telített vagy telítetlen gőzterű kamrák használata esetén.

2.3.3.1.2.4.3. Mozgófázis

Az állófázison, a gőztéren és a kamrarendszeren kívül az elválasztás hatékonysága függ a mozgófázistól. A TLC-nél általában többkomponensű, multizónás oldószerkeverékeket használnak mozgófázisként. Az oldószerkeverék egyes összetevői is szorbeálódnak az állófázison, amely oldószer komponensek késleltetést szenvednek az állófázis által. Ezáltal különböző frontok keletkeznek. Az α front után halad a β , γ , δ front. A különböző frontokban az egyes komponensek éles foltokban tömörülnek. Ez a zónasorozat a rétegekromatográfiának, az ún. száraz állófázisú kromatográfiának a sajátja.

A gőztér szerepe egyedülálló a rétegekromatográfiában. A mozgófázis összetevői elpárolognak az oldószerkelegetől, telítik a kamrát. A gőztérből pedig lecsapódnak, kondenzálódnak a lemezre, előnedvesítik azt. Ez a kondenzálódás telített kádból gyorsabb.

2.3.3.1.2.5. A rétegekromatográfia típusai

A következő szempontok alapján csoportosíthatjuk a rétegekromatográfias eljárásokat:

1. Kifejlesztés alapján: vertikális és horizontális rétegekromatográfia
2. Hajtóerő típusa alapján: kapilláris erők hatására létrejövő rétegekromatográfia, centrifugális- (centrifugális és kapilláris erők hatása), valamint kényszeráramlásos túlnyomásos (kapilláris erők, pumpa vagy szivattyú hatása) rétegekromatográfia.
3. Az állófázis típusa alapján ismerünk normál fázisú, adszorpciós, fordított fázisú, megoszlásos, gél, ioncserés, stb. rétegekromatográfiát.
4. Az elválasztandó minta mennyisége alapján megkülönböztetünk: analitikai, (réteg vastagsága 0,1-0,2 mm), félpreparatív (réteg vastagsága 0,2-0,5 mm) és preparatív (réteg vastagsága 0,5-10 mm) rétegekromatográfiát.

Preparatív rétegekromatográfia

A preparatív rétegekromatográfia a rétegvastagság növelésével kivitelezhető. A minta oldatát ilyenkor csík formájában visszük fel az állófázisra, majd a kifejlesztés után az elválasztott anyagok sávjait az állófázissal együtt lekaparjuk, ezután az anyagot a szorbensről oldószerrel leszorítjuk, és analizáljuk (*off-line* módszer) (8. ábra). A preparatív rétegekromatográfia jobb elválasztást nyújt, mint a klasszikus oszlopkromatográfia, mivel kisebb az állófázis szemcsemérete. Kisebb az oldószerigénye, többszöri kifejlesztés használható a hatékonyabb elválasztás elérésére. Felszerelést nem igényel, egyszerű a detektálás, de fényre, levegőre, oxigénre érzékeny molekulák esetén fennáll a bomlás veszélye.



8. ábra Preparatív rétegekromatogram

2.3.3.1.2.6. Speciális rétegekromatográfiás módszerek

A rétegekromatográfiával – csaknem egyedülállóan a kromatográfiás módszerek közül – speciális kifejlesztések, módszerek is alkalmazhatóak, így ismételt kifejlesztés, túlfuttatásos kromatográfia, kétdimenziós (2D-TLC) kifejlesztés is végrehajtható.

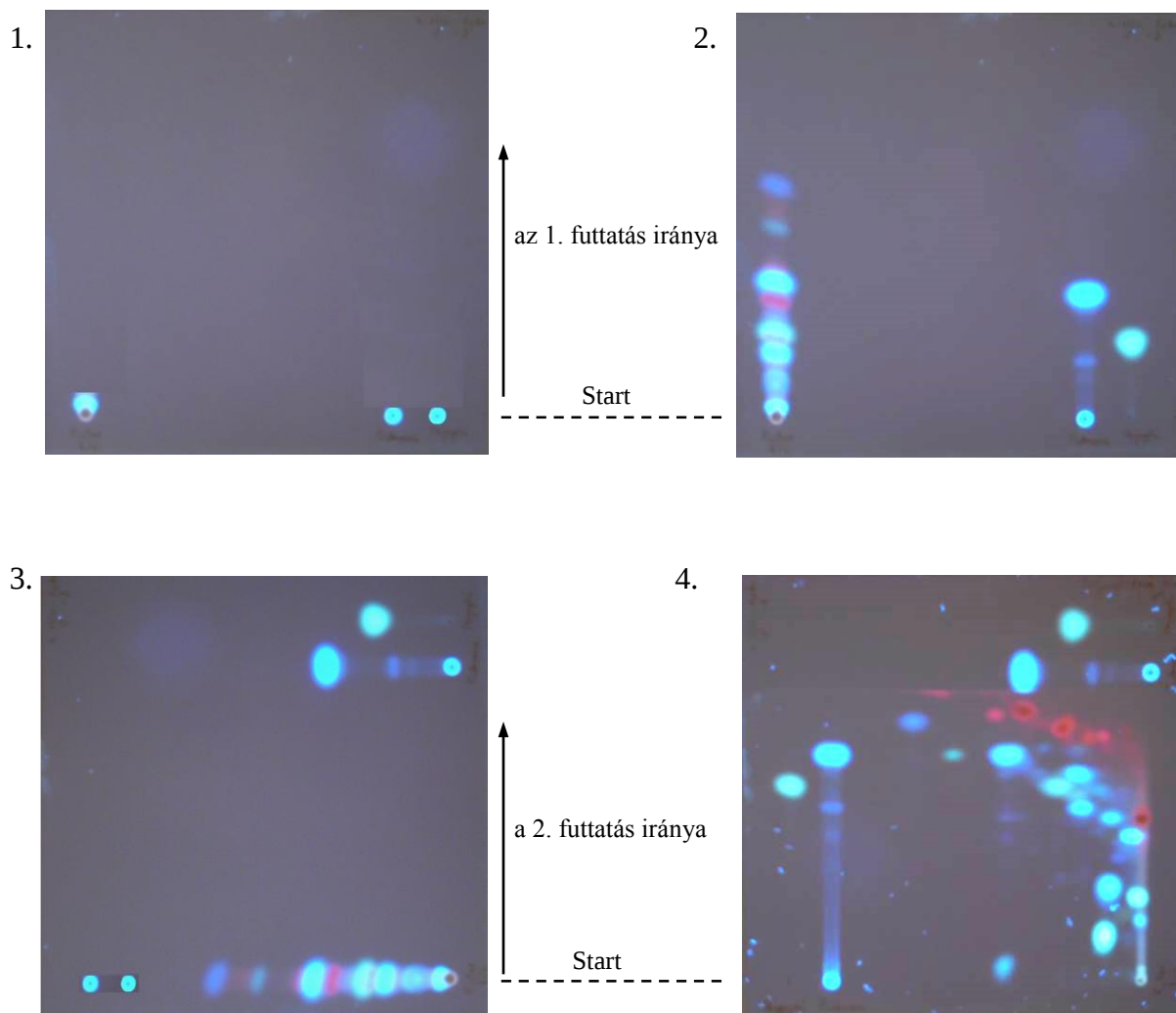
Kétdimenziós rétegekromatográfia (2D-TLC)

A kétdimenziós kifejlesztés során az egyik irányban történő kifejlesztés után a lemezt 90°-kal elfordítva megismételjük a kifejlesztést (9. ábra). Ebben az esetben a mintafelvitel a lemez egyik szélére történik, a másik szélére visszük fel a referencia (teszt) anyagokat. Az első kifejlesztés során nyert, az elválasztott mintakomponenseknek megfelelő folt sorozat szolgál a 2. kifejlesztésnél a startpontoknak, vagy felviteli pontoknak.

A 2D-TLC célja lehet annak ellenőrzése, hogy történik-e a kifejlesztés során bomlás, átalakulás a minta komponenseinél. Azonos körülmények között végezve a kifejlesztéseket (azonos mozgó fázis) a foltoknak a főátlóban kell elhelyezkedni. Ha a foltok a főátlóban helyezkednek el, akkor nem történt bomlás. Ellenkező esetben, ha eltérést találunk, az bomlásra utal.

2D-TLC-t lehet kivitelezni úgy, hogy a kifejlesztő elegyek eltérőek, vagy a 2 irányban eltérő kifejlesztési típust használunk, pl. először elúciós, másodszor kiszorításos kifejlesztést.

A két dimenzióban történő, egymás utáni kifejlesztések növelik az elválasztás hatékonyságát, jobb azonosítást eredményeznek.



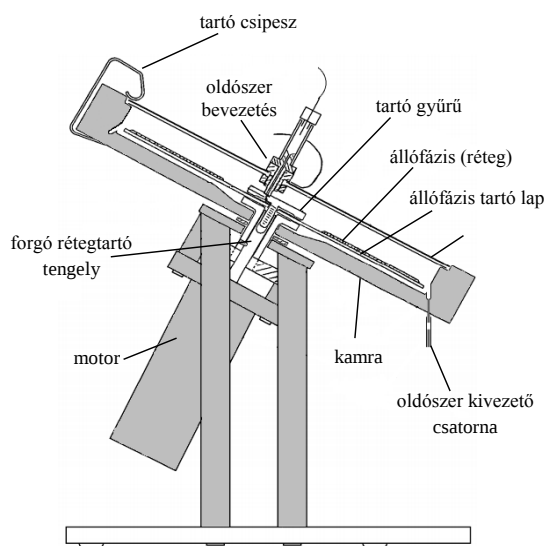
9. ábra Kétdimenziós rétegkromatogram

Centrifugális (rotációs) rétegkromatográfia (RPC)

Az RPC helye a kromatográfias módszerek között

A rétegkromatográfiánál cirkuláris kifejlesztés is alkalmazható, amelynél a minta felvitele és a mozgófázis folyamatos adagolása a forgó réteglap (állófázis) közepére történik. Az elválasztás után a mintakomponensek foltjai a középpont körül körkörös gyűrűk mentén (pontban történő felvitel), illetve kör alakú sávokat alkotva (kör alakban való felvitel) helyezkednek el. A centrifugális erő növeli az elválasztás hatásfokát és gyorsaságát.

Az RPC elsősorban preparatív elválasztásra szolgáló **kényszeráramlásos folyadékkromatográfias** módszer, ahol a kapilláris erőn kívül a centrifugális erő hatására jön létre a mozgófázis áramoltatása. Analitikai célú felhasználása is elég gyakori. Radiális irányú kifejlesztést nyújt.



10. ábra Chromatotron[®] RPC készülék

A RPC rendszer részei, RPC elválasztás folyamata

A rétegekromatográfiás lemez a megfigyelő ablakkal lezárható kamrában, a motor által forgatott tengelyre van elhelyezve (10. ábra). Az állófázist üveg hordozólapra visszük fel. Az eluátum (folyamat során nyert oldószerben oldott elválasztott anyag) a lemez szélén levő csatornán át vezetődik el, ahol frakciók gyűjtésére is van lehetőség. Mivel az anyagok nagy felületű szorbenssel és levegővel érintkeznek az elválasztási folyamat alatt, oxidálódhatnak, bomlásuk is végbemehet, ezért biztosított a N₂ áram bevezetése a kamrába.

A minta előtisztítására nincs szükség, ha a minta ún. „alapvonalas” (pl. poláris) szennyeződések nem tartalmaz. Ezek az anyagok irreverzibilisen kötődnek az állófázishoz, és rontják az elválasztást (csíkot húznak, szélesedik a zóna). Egyes készülékek biztosítják, hogy bármely helyre, bármely időben megtörténhet a mozgófázis bevezetése a kifejlesztésekhez.

Mozgófázisként az oldószerek széles köre alkalmazható hasonlóan a TLC-hez. A TLC-nél alkalmasnak talált rendszerek polaritásának csökkentésével átvihetők RPC-re. Azokat az oldószerszrendszereket kell választani az RPC elúcióra, amelyeknél a célzott anyagok R_F értékei 0,2-0,4 közé esnek TLC-vel történő kifejlesztés esetén.

Gradiens elúció, 3-4 lépcsős gradiens használata ajánlott a módszernél.

A réteg vastagsága lehet 1 mm, 2 mm és 4 mm, amelyeknél a kifejlesztési sebesség rendre 2-4 ml/perc, 6-8 ml/perc és 8-10 ml/perc. A rétegekromatográfiás lemez felületének homogénnek kell lennie, és öntés után 24 órán át állni kell hagyni szárítás előtt. A minta oldata 10%-osnál nem lehet nagyobb koncentrációjú a felvitel során. A felvitelnél arra kell törekedni, hogy a sáv minél keskenyebb (3 mm), a felviteli pontok minél kisebb átmérőjűek legyenek. Ha a minta nem oldódik a kezdeti oldószerszrendszer alkalmas mennyiségében, akkor polárisabb oldószerszben oldva vihető fel az állófázisra, de a felvitel után a szorbenst ki kell szárítani (pl. N_2 átáramoltatása a rendszeren át).

Az optimális átfolyási sebesség beállítása fontos a hatékony elválasztás eléréséhez, ami könnyen változtatható a forgás sebességének növelésével, vagy csökkentésével. Túl nagy átfolyási sebesség esetén az eluens a szorbens felülete felett átfolyik, ez a réteg feletti áramlás rontja az elválasztást.

Az elválasztás követhető detektor közbeiktatásával (*on-line* mód), a színes anyagok elválása a készülék ellenőrző ablakán keresztül egyszerűen megfigyelhetők, UV aktív anyagok esetén pedig UV lámpa segítségével követhető a szeparáció. Preparatív elválasztás esetén a centrifugális erő hatására az állófázisról eluálódott anyagok oldatai frakciókollektorral gyűjthetők, és az elválasztás pl. TLC-vel értékelhető (*off-line* mód).

Az RPC elválasztás típusai

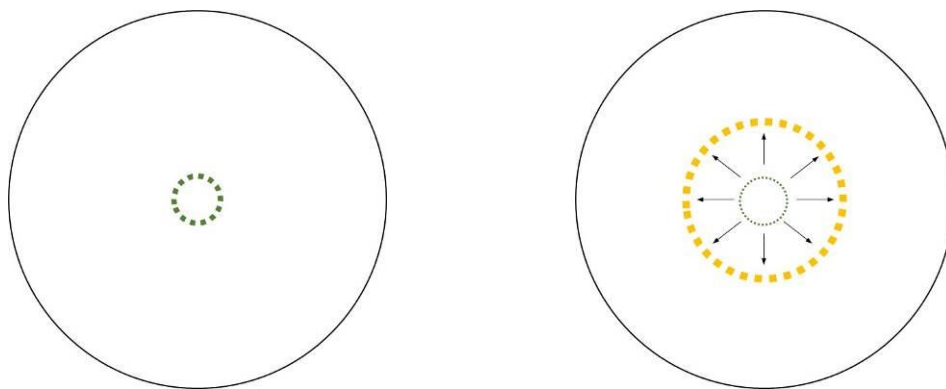
Az RPC módszereket feloszthatjuk a gőzfázis térfogata, a minták száma, a szeparációs lépések száma és az elválasztás célja szerint.

A **gőzfázis térfogata** alapján ismert a normál kamrával, mikro kamrával és ultramikro kamrával rendelkező RPC rendszer.

Analitikai célú RPC-vel 1-72-ig **tetszőleges számú minta** felvitele valósítható meg (11. ábra). Ha 2 cm-es átmérőjű kör mentén pontokban történik meg a mintafelvitel, akkor 36 minta felvitele és elválasztása hajtható végre. Ha a felviteli kör átmérője ennél nagyobb (8 cm), akkor

72 minta felvitelére van lehetőség. Természetesen a kifejlesztési távolság változik a két módszer esetén.

Preparatív elválasztás esetén egy minta elválasztása valósítható meg egy kifejlesztéssel, vagy szekvenciális és többszöri kifejlesztéssel.



11. ábra Analitikai célú RPC

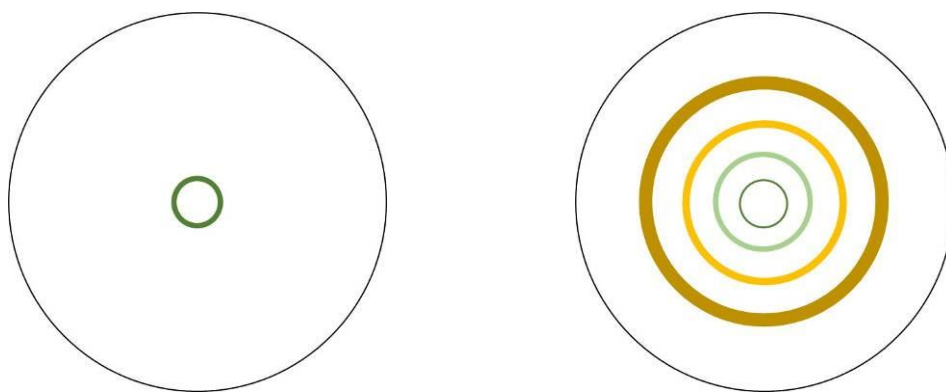
Az RPC-vel a **szeparációs lépések száma** tetszőlegesen választható.

Végrehajthatunk többszöri kifejlesztést és a reciklizáció is biztosított.

Az RPC **elválasztás célja** lehet analitikai (kvalitatív és kvantitatív) és preparatív (izolálás, tisztítás) (12. ábra).

Az **analitikai célú** elválasztást elsősorban mikro kamra és ultramikro kamra használatával hajtják végre. Az állófázis ebben az esetben lehet szilikagél, vagy módosított szilikagél (NH_2 , CN, RP-2, RP-8, RP-18, diol), alumínium-oxid vagy poliamid, stb. Mind cirkuláris, mind anticirkuláris kifejlesztés alkalmazható. A kifejlesztés távolsága (7-10 cm) a kifejlesztési módtól függ.

Preparatív célú elválasztás esetén az állófázis csak szilikagél, vagy alumínium-oxid lehet. Ezekkel a szorbensekkel lehet olyan stabil réteget készíteni, ami ellenáll a centrifugális erő által létrejövő hatásoknak: töredezés, fellazulás, porladás. A lemezöntéshez nagyobb mennyiségű kötőanyagot kell használni (20%). Az aktiválás után 50-500 mg mennyiségű minta felvitelére és elválasztására van lehetőség egy kifejlesztéssel, vagy szekvenciális, és többszöri kifejlesztéssel.



12. ábra Preparatív célú RPC

Az RPC előnyei közül kiemelhető a többféle kifejlesztési mód, *on-line* detektálás lehetősége, gyors, egyszerű, hatékony preparatív elválasztás.

2.3.3.2. Oszlopkromatográfiás módszerek

Az állófázis geometriai elrendezése és a mozgófázis halmazállapota alapján az oszlop (folyadék)kromatográfiás módszereknek ismert a klasszikus és a modern (HPLC) változata.

2.3.3.2.1. Klasszikus (folyadék) oszlopkromatográfia (CC)

Elsősorban **preparatív** célú **folyadékkromatográfiás** elválasztás, amely az anyagkeverékek komponenseire való bontására, vagy a célzott anyag kísérőanyagoktól való elválasztására szolgál.

Az **állófázis** oszlop alakú, célszerűen kialakított, alul szűkülő, csappal ellátott üvegcsőben van elhelyezve. A csappal a mozgófázis áramlási sebességét szabályozhatjuk. Az oszlop kijárata fölött legcélszerűbb esetekben egy üvegszűrő van beforrasztva. Ez az üvegszűrő az állófázist tartja, rögzíti. Egyszerű esetben elegendő egy üvegcső használata, amely az alján leszűkül, és a szűkületet üveggyapottal tömjük ki. Az elválasztás hatékonysága szempontjából fontos az oszlop alsó részének, az ún. holt térnek a minimálisra való csökkentése, a szétválasztott komponensek visszaelegyedésének kiküszöbölésére.

Állófázisként elsősorban szilikagél, alumínium-oxid, cellulóz vagy poliamid szolgál. Az oszlopot csak egy alkalommal használhatjuk, az állófázist minden elválasztás után ki kell cserélni.

Méretnövelt analitikai célokra 0,5-2 cm átmérőjű és 10-60 cm hosszú oszlopokat használunk, preparatív célra 15 cm átmérőig és 1-2 m hosszúra is terjedhetnek az oszlopméretek. Az ipari oszlopok 1-2 m átmérőjűek és több emeletnyi hosszúak is lehetnek. Mivel a klasszikus oszlopkromatográfia elsősorban preparatív célú, fontos tényezője az állófázis kapacitása. A kapacitás szabályozható az oszlop méretének, hosszának, átmérőjének és a szorbens minőségének a változtatásával. A hossz növelésével csökken azonban az oszlop permeabilitása, csökken a mozgófázis átfolyási sebessége.

Mozgófézisként megfelelően választott oldószereket, oldószerkelegyeket alkalmaznak, s akár **megosztlásos**, akár **adszorpció**s jelenségen alapuló elválasztást valósítunk meg, minden esetben **gradiens elúció**t alkalmazunk, az oszlopot növekvő dipólusmomentum szerint hagyják el az anyagok. A mozgó fázis áramlása a gravitációs erő hatására történik meg.

Az állófázis oszlopba történő betöltése előtt meg kell állapítanunk a gradiens elúció kezdeti oldószereit, amelynek magasabb polaritású oldószereket nem tölthetjük be az állófázist az oszlopba. Ennek megállapítására rétegekromatográfias elővizsgálatokat végzünk különböző polaritású oldószerekkel. Azzal az oldószerevel vagy oldószerkeleggyel kell az állófázist betölteni az oszlopba, amelynek a minta komponensek foltjai éppen elhagyták a startpontot.

Normál fázisú tölteten végzett klasszikus oszlopkromatográfia gyakorlati végrehajtásának lépései

- az állófázis (oszloptöltet) és a kezdeti mozgófázis megválasztása, az oszlop töltetének elkészítése

A megválasztott töltetet a gradiens elúció kezdeti oldószereivel összekeverjük, és a légbuborékok távozása, valamint az állófázis szemcséinek duzzadása céljából néhány órán át állni hagyjuk. Ezután állandó keverés mellett az oszlopba öntjük (légbuborékmentesen), majd üleptjük. Az oszloptöltet mennyisége legalább 30-szorosa legyen az elválasztandó minta mennyiségének.

- az elválasztandó minta oldatának oszlopra juttatása

Az oszlopra az elválasztandó mintát közvetlenül oldat formájában vihetjük fel, ha a minta oldódik az elúció kezdeti lépésére használt oldószereben vagy oldószerkeleggyben. Ha ebben nem oldódik a minta, úgy oldatát kis mennyiségű töltetre adszorbeáltatva juttatjuk a kész oszlopra, s az elúciót a betöltésre használt oldószerevel (eluens) megkezdjük (13. ábra).

- gradiens elúció, frakciók szedése

Az elúciónál az eluensnek mindig fednie kell az állófázist. A légbuborékot magába záró oszlop nem megfelelő az elválasztásra.

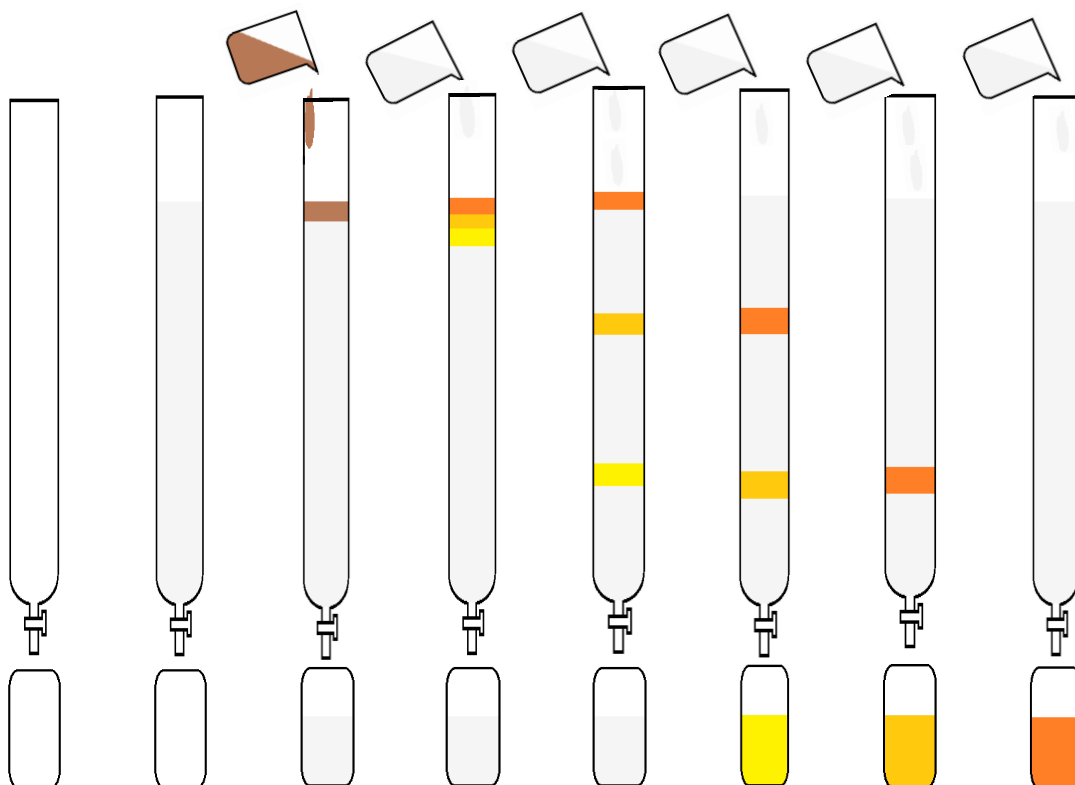
Az eluens utántöltése a közlekedő edények törvényének felhasználásával választótölcsérből is történhet. Az eluáló mozgófázis polaritását fokozatosan növeljük. Az oszlop méretének megfelelő térfogatú frakciókat szedünk manuálisan, vagy frakciónedővel.

- a frakciók analízise (rétegekromatográfia, spektroszkópia, stb.), a megfelelő, azonos összetételű frakciók összevonása, betöményítése

A frakciók analízisét legegyszerűbb esetekben rétegekromatográfiával végezzük, s az azonos összetételű frakciókat egyesítjük, bepároljuk.

- további tisztítás (újabb kromatográfias elválasztás, átkristályosítás)

Ha szükséges, további tisztításnak vetjük alá az egyesített frakciókat.



13. ábra Oszlopkromatográfia

2.3.3.2.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*)

A módszert az 1960-as években fejlesztették ki, s ma már a leggyakrabban használt kromatográfiai technikák egyike, amely mind analitikai, mind preparatív célú lehet. Alkalmazási területei széleskörűek. Használják a gyógyszeranalitikában, gyógyszerkutatásban, hatóanyag-meghatározásban, mennyiségi és minőségi analitikában, reakcióutak nyomonkövetésében, bomlás kimutatásában, élelmiszeriparban (vegyszermaradványok, peszticidek kimutatása), toxikológiai vizsgálatokban, környezetanalitikában, stb.

Nagynyomású folyadékkromatográfiának is nevezik, mivel a HPLC állófázisok szemcsemérete kicsi, és ebből következően az oszlopon levő nagy nyomásesés miatt a mozgófázist pumpa segítségével, nagy nyomás (max. 400 bar) alkalmazásával kényszerítik át az állófázison. De elnevezésére a HPLC rendszer magas ára miatt a „high price”, kromatográfiát is használják.

A HPLC **folyadékkromatográfiai, oszlop elrendezésű** módszer, amelynél a mozgófázis áramlását **kényszeráramlás** (pumpa) biztosítja. Ismerünk adszorpciós, NP-, RP-, megoszlásos-, gélkromatográfiai, stb. HPLC módszereket.

A HPLC jellemzői közül az elválasztás nagy hatékonyságát, a nagy fajlagos felületű állófázist, a rövid analízisidőt (néhány perc), a magasfokú műszerezettséget, jó reprodukálhatóságot, érzékeny, nagy teljesítőképességű detektorok használatát, az álló és a mozgófázis széles választékát, optimalizálhatóságát kell kiemelni. Az állófázis többször (több százszor) újrafelhasználható, a kromatográfiai körülmények könnyen változtathatóak, gradiens elúció végezhető, mintaszükséglete kicsi.

Az elválasztás ideje percekben mérhető (5-15 perc). A HPLC ng-tól kg mennyiségek elválasztására alkalmas.

Bevezetése lényeges változást, hatékony elválasztást eredményezett a klasszikus oszlopkromatográfiához viszonyítva.

A HPLC berendezés részei

A HPLC rendszer a következő részekből áll (14. ábra): az elválasztást végző oszlop, az eluenstartály, a pumpa vagy pumpák a megfelelő nyomásmérővel, mintaadagoló, detektor a hozzájuk tartozó számítógépes adattárolókkal.

A HPLC elválasztás legfontosabb része a kromatográfiás **oszlop (kolonna)** az állófázissal, amely acél vagy vastag falú üvegcső. Három típusú kolonna ismert: az analitikai, a preparatív és a védő kolonna.

A kolonna hossza analitikai elválasztás esetén általában 10-25 cm, preparatív elválasztásnál 60 cm, belső átmérője analitikai oszlopnál 2-8 mm, preparatív kromatográfiánál 20 cm. Gyakran alkalmaznak a HPLC-nél védőkolonnát, amely azonos anyagból készül, mint az elválasztásra szolgáló oszlop, de szemcsemérete nagyobb. A védőkolonna nemcsak az elválasztásra szolgáló oszlopot védi a mechanikai szennyeződésektől, hanem megakadályozza annak kontaminálódását, a nem kívánatos (pl. nagyon poláris) szennyezőanyagok oszlopra jutását, a kolonna idő előtti elszennyeződését.

Az elválasztás a HPLC-nél nagymértékben függ a hőmérséklettől, ezért jó, ha a kolonna termosztálva van, köpennyel van körülvéve.

Az **eluens-** (mozgófázis-) **tartály**: Gyakran két, vagy több eluenstartály használata szükséges a gradiens elúcióhoz, mivel ehhez több eluens szabályozott, változó arányban való keverése szükséges.

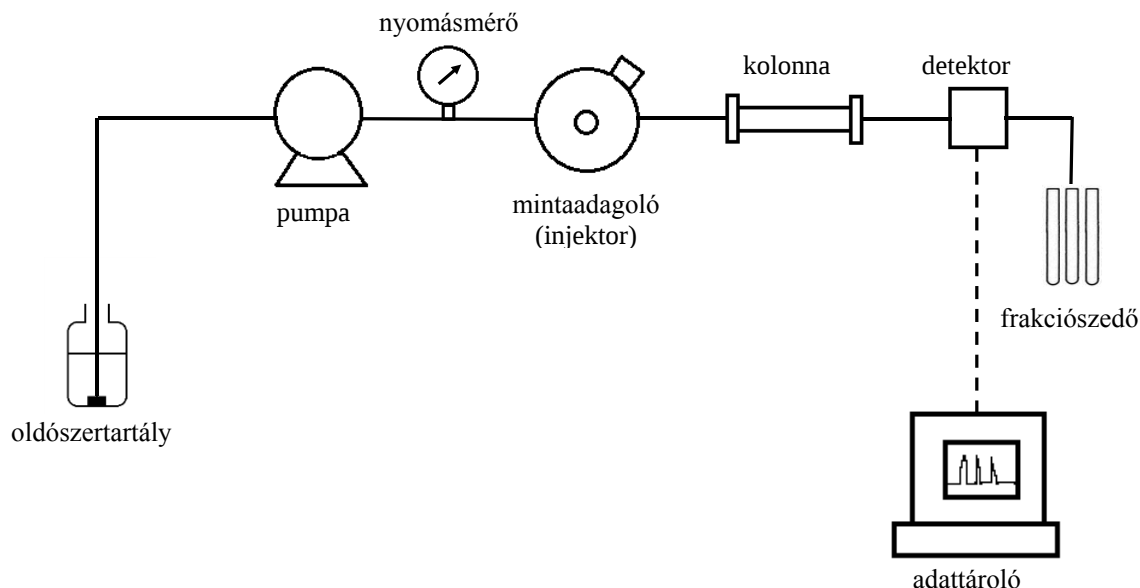
Pumpá(k): kéthengeres, dugattyús pumpák, amelyeknél fontos követelmény, hogy pulzálásmentes áramlást biztosítsanak. Általában 0,01-10 ml/perc térfogati sebességgel dolgoznak. A pumparendszernek alkalmasnak kell lennie gradiens elúció képzésre is, amelyet több pumpával és a pumpák utáni keveréssel, vagy a pumpákk előtti keveréssel és egy pumpa használatával lehet biztosítani.

Az **injektáló egység**: pontosan meghatározott térfogatú mintaadagoló hurokkal és kétutas szeleppel, amely meghatározott térfogat nyomás alatti injektálását teszi lehetővé. A mintaadagoló egyik pozíciójában légköri nyomáson bemérlik a mintát az egyik furatba (ágba), miközben az eluens áramlása a pumpából az oszlop felé folyamatos és zavartalan. Ezután elforgatva az adagolót a minta a nagy nyomású eluensáramba, majd a kolonnára kerül.

A mintaadagolás lehet manuális vagy automatikus.

Detektor: több, eltérő elven működő detektálási módot fejlesztettek ki. A leggyakrabban az UV-VIS detektor használatos. Ismert állandó és változtatható hullámhosszon működő változata. Törésmutatómérő, infravörös, elektrokémiai detektort is gyakran alkalmaznak, de igen megbízható minőségi és mennyiségi adatot szolgáltatnak a szelektív detektorok (pl. tömegspektrométer).

A detektorok össze vannak kötve **effluens gyűjtőkkel** (analitikai jellegű elválasztásoknál), vagy **frakciógyűjtőkkel** (preparatív célú elválasztásoknál). A detektorból kimenő elektronikus jelet az **adattárolóba**, vagy a rekorderbe vezetik.



14. ábra HPLC készülék

Követelmények a HPLC -nél

A mozgófázis levegőmentesítésének, szűrésének, a pulzálásmentes pumpa használatának, a gradiensképzés lehetőségének, és a nagy nyomásnál végezhető mintaadagolásnak mind biztosítottnak kell lennie a HPLC-nél. Ezeket a követelményeket a HPLC rendszer alkotói megfelelően nyújtják az oldószer levegőmentesítésén és szűrésén kívül. Az eluens és a minta oldata sem oldott gázokat, sem apró szemcsés szennyeződések nem tartalmazhat. Az előbbiek a detektorban felszabadulva a jel pulzálását idézhetik elő, míg az utóbbiak a töltet szemcsék közötti, mikrométernél kisebb járatokat eltömítik. Így az eluenseket és a mintát 0,2-0,45 μm -es pórusméretű szűrőn való vákuumszűréssel, és az eluens esetében ultrahangos vákuum alatti kezeléssel, vagy hélium folyamatos átbuborékoltatásával, vagy ezek kombinációjával kell előkészíteni a használatra.

A csúcsszélesedés a HPLC-nél igen kicsi, még nagy átfolyási sebesség esetén is. Ez a módszer egyik kiemelkedő előnye. HPLC-vel keskeny, éles csúcsokat lehet nyerni.

Állófázis és mozgófázis a HPLC-nél

A HPLC-nél elsősorban a fordított fázisok használata közkedvelt, de alkalmazzák a normál fázisokat is. Az állófázisok részecskemérete 5-10 μm , de már vannak 1-3 μm szemcseméretű állófázisok is.

Az állófázis **normálfázisú (NP) HPLC** esetén poláris (szilikagél, alumínium-oxid és kötött állófázis, ami poláris funkciós csoporttal módosított, pl. NH_2 -, NO_2 -, CN -csoporttal), melyeken az elválasztást az apoláris, vagy közepes polaritású mozgófázis végzi. Ezek kis viszkozitású, apoláris, lehetőleg jó UV áteresztőképességgel rendelkező oldószerek, amelyek kis vagy közepes térfogatszázalékban poláris módosítót (pl. metanol, aceton, etanol, stb.) tartalmazhatnak.

A poláris komponensek erősebben kötődnek a normál állófázishoz, mint az apolárisak. Így a poláris komponensek később hagyják el az elválasztásra használt kolonnát, jobban visszatartódnak (retardálódnak) az állófázis által, hosszabb a retenciós idejük, mint az apoláris komponenseké.

A **fordított fázisú (RP) HPLC**-nél leginkább alkalmazott állófázisok a kötött, apoláris, módosított felületű állófázisok. Ha a szilikagél felületére alkil-láncot (*n*-oktadecil, *n*-oktil, metil, stb.) vagy fenil csoportot kötnek, azaz kémiaiilag módosítják a felületét, fordított fázisú állófázist nyernek. Az így nyert állófázis apoláris (annál apolárisabb karakterű, minél hosszabb alkil-lánccal történt a szilikagél felületének beborítása). További gyakori RP-állófázis még a polimer bevonatú szilikagél. Ezekkel, az apoláris állófázisokkal vizes alapú, poláris mozgófázist használnak. A víz elúciós erőssége kicsi, és ehhez nagy elúciós erősségű szerves módosítót (metanol, etanol, 2-propanol, aceton, tetrahidrofurán, acetonitril, stb.) adnak.

A mintakomponensek **elválasztása** RP-HPLC-vel az elválasztandó molekula és az állófázis közötti **hidrofóbb kölcsönhatáson** alapul, amelyért döntően az állófázis a felelős. A mintakomponens apoláris része és az állófázis hidrofóbb felszíne között jön létre ez a kölcsönhatás, amelynek erőssége a hidrofóbicitási viszonyoktól függ. Először a poláris molekulák eluálódnak az RP-oszlopról, a nagyobb hidrofób felülettel rendelkező anyagok később eluálódnak, retenciós idejük hosszabb.

A HPLC elválasztás végrehajtásának lépései

A HPLC rendszert az elválasztás előtt át kell mosni az oldószerrendszerrel, hogy kialakuljon az **egyensúly** az álló és a mozgófázis között.

Ezután az oldószerben oldott minta az **injektálással**, és a pumpával áramoltatott mozgófázis segítségével a kolonnára kerül. A kolonnában levő állófázis kis szemcsemérete miatt nagy ellenállást képvisel. Ezzel szemben a pumpa teszi lehetővé a mozgófázis áramlását a kolonna teljes hosszában.

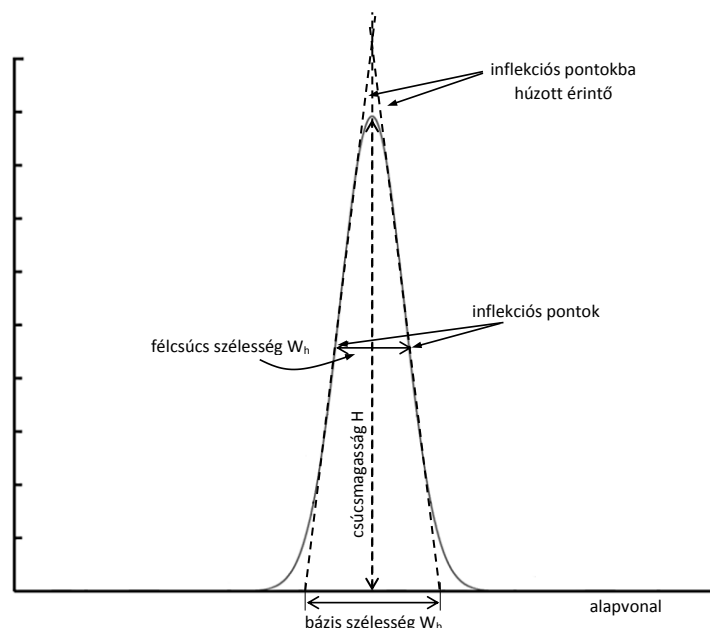
Az állófázist porózus részecskék alkotják, amelyek a porozitás miatt nagy felülettel rendelkeznek. Ez a nagy felület érintkezik a mozgófázissal, és ezen keresztül jön létre az anyagok megosztása, az anyagátadás. A mozgófázis az állófázis részecskéi közötti térben mozog, a pórusokban a mozgófázis mozdulatlan.

A komponensek áthaladnak a kolonnában töltött állófázison és sikeres elválasztás után eltérő retenciós idővel **eluálódnak** az oszlopról.

Elválasztás után a mintakomponensek eléri a **detektort**, ahol egy **jelet generálnak**. A detektorjelek, azaz a kromatográfiás csúcsok (15. ábra) jellemezhetőek a retenciós idővel, a csúcsmagassággal, a csúcs alatti területtel és a csúcsszélességgel. A csúcsmagasság (H) és a csúcs alatti (vagy görbe alatti) terület (A) arányos a megfelelő komponens mennyiségével.

A **csúcsmagasság (H)** a Gauss-görbe maximumától az alapvonalra húzott merőleges szakasszal egyenlő. A **csúcsszélesség** (bázis csúcsszélesség: W_b) a görbe csúcsától az inflexiós pontokon keresztül a görbe mindkét oldalán az alapvonalig húzott egyenesek által meghatározott szakasz.

Definiálható a félcsúcsszélesség (W_h) is, amely a magasság vonal felénél az érintők által bezárt szakasz.



15. ábra A kromatográfiás csúcs jellemzői

A: csúcs alatti terület, H: csúcsmagasság, W: csúcsszélesség.

A detektorjelek a rekorder segítségével adják a kromatogramot. Az integrátor kvalitatív és kvantitatív analízis végrehajtását biztosítja.

A **retenciós idő** (t_R) az injektálástól a görbe maximumának megjelenéséig eltelt idő (16. ábra).

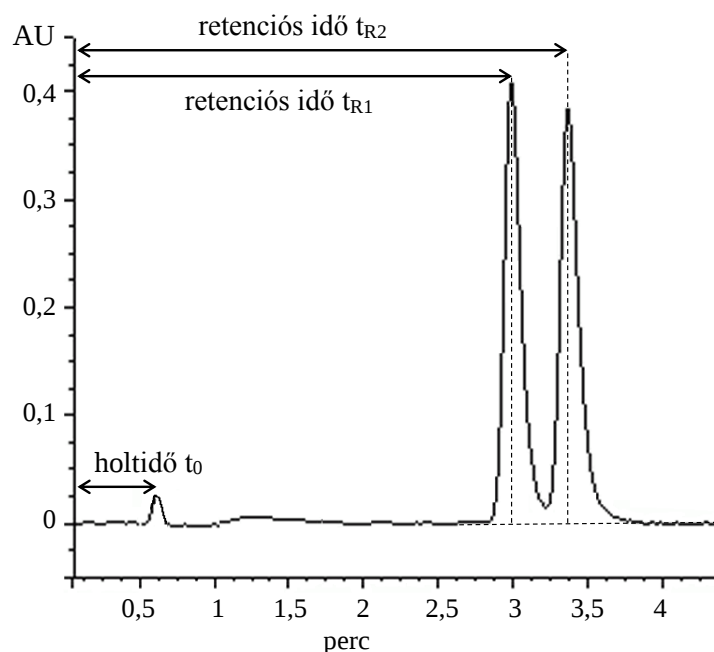
Ugyanazon kromatográfiás körülmények között egy tiszta anyag azonos retenciós időt ad.

A kromatogramon az első csúcs megjelenéséig az injektálástól eltelt idő a **holtidő** (t_0). Ez az első csúcs, a nem retardálódott komponensnek, vagy az oldószernek megfelelő csúcs, amely a mozgófázis sebességével halad.

A csúcs alatti terület (A) kiszámítható a csúcs magasságából és a csúcsszélességéből:

$$A = (H \times W_b) / 2 \text{ vagy a félmagasságból } (W_h),$$

$$A = H \times W_h$$



14. ábra A HPLC-vel nyert retenciós idők

Azért, hogy a különböző kolonnák és a mozgófázis különböző átfolyási sebességek használatával nyert kromatogramok összehasonlíthatók legyenek, definiálták a **kapacitási faktort** (k').

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

t_0 : a nem retardálódott anyag elúciós ideje (holtidő)

t_R : a célzott anyag retenciós ideje

Ha $k' = 0$, az anyag a nem retardálódott anyaggal együtt eluálódik, nincs elválasztás.

Ha $k' \leq 1$, az anyag csúcsa közel helyezkedik el a nem retardálódott anyag csúcsához, az állófázis kis késleltetést okoz az elúcióban.

$1 \leq k' \leq 15$, optimális elválasztási tartomány.

Ha $k' > 15$, hosszú az elúciós idő, csúcsszélesedés van.

A kolonna hatékonysága annál jobb, minél több csúcs jelenik meg szeparálódva a kromatogramon. A kolonna hatékony, ha keskeny, éles csúcsokat nyerünk kis csúcsszélességgel. Minél hosszabb a kolonna, annál jobb az elválasztás.

A kolonna hatékonysága jellemezhető az **elméleti tányérszámmal**. (N).

$N = (t_R/\theta)^2$, ahol $4\theta = W_b$ és θ : Gauss-görbe standard deviációja

Azért, hogy a különböző hosszúságú kolonnák összehasonlíthatóak legyenek definiálták az **elméleti tányérszám (N) magasság ekvivalensét (H)**.

$H = L/N$ L: a kolonna hossza

Egy kolonna annál hatékonyabb, minél nagyobb az N és minél kisebb a H.

A H az állófázis részecskeméretének 2-5-szöröse általában.

A **csúcsszeparálódás (felbontás, R)** fontos jellemzője az elválasztásnak.

$R = (t_{R2} - t_{R1}) / [(W_{b1} + W_{b2})/2]$

Az egyenlet azt mutatja, hogy minél nagyobb a retenciós idők különbsége, és minél keskenyebbek a kromatográfiás csúcsok, annál hatékonyabb az elválasztás. Az egyenletben szereplő paraméterek a kísérletes adatokból mind meghatározhatóak, és az elválasztás jellemzésére használhatóak.

Két komponens akkor szeparálódik el jól egymástól, ha az $R > 1$.

Ha az $R = 1$, akkor éppen elválasztódik a két komponens. Kvantitatív meghatározásra használható ez az elválasztás és a kapott kromatogram.

Ha az $R = 0,5$, akkor csak az látható a kromatogramon, hogy két komponens található a mintában, közel egymás mellett.

Ha az $R = 1,25$, akkor szép, alapvonalas elválasztást nyerünk.

Ha $R > 1,5$, akkor hosszú az analízis idő.

Az elválasztás hatékonysága jól jellemezhető a **szelektivitási tényezővel**, vagy szelektivitással (α), ami a kapacitási faktorok hányadosa.

$\alpha = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0) = k'_2 / k'_1$

Az α nagyon fontos paraméter a kromatográfiás elválasztás jellemzésére. Ha $\alpha = 1$, akkor a két komponens nem választható el egymástól. Az α értéke a kísérleti körülmények változtatásával jól befolyásolható.

A kromatogramban található információ **minőségi analízis**re is használható. A legegyszerűbb módszer egy adott kromatográfiás rendszeren mért **redukált retenciós idők** ($t_{R'} = t_R - t_0$, retenciós időből kivonva a holtidő) összehasonlítása ugyanazon a rendszeren mért ismert anyagok redukált retenciós időivel. Ilyenkor komoly bizonytalanságot okoz az azonosításban, hogy sokféle anyag adhat közeli retenciós idejű csúcsokat, amelyek a meghatározás körülményei mellett könnyen azonosnak tűnhetnek. Megbízhatóbbá tehetjük az ilyen összehasonlításon alapuló minőségi analízist, ha az összehasonlítást két különböző állófázist tartalmazó kolonnán vagy 3 eltérő mozgófázissal is elvégezzük. A legmegbízhatóbb eljárás azonban egyértelműen az, amikor a kromatográfot szelektív detektorral látjuk el (pl. tömegspektrométer), ilyenkor ugyanis a detektor összetett, az adott komponens anyagi minőségére jellemző jelet (spektrum) szolgáltat. Az ilyen detektorokkal az átfedő kromatográfiás csúcsokat adó komponensek is kellő biztonsággal azonosíthatók.

A kromatográfiás **menyiségi analízis** alapja a csúcsok területének (keskeny és éles csúcsok esetén a csúcsmagasság) arányossága a koncentrációval. Ismert koncentrációjú mintasorozat mérésével kalibrálva – vagyis kalibrációs görbe felvétele után – az ismeretlen anyag koncentrációja a görbéről meghatározható. A csúcsterületek meghatározása integrátorokkal illetve számítógépes adatgyűjtő programok segítségével történik. Manuális kiértékelés esetén a csúcs alatti terület számításával közelíthetjük meg az anyag mennyiségének meghatározását.

2.3.4. A kromatográfia felosztása a kromatográfiás elválasztás alapját képező fiziko-kémiai folyamatok, elválasztási mechanizmusok alapján

A kromatográfiás elválasztás alapját képező fiziko-kémiai folyamatok, az elválasztási mechanizmusok alapján ismerünk

- adszorpció
- megoszlásos
- ioncserés
- géliszűrési
- affinitási kromatográfiát

2.3.4.1. Adszorpciós kromatográfia

Az állófázis szilárd halmazállapotú adszorbens, a mozgófázis lehet gáz vagy folyadék. Az adszorbensek poláris tulajdonságúak, a mozgófázis általában apoláris karakterű, amint az a normál fázisú kromatográfiára jellemző. Az elválasztásnál az anyagok szorbensen való eltérő adszorpciós tulajdonságait használjuk fel, így a mintakomponensek különböző mértékű késleltetése történik meg az állófázison (adszorbensen) történő adszorpción keresztül.

Az adszorbensen való kötődés erősségét, az elválasztandó anyagok különböző visszatartását, következésképpen szétválását az összetevők polaritásán túlmenően az állófázis minősége, adszorpciós aktivitása (adszorpciós erőssége), és az áramló fázis tulajdonságai határozzák meg. Az adszorbensek adszorpciós aktivitására jellemző a Brockmann szabály, amely szerint az adszorpciós aktivitás (adszorpciós erő) és a dipólusmomentum között egyenes arányosság áll fenn.

Az adszorbensek reverzibilis kötési tulajdonságait az adszorbens felületén levő adszorpciós aktív helyek száma és minősége határozza meg. Versengés van az elválasztandó anyagok és az oldószer molekulák között az adszorbens aktív helyeiért.

Az alkalmazott mozgófázisok oldószer elegyek, amelyek az adszorbensen adszorbeálódott anyagokat különböző mértékben képesek az adszorbens felületéről szabadabbá tenni. A mozgófázis áramlása miatt az adszorpciós egyensúly folyamatosan zavart szenved, megbomlik, majd új körülmények között újraalakul, így lehetővé válik kismértékű adszorpciós különbségek kihasználása. Az oldószerek elúciós erősségük alapján eluotróp sorba rendezhetők, amely a legkevésbé poláris oldószerral veszi kezdetét, és minden utána következő oldószer az előzőnél polárisabb. Az eluotróp sor, amelyet empirikusan állítottak össze, növekvő dipólusmomentum szerinti rendezést jelent. Az adszorpciós kromatográfiában a legerősebb eluens a víz, illetőleg a hozzá polaritásban közel álló oldószerek (metanol, egyéb alkoholok, formaldehid, stb.)

Az állófázis (adszorbens) és a mozgófázis (oldószer) adszorpciós erősségére vonatkozóan ismertek matematikai összefüggések. A két fázis megválasztása az elválasztandó anyagkeverék tulajdonságainak tájékoztató jellegű ismeretében jórészt ma is tapasztalati úton történik.

Eluotróp sor Trappe szerint

Petroléter, ciklohexán, széntetraklorid, toluol, benzol, metilénklorid, kloroform, dietil-éter, tetrahidrofurán, etilacetát, piridin, aceton, *n*-propanol, metiletil-eton, *n*-butanol, etanol, metanol, víz, formaldehid.

Az adszorpciós kromatográfia hátránya a minta komponenseinek az adszorbensen való irreverzibilis kötődése, elhúzódó csúcsok, zónaszélesedés.

2.3.4.2. Megoszlásos kromatográfia

Az anyagok két, egymással nem elegyedő folyadékfázis közötti megoszlási egyensúlyi hányadosaik különbségén alapuló elválasztási eljárás. A két fázis közötti megoszlás alapja a Nernst törvény, amely kimondja, hogy egy adott anyag két, egymással nem elegyedő, vagy csak részlegesen elegyedő fázis között úgy oszlik meg az érintkező határfelületeken keresztül, hogy az anyag koncentrációjának a hányadosa a két fázisban egy állandó, az anyagra jellemző érték. Ez a megoszlási hányados (K). Az egyidejűleg jelenlevő mintakomponensek egymás viselkedését nem befolyásolják. Az eltérő megoszlási koefficiensű anyagok a két fázisban, a mozgó- és az állófázisban különböző koncentrációban lesznek jelen. Ez vezet elválasztásukhoz.

Az **állófázis** valamilyen inaktív anyagon (cellulóz szemcsék, szűrőpapír) kötődő, rögzített folyadékréteg vagy folyadék. A **mozgófázis** (eluens) áramlásakor a két folyadékfázis érintkezési felületén megújuló megoszlási egyensúlyok alakulnak ki, s ez vezet az anyagok elválasztásához.

A módszer előnye, hogy szimmetrikus csúcsokat ad, jól reprodukálható, nincs irreverzibilis kötődés. Nagymértékben hőmérsékletfüggő, ezért általában termosztálás szükséges.

2.3.4.3. Ioncserés kromatográfia

Folyadékkromatográfias módszer, amelynél az elválasztás az álló- és a mozgófázis közötti **ioncsere egyensúlyon** alapul.

Ionos vagy ionossá tehető anyagok elválasztására alkalmas: így alkaloidok, peptidok elkülönítésére, ezen kívül borát komplexszé, vagy hidrogén-szulfid származékká alakítható anyagok elválasztására.

Az állófázisok (ioncserélő műgyanták) első közelítésben egy hordozó felületén kötött, ionizálható, pozitív vagy negatív funkciós csoportokat tartalmaznak. A funkciós csoportok töltése alapján lehetnek anion- és kationcserélők vagy kevert típusú állófázisok.

A kationcserélők oldhatatlan savak, pl. polisztirolszulfonsav, ahol az anionon, tehát a negatív ionon (szulfonil, karbonil) cserélhető kationok, hidrogénionok foglalnak helyet, tehát pozitív töltésű ellenionok, kationok, illetve mintaösszetevők megkötésére, cseréjére képesek.

Az anioncserélők nagy molsúlyú vázán (oldhatatlan bázis) anionok (hidroxil-csoport) cserélhetők ki, és az anion ellenionok, mintaoösszetevők kötődnek meg, amelyek negatív töltésűek.

Amfoter (kevert) típusok, amelyek komplex szerkezetében pozitív és negatív töltésű ionizálható funkciós csoportokat is tartalmazhatnak.

Az elválasztás feltétele az aktív forma kialakítása aktiváló oldattal.

A megkötött anyag ekvivalens mennyiségének leszorítását az állófázisról az ionos mozgófázis végzi.

A cserekapacitás megállapítása NaCl-oldattal történik. A gyanták ioncserélő kapacitását az egységnyi gyantára jutó cserélhető protonok (ekvivalensek), vagy hidroxid-ionok mennyiségei adják meg.

2.3.4.4. Gélkromatográfia

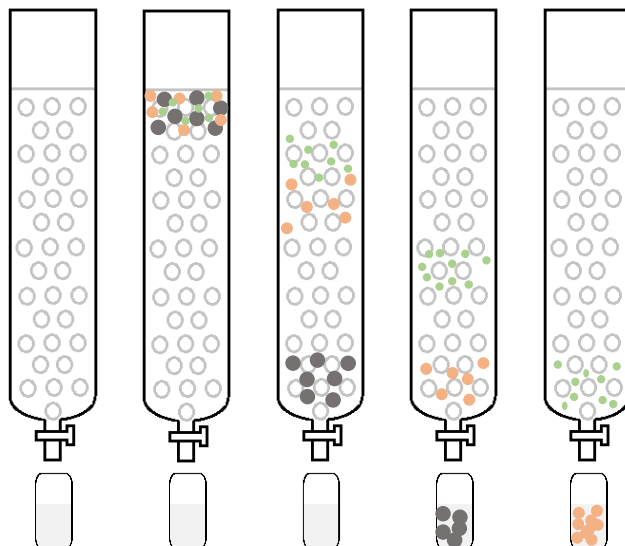
Az anyagok méret (molekulatömeg) szerinti elválasztására alkalmas **folyadékkromatográfias** módszer, amely a megoszlásos kromatográfia speciális változata.

Az állófázison, a géleken háromdimenziós szerkezetet tartalmazó, térhálós, vagy térhálósított, kiterjedt pórusrendszerrel rendelkező anyagokat értünk. A gélnek azt a részét, amit a gél mátrixa nem foglal el, folyadék tölti ki. A gél szemcsék közötti térben a mozgófázis szabadon mozog. A gél szemcsék belsejében levő tér, a korlátozott mozgásterű tér, ahol a mozgófázis áll. Ebbe a térbe diffúziójuk segítségével jutnak be a mintakomponens molekulák. A térháló mechanikai szilárdságot nyújt a gélnek, és a gél pórusméretét is meghatározza. Egy mozgófázissal megfelelő ideig duzzasztott gél jól definiált, adott méretű pórusokat képez. A gélkromatográfiánál az állófázis térfogatán a pórusok belsejében levő folyadékot, a mozgófázis térfogatán a gél szemcséi között áramló folyadékot értjük. Az álló- és mozgófázis térfogatát együttesen kis molekulával (KCl), a mozgófázis térfogatát pedig a gél pórusaiból teljesen kizáródott nagy molekulával (Blue-dextrán 200) tudjuk mérni.

A gélkromatográfias rendszerbe juttatott mintakomponens molekulák, amelyek a gél pórusméreténél nagyobbak, nem férnek be az állófázis pórusaiba, kizáródnak a gél pórusaiból és így a mozgófázissal azonos sebességgel vándorolnak, és a holt térfogattal eluálódnak. A gél pórusainál kisebb molekulák méretüktől függően bejutnak a pórusokba, ott több-kevesebb időt

töltenek (visszatartódnak), így elúciójuk késleltetést szenved, majd méretük csökkenő sorrendjében eluálódnak (17. ábra).

A géلكromatográfia elsősorban folyadék **oszlopkromatográfiás** módszer, de ismert a gél rétegekromatográfia is.



17. ábra Géلكromatográfiás elválasztás

A gélek nem léphetnek kémiai kölcsönhatásba az elválasztandó molekulákkal, s nem változtathatják meg másod-, harmadlagos szerkezetüket sem. Stabilnak kell lenniük pH 2-10 között. A géلكromatográfiában az adszorpció illetve a folyadék-folyadék közti megoszlás nem kívánatos folyamat, a megfelelően kialakított géلكromatográfiás rendszerekben csak ritkán jön létre.

A gélek típus szerint a géلكromatográfiának 2 fajtáját különböztetjük meg. Az első a főleg poláris, nagy molekulájú biológiai anyagok elválasztására, tisztítására használt gélek, amelyeknél a mozgó fázis vizes fázis. A másik a szerves oldószerekben (metanol, etanol, stb.) duzzadó gélek a kifejezetten apoláris, kis és közepes móltömegű vegyületek elválasztására alkalmas. A vizes oldatokkal használt géleknek is változás nélkül kell viselniük a szerves oldószereket, azok nem változtathatják meg a gélek későbbi vízfelvételi képességét.

A géلكromatográfia inkább preparatív módszernek tekinthető, mint analitikainak, felbontása megfelelő (csúcskapacitása 2-8 csúcs). Előnyei közé tartozik a rövid elválasztási idő, a gél többszöri felhasználhatósága, a mintavesztés nélküli elúció, előre megállapítható elválasztási idő, könnyen detektálható, keskeny csúcsok. Alkalmazása főleg a biokémiában jelentős. Gyakran csoportelválasztásra használják. További alkalmazási területei a makromolekulák

sómentesítése, moltömeg-meghatározás, polimerek molekulatömeg-eloszlásának meghatározása, előzetes tisztítás. Célszerű módszer lehet olyan esetekben is, amikor a minta komponenseinek tömege jelentősen eltér egymástól (pl. egyszerű cukrok elválasztása glikozidoktól).

Ma már igen elterjedt a gélkromatográfia használata szerves oldószeres rendszerekkel a kis moltömegű anyagok elválasztására, de itt már nem küszöbölhetők ki a megoszlásos jelenségek és az adszorpció.

2.3.4.5. Affinitási kromatográfia

Valamilyen biológiai kapcsolaton alapul, amely az állófázishoz kötött molekulák és a mozgófázisban haladó molekulák biospecifikus és reverzibilis kölcsönhatásán nyugszik. Elsősorban élettani makromolekulák és sajátos ligandumaik közötti kölcsönhatásról van szó, pl. szubsztrát/ enzim kapcsolat (glükóz – glükózidáz enzim), vagy antigén – antitest, vagy receptor – ligandum kapcsolaton alapuló kromatográfia.

Az affinitási kromatográfia előnye, hogy komplex biológiai mintából a kérdéses vegyület szelektíven, egyszerűen, kíméletesen, gyorsan kinyerhető, elválasztható.

A módszer hátránya, hogy a megfelelő állófázis elkészítése (ligandumok felkötése) rendszerint bonyolult, az állófázisok labilisak, élettartalmuk rövid, a speciális ligandumok drágák.

Normál (NP) és fordított (RP) fázisú kromatográfia

Az NP és RP folyadékkromatográfias módszerek megkülönböztetése az álló- és a mozgófázis polaritási viszonyaira vonatkozik. Ha az állófázis poláris és a mozgófázis az állófázisnál apolárisabb, akkor normál fázisú (NP), ellenkező esetben fordított fázisú (RP) kromatográfiáról beszélünk. Normál fázisú kromatográfia során apoláris alapú oldószereket használunk poláris módosítókkal, a fordított fázisú kromatográfia esetén vizes alapú (poláris) mozgófázisokat szerves oldószer (metanol, etanol, 2-propnol, acetonitril, tetrahidrofurán, stb.) módosítókkal.

A normál fázisú kromatográfias módszerek között az adszorpciós kromatográfia alapvető módszer, amelynél az állófázis adszorbens, például szilikagél, alumínium-oxid, stb. Normál fázisú állófázisok körébe tartoznak még a kovalens kötésekkel kialakított, viszonylag poláris funkciós csoportokkal módosított (CN, NO₂, NH₂) ún. kötött normál fázisok is.

A fordított fázisok között a leggyakrabban használtak az alkiláncsal (C₈, C₁₀, C₁₈, C₃₀, stb.) borított szilikagél alapú, ún. kötött állófázisok, de ide tartoznak az izopropil, fenil funkciós

csoportokat tartalmazók is. Az RP-HPLC alkalmas olyan poláris molekulák elválasztására, amelyek a normál fázishoz erősen kötődnek.

2.3.5. A kromatográfiás módszerek osztályozása a mozgófázis áramoltatása, a ható erők alapján

A mozgófázis áramoltatását előidéző hatóerők alapján megkülönböztetünk:

*folyadékmigráció

- gravitációs erőkkel áramoltatott (klasszikus oszlopkromatográfia)
- kapilláris erőkkel áramoltatott (papír- és rétegekromatográfia) és
- kényszeráramlásos kromatográfiát. Ez utóbbi esetben szivattyúval vagy pumpával történik a mozgófázis áramoltatása,

valamint

*elektromigrációs kromatográfiát (elektroforézis, elektrokromatográfia), ahol a hatóerő az elektromos erőter.

2.3.6. A kromatográfiás módszerek osztályozása a kifejlesztés alapján

A kifejlesztés alapján feloszthatjuk a kromatográfiás módszereket

- elúció
- frontális
- kizorításos kromatográfiára.

2.3.7. A kromatográfiás módszerek osztályozása a mozgófázis változása alapján

A mozgófázis változása (vagy változatlansága) alapján ismerünk

- izokratikus és
- gradiens (lépcsős, lineáris, konkáv, konvex gradiens) kromatográfiát.

Izokratikus kromatográfia esetén a mozgófázis összetétele nem változik az elválasztási folyamat alatt, míg a gradiens kromatográfiánál a mozgófázis elúció erőssége nő az elválasztási folyamat során.

Az alapvető extrakciós és kromatográfias módszerek elsajátítását a *Rutae* herbán, mint modellnövényen végezzük.

Rutae herba, kerti rutafű

Ruta graveolens (Rutaceae)

A drog a *Ruta graveolens* föld feletti része, melyet virágzás előtt gyűjtenek és árnyékban szárítanak. A növény 0,5-1 m magas félcserje. Szára alul fás, világosbarna, felül zöld, lágy sima, hengeres. A levelei 4-11 cm hosszúak és 3-7 cm szélesek, kékeszöld vagy sárga színűek, páratlanul szárnyasak. Álernyős virágzata van. A szár végén ötagú, az oldalágak végén pedig négytagú virágok találhatóak. A virágok kocsánnyal rendelkeznek, a csészecimpák kihegyesedők. A szíromlevelek zöldessárga színűek, a hegyük behajlik, szélük fodros és felhajlik. A levélkék lándzsa vagy ásó alakúak, a csúcsa pedig finoman csipkés.

A leveleket mikroszkóposan vizsgálva a következő jellemzők láthatóak: izolaterális szerkezetű, a felső epidermisz alatt keskeny, kétsoros paliszádparenchima található, alul pedig egysoros laza sejtekből álló paliszádparenchima van. A parenchimasejtekben buzogányfej alakú kalcium-oxalát kristályok találhatóak.

Gyakorlatokon elvégzendő feladatok

1. *Rutae herba* kivonása Soxhlet készülékben
2. *Rutae herba* kivonása perkolátorban különböző polaritású oldószerekkel, a kivonatok rétegekromatográfias összehasonlítása
3. *Rutae herba* kloroformos kivonatának oszlopkromatográfias frakcionálása, a frakciók rétegekromatográfias ellenőrzése
4. *Rutae herba* kloroformos kivonatának centrifugális rétegekromatográfias frakcionálása szilikagélen, a frakciók rétegekromatográfias ellenőrzése
5. Rutamarin izolálása preparatív rétegekromatográfiával, az elválasztás ellenőrzése
6. Kétdimenziós rétegekromatográfia

1. Rutae herba kivonása Soxhlet készülékben

20,0 g szárított, porított kerti rutát 15 ml metanollal főzőpohárban átnedvesítünk. 10 perc duzzasztás után a drogot szűrőpapírhüvelybe töltjük, majd behelyezzük a Soxhlet készülék kivonó részébe, és annyi metanolt öntünk rá, hogy az a drogot ellepje. A forraló lombikba annyi

metanolt töltünk, hogy a felhasznált mennyiség összesen 200 ml legyen. Horzsakövet helyezünk a lombikba és a készüléket fűtőkosárba tesszük. Az oldószer átcsepegtetésétől számítva kb. 60 percig folytatjuk a kivonást.

2. Rutae herba kivonása perkolátorban különböző polaritású oldószerekkel

5,0 g szárított, porított kerti rutát 15 ml kivonószerezrel (*n*-hexán, kloroform vagy 50%-os metanol/víz elegy) főzőpohárban átnedvesítünk. 10 perc duzzasztás után a drogot perkolátorba töltjük, melynek aljába előzetesen vattát helyeztünk. A betöltést követően a drogra kivonószert öntünk. 20 ml perkolátum összegyűjtése után a kivonást befejezzük. A kapott kloroformos kivonatot jól zárható edényben hűtőbe tesszük. A továbbiakban ezzel a kivonattal dolgozunk.

A kivonatok rétegekromatográfiás összehasonlítása

Szorbens:	szilikagél lemez	
Felvitel:	<i>n</i> -hexános kivonat	20 µl
	kloroformos kivonat	20 µl
	50%-os metanolos kivonat	10 µl
	rutamarin (0,1%-os metanolos oldata)	10 µl
	rutarin (0,1%-os metanolos oldata)	10 µl
	ribalínium-klorid (0,1%-os metanolos oldata)	10 µl

Kifejlesztő elegyek:

1. *n*-hexán – acetón 8 : 2
2. kloroform – metanol 9 : 1
3. etil-acetát – hangyasav – metanol – víz 10 : 2 : 2 : 0,5

Előhívás: UV fény (366 nm)

3. Rutae herba kloroformos kivonatának oszlopkromatográfiás frakcionálása, a frakciók rétegekromatográfiás ellenőrzése

Oszlopkromatográfiás frakcionálás

7 g szilikagélből (oszlopkromatográfiás célra) *n*-hexán – etil-acetát 8:2 eleggyel szuszpendálva oszlopot készítünk, amelynek tetejére felviszünk 1 ml kloroformos kivonatot (amelyet előzőleg betöményítettünk, és *n*-hexán – etil-acetát 8:2 elegyben feloldottunk). Az eluciót *n*-hexán – etil-acetát 8:2, 7:3 majd 1:1 arányú elegyével végezzük, először egy 20 ml-es, majd 5 ml-es frakciókat szedve.

Elució: 1-5. fr. *n*-hexán – etil-acetát 8:2
 6-10. fr. *n*-hexán – etil-acetát 7:3
 11-15. fr. *n*-hexán – etil-acetát 1:1

Vékonyrétegekromatográfiás ellenőrzés

Szorbens: szilikagél lemez

Felvitel: rutamarin (0,1%-os metanolos oldata) 10 µl
 eredeti kloroformos kivonat 10 µl
 oszlop frakciók 20-20 µl
 bergaptén (0,1%-os metanolos oldata) 10 µl

Kifejlesztő elegy: *n*-hexán – acetón 7:3

Előhívás: UV fény (366 nm)

4. Rutae herba kloroformos kivonatának centrifugális rétegekromatográfiás frakcionálása szilikagélen, a frakciók rétegekromatográfiás ellenőrzése

Centrifugális rétegekromatográfiás frakcionálás

30 g szilikagélből (60GF₂₅₄ 10-40 µm) 12 g gipsz (előzőleg 120 °C-on 1 órán át kiizzított) és 75 g desztillált víz felhasználásával öntött 1 mm vastag lemez közepére felviszünk 1 ml kloroformos kivonatot. Az eluciót *n*-hexán – etil-acetát 9:1; 8:2 majd 7:3 arányú elegyével végezzük, ~10 ml-es frakciókat szedve. Az áramlási sebesség: 5 ml/perc. (Az utolsó frakció után a kromatográfiás réteget először 50 ml etil-acetáttal, majd 100 ml metanollal le kell mosni.)

Elució: 1-10. fr. *n*-hexán – etil-acetát 9:1
 11-20. fr. *n*-hexán – etil-acetát 8:2
 21-30. fr. *n*-hexán – etil-acetát 7:3

Vékonyrétegekromatográfiás ellenőrzés

Szorbens: szilikagél lemez

Felvitel: rutamarin (0,1%-os metanolos oldata) 10 µl
 eredeti kloroformos kivonat 10 µl
 5-30 frakciók 20-20 µl
 bergaptén (0,1%-os metanolos oldata) 10 µl

Kifejlesztő elegy: *n*-hexán – acetón 7:3

Előhívás: UV fény (366 nm)

5. Rutamarin izolálása preparatív rétegekromatográfiával, az elválasztás ellenőrzése

Preparatív réteg készítése: 2,5 g szilikagélből (szemcseméret: 10-40 μm) kb. 7,5 ml desztillált vízzel dörzsmozsárban szuszpenziót készítünk. A szuszpenziót 10 $\times$ 20 cm-es zsírtalanított üveglapra öntjük és a lemezt szikkadás után szárítószekrényben 1 órán át 105 °C-on aktiváljuk.

A Rutae herba kloroformos kivonatából 50 μl -t viszünk fel a rétegre kb. 7 cm hosszú, 0,5 cm széles sávban. Mellé külön startpontként 10 μl rutamarin teszt (1 mg/ml) kerül. Megfuttatjuk *n*-hexán – aceton 8:2 arányú elegyében, és azt a sávot, amely a tesztel egyező magasságban van, bejelöljük és papírra kaparjuk, kicsit elporítjuk. Eluáló cső aljára vattapamatot teszünk, a szilikagél az eluáló csőbe szórjuk, majd 5 ml diklórmétán – metanol 9:1 arányú elegyével leszorítjuk a szilikagél felületéről az apoláris rutamarint. Az izolátumot kis porcelántálba gyűjtjük. A rétegekromatográfiás ellenőrzést szilikagél lemezen végezzük. A kifejllesztés *n*-hexán – aceton 8:2 arányú elegyben történik. A vizsgálat célja az izolált anyag (rutamarin) tisztaságának ellenőrzése.

6. Kétdimenziós rétegekromatográfia

10 $\times$ 10 cm-es szilikagél réteglapra felcseppentjük a Rutae herba kloroformos kivonatát (20 μl) és a teszteket (rutamarin, bergaptén 10-10 μl). A kifejllesztés *n*-hexán – aceton 8:2 elegyével történik a lemez magasságának $\frac{3}{4}$ -ig. Ezután a réteget 90°-kal elforgatjuk és a lemez bal oldalára újra felvisszük a két tesztet, és így is megfuttatjuk toluol – etilacetát – hangyasav 5:4:0,5 arányú elegyében a lemez $\frac{3}{4}$ -éig.

A kivonatban a rutamarin és bergaptén ott található, ahol R_F értékük mindkét futásirányban megegyezik a tesztekével. Ezzel a módszerrel több folt detektálható, mint az előző gyakorlaton alkalmazott egydimenziós rétegekromatográfia esetén.

Ellenőrző kérdések

- Sorolja fel a kivonás lépéseit!
- Mely tényezők és hogyan befolyásolják a kivonást?
- Hogyan végeztük a gyakorlaton a perkolálást?
- Soxhlet készülék részei, és működése.
- Mit tapasztal különböző polaritású kivonószerek alkalmazásakor?
- A kromatográfia csoportosítása a lejátszódó fizikai, kémiai és biológiai folyamatok alapján
- Milyen célból alkalmazhatunk vékonyrétegekromatográfiát?

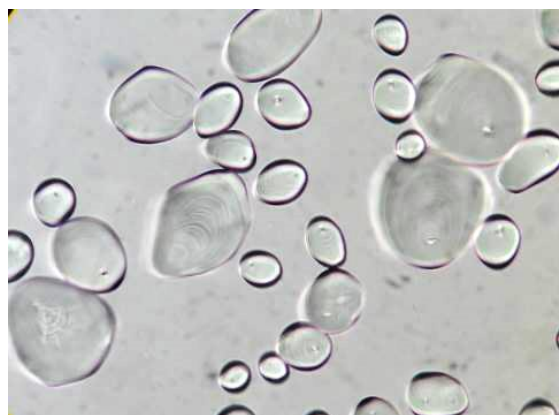
- Mik a vékonyrétegkromatográfia előnyei és befolyásoló tényezői?
- Melyek a vékonyrétegkromatográfia lépései?
- R_F -érték meghatározása
- Mire alkalmazható a kromatográfiában a szilikagél? Milyen tulajdonságokkal rendelkezik?
- Melyek az oszlopkromatográfia kivitelezésének lépései?
- Mit tapasztalt az oszlopkromatográfiás és a centrifugális rétegkromatográfiás elválasztás eredményeként?
- Mit jelent a grádiens elúció?
- Mit jelent az izokratikus elválasztás?
- Kétdimenziós rétegkromatográfia kivitelezése, célja és előnyei.
- Milyen főbb részekből áll a HPLC készülék?

3. Drogok vizsgálata

3.1. Szénhidráttartalmú drogok vizsgálata

Solani amylum, burgonyakeményítő

Solanum tuberosum (Solanaceae)



18. ábra Solani amylum mikroszkópos képe

Maydis amylum, kukoricakeményítő

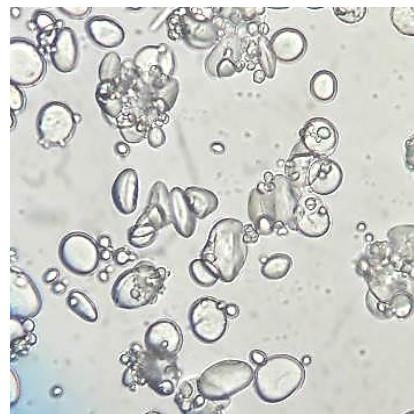
Zea mays (Poaceae)



19. ábra Maydis amylum mikroszkópos képe

Tritici amylum, búzakeményítő

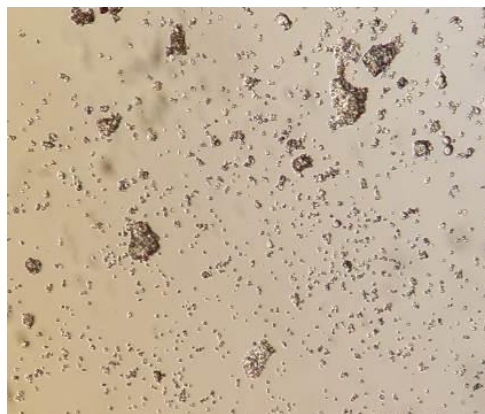
Triticum aestivum (Poaceae)



20. ábra Tritici amylum mikroszkópos képe

Oryzae amyllum, rizskeményítő

Oryza sativa (Poaceae)



21. ábra Oryzae amyllum mikroszkópos képe

Lini semen, lenmag

Lini oleum virginale, natív lenolaj

Linum usitatissimum (Linaceae)

A drog a házi len, *Linum usitatissimum* érett, megszárított magja. A lenmag lapított, hosszúkas tojásdad alakú. A maghéj sötét vörösesbarna, vagy sárga színű, sima és fénylő felszínű. A magok 4-6 mm hosszúak, 2-3 mm szélesek és 1,5-2 mm vastagok; egyik végük lekerekített, másik végük egy ferde csúcsot képez, ami mellett a köldök kis mélyedés formájában látható. Nagyítóval vizsgálva látható, hogy a maghéj finoman gördös felszínű. A maghéj alatt található az endospermium keskeny, fehéres rétege, és a csíra, amely két nagy, lapos, sárgás, olajos sziklevéllel rendelkezik. A gyököcske a köldökkel szemben található.

Az elporított drog olajos tapintású. Mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldatban vizsgálva, a következő figyelhetők meg benne: a maghéj külső rétegének, a nyálkaepidermisznek a töredékei, valamint erősen megvastagodott, gödörkés falú, hosszúkas sejtekből álló szklerenchimatikus réteghez kapcsolódó, kollenchimásan vastagodott epidermisz alatti réteg darabjai, amelyek felülnézetben kerekded sejteknek látszanak, kivehetően háromszögletes sejtközi üregekkel. Láthatóak még az átlátszó réteg vékony, gödörkés falú sejtjei, amelyek gyakran a hosszúkas kősejtekhez kapcsolódnak, velük derékszöget alkotva és a maghéj belső rétegének pigmentsejtjei, amelyek mérsékelten vastagodott, sokszögletes sejtek, belsejükben narancsbarna pigmenttel. A csíra és az endospermium parenchimasejtjei aleuronszemeket és zsírosolajat tartalmaznak.

A natív lenolajat a növény érett magvaiból hideg sajtolással állítják elő. Sárga, vagy barnássárga, tiszta folyadék; színe levegő hatására sötétedik, sűrűsége fokozatosan nő. Lehűtve,

kb. –20 °C-on, lágy tömeggé alakul. Alkoholban alig oldódik; petroléterrel elegyedik. Relatív sűrűsége kb. 0,931, törésmutatója kb. 1,480.

Althaeae radix, orvosi ziliz gyökér

Althaea officinalis (Malvaceae)

A drog az orvosi ziliz (fehér mályva) – *Althaea officinalis* egész vagy aprított, hámozott vagy hámozatlan, szárított gyökere.

A hámozatlan, aprítatlan drog enyhén csavarodott, hengeres. Legfeljebb 2 cm vastag gyökerekből áll, amelyeken mély hosszanti barázdák vannak. Kívül szürkésbarna színű. A törési felszín kívül rostos, belül tömött, szemcsés. A metszeten barnás paraszövettel borított, többé-kevésbé vastag, fehéres kéreg látható, amelyet a barnás kambium választ el a fehér farésztől. Megnedvesítve a kéreg réteges és a fa sugaras szerkezete még feltűnőbb. A hámozott drognak szürkésfehér, finom rostos külső felszíne van. A paraszövet és a külső parenchimaréteg hiányzik.

A porított drog hámozatlan gyökér esetén barnásszürke, a hámozott gyökér esetén pedig fehéres. A drogporban R klorál-hidrát-oldatban mikroszkóp alatt vizsgálva a következő diagnosztikai jelentőségű ismertetőjegyek láthatóak: szintelen, kihegyezett vagy csapott végű, főleg nem fásodott, vastag falú rostok töredékei; vermes-gödörkés vagy létrás sejtfalvastagodású edények darabjai; kb. 20-35 µm (leggyakrabban 25-30 µm) méretű, buzogányfej alakú kalcium-oxalát kristályok; nyálkatartalmú parenchima sejtek; hámozatlan gyökér esetén a paraszövet darabjai vékony falú, lemezes sejtek formájában láthatóak. A drogporban, R vízben mikroszkóppal vizsgálva számos 3-25 µm méretű, esetenként hosszanti hasítókkal rendelkező keményítőszemcsék figyelhetők meg.

Acaciae gummi, akáciamézga

Acacia senegal (Mimosaceae)

A drog az *Acacia senegal*, vagy más afrikai *Acacia* fajok, illetve az *Acacia seyal* fatörzsének, vagy ágainak természetes módon, vagy bemetszés hatására kifolyt, levegőn megkeményedett, gumyszerű váladéka.

Kétszeres mennyiségű vízben a drog majdnem tökéletesen, de nagyon lassan, mintegy 2 óra alatt oldódik fel. Oldódása után csak kis mennyiségű, növényi darabkákból álló oldhatatlan anyag marad vissza. A kapott nyálkás oldat szintelen vagy sárgás, sűrűn folyó, ragadós, áttetsző,

kék lakmuspapírral vizsgálva enyhén savas kémhatású. Az akaciamézga etanolban gyakorlatilag oldhatatlan.

A drog sárgásfehér, sárga, vagy borostyánkő színű, néha vörösesen fénylő, opálos, morzsálódó, gömbölyű, ovális vagy vese alakú, gyakran repedezett felszínű darabkákból áll, amelyek átmérője 1-3 cm között változik. A darabkák középpontjában néha egy kis üreg található. Ezek a darabkák könnyen törnek, a töredékek szabálytalanok, fehérrestől gyengén sárgásig terjedő árnyalatúak, szögletesek, üvegszerűen áttetszők. Törési felszínük kagylós.

Az elporított droppor fehér, vagy sárgásfehér színű. Mikroszkóp alatt, 50%-os glicerinnel alkalmazásával vizsgálva, a mintában szögletes, szabálytalan, szintelen, átlátszó töredékek láthatók. Keményítőszemcsék, illetve növényi szövettöredékek csak nyomokban fordulnak elő. Rétegzett membránok nem láthatók.

Agar, Agar

Gelidium sp. (Rhodophyceae)

Az agart különböző vörösmoszatok, a Rhodophyceae családba tartozó fajok, főleg a *Gelidium* nemzetség fajainak poliszacharidjai adják; ezen algák forró vízzel kivont, szűrt, betöményített és szárított anyaga szolgáltatja a drogot.

Az agar nyálkás ízű. Porított készítményként, illetve szintelen, vagy halványsárga, áttetsző, szívós, nehezen törhető, szárítás során ridegebbé váló, 2-5 mm széles szalagok, vagy néha pelyhek formájában fordul elő.

A szalag vagy pelyhes formájú agart 0,005 M jód-oldatban mikroszkóppal vizsgálva részleges barnás-lila szineződés látható. 100-szoros nagyításnál homályos háttérben számos kicsi, szintelen, ovális vagy kerekded szemcse figyelhető meg. A porrá őrölt drog színe sárgásfehér. 0,005 M jód-oldatban mikroszkóppal vizsgálva, a porban töredékek figyelhetők meg számos, a szalagokban és pelyhekben látottakhoz hasonló szemcsével. A töredékek egy része barnáslila színűre festődik.

Gyakorlatokon elvégzendő feladatok

1. Keményítők vizsgálata (Maydis amylum, Oryzae amylum, Solani amylum, Triticum amylum)
 - 1.1. azonossági reakciók
 - 1.2. szennyezések kimutatása (Amylum solubile, CaCO_3 , idegen keményítő)
 - 1.3. mikroszkópos vizsgálat
2. Mikroszkópos nagyságmérés
3. Lanugo gossypii vizsgálata
4. Poliszacharid izolálása Lini semenből és Althaeae radixból. Az izolált poliszacharid cukorkomponenseinek meghatározása rétegkromatográfiával
5. Acaciae gummi, Tragacantha azonossági és tisztasági vizsgálata
6. Agar duzzadási értékének meghatározása

1. Keményítők vizsgálata

1.1. Azonossági reakciók

0,2 g keményítőt 10 ml vízzel melegítéssel oldunk. A keményítő forró vízzel készült 2%-os oldata csaknem átlátszó, tiszta, szagtalan. Az oldathoz lehűlés után 1 csepp 0,01 n jódot oldatot adunk.

Az oldatot ismét felmelegítjük.

Az oldathoz lehűlés után 1-2 csepp R nátrium-hidroxid oldatot adunk.

Az oldathoz 1-2 csepp R sósavat adunk.

1.2. Szennyezések kimutatása

- Oldható keményítő (Amylum solubile): 1 g keményítőt 10 ml hideg vízzel néhány percen át rázogatom. A folyadékot papíroson szűrjük, a szűrlethez 1 csepp 0,01 n jódot oldatot adunk.
- CaCO_3 : kis mennyiségű drogport porcelántálba teszünk, majd 1 csepp R sósavval megcseppentjük.
- Idegen keményítő: a szennyezés alakjáról és nagyságáról mikroszkóposan felismerhető.

1.3. Mikroszkópos vizsgálat

Keményítőszemcsék azonosítását méretük, jellegzetes alakjuk, rétegzettségük teszi lehetővé. Kis mennyiségű keményítőport tárgylemezre helyezve, majd R glicerín és R víz egyenlő térfogatarányú elegyével megcseppentve, fedőlemezzel lefedve mikroszkóp alatt, legalább 20-szoros nagyítással vizsgálunk.

2. Mikroszkópos nagyságmérés

A drogok azonosításában, és a szennyezések kimutatásában fontos szerepe van a mikroszkópos nagyságmérésnek is.

A nagyságméréshez az alábbi két segédeszközre van szükség:

1. Okulármikrométer (22. ábra)

A mikroszkóp jobb okulárjának helyére tehető, optikai részében a dobbal mozgatható skálát tartalmazó eszköz.

Részei:

1. Objektív
2. Dob
3. Rögzítőcsavar



22. ábra Okulármikrométer

2. Tárgymikrométer (23. ábra)

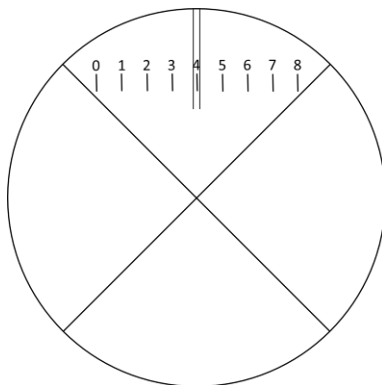
Az okulármikrométer kalibrálására szolgáló olyan tárgylemez, amelyen egy 100 egységre osztott 1 mm-es skála (mérce) található.



23. ábra Tárgymikrométer

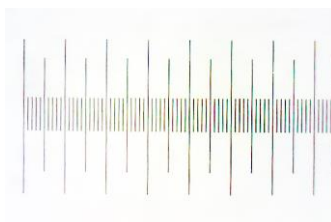
A mérés menete

1. A kalibráláshoz a mikroszkóp jobb okulárját eltávolítjuk, és helyére az okulármikrométert helyezzük. A rögzítőcsavarral rögzítjük az okulármikrométert. Az okulármikrométerbe nézve az alábbi skálát láthatjuk (24. ábra):



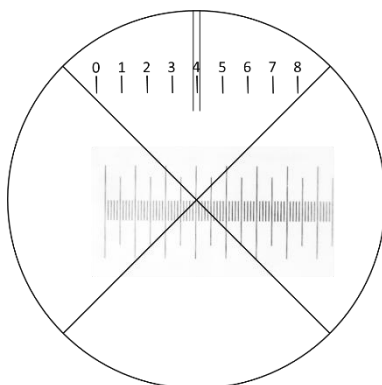
24. ábra Okulármikrométerben látható skála

2. A tárgymikrométert a tárgyasztalra helyezzük és azt a nagyítást használva, amelyen a mérés is történni fog, megkeressük a skálát, amely a következőképpen néz ki (25. ábra):



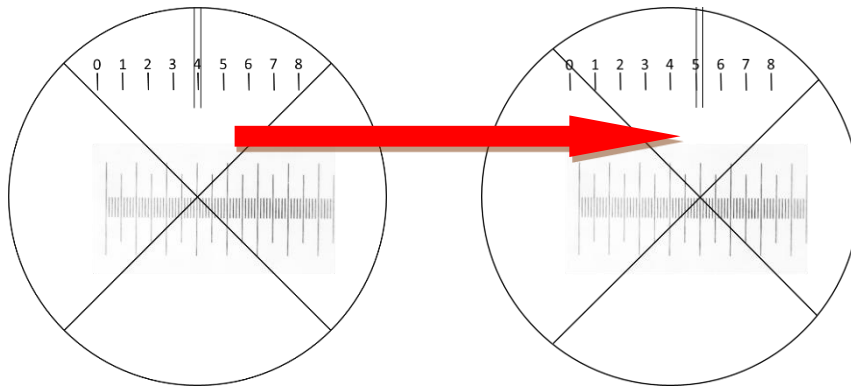
25. ábra A tárgymikrométer skálája

3. Az okulármikrométert és a rajta lévő dobót addig forgatjuk, míg a fonalkereszt „X” középpontja az egyik nagy osztásra nem ér (26. ábra).



26. ábra A kalibrálás kezdőpontja

4. Leolvassuk a dobértéket. A százás helyiértékű számjegyet az okulármikrométer mikroszkópban látható skálájáról, a tízes és egyes helyi értékű számjegyeket a dobról olvashatjuk le.
5. Az okulármikrométer fonalkeresztjét az egyik nagy beosztásról egy másikra mozgatjuk át a dob segítségével. A könnyebb számolás érdekében célszerű 10 egységet (100 µm) haladni a tárgylemez-skáláján (27. ábra).



27. ábra A kalibrálás

6. Ismételten leolvassuk a dobértéket, és kiszámoljuk hány dobegységet (DE) haladtunk a tárgymikrométer skáláján. Pl.: Ha a kezdeti érték 404 DE, a szálkereszt átállítása utáni érték pedig 534 DE akkor 130 DE-t haladtunk.
7. A méréshez kioldjuk az okulármikrométer rögzítőcsavarját és a fonalkeresztet a kalibráláshoz hasonlóan a mérendő rész széléhez igazítjuk.
8. Az okulármikrométer rögzítését követően leolvassuk a kezdeti és a fonalkereszt elmozgatása utáni végső dobértéket. A megmért növényi rész mérete aránypárral kifejezhető:
9. Pl.: A kalibrálás során 10 osztást (100 µm-t) haladva a tárgylemez-mikrométer skálán 130 DE-t tekertünk az okulármikrométeren, a megmért rész pedig 67 DE méretű volt. Így:

100 µm	130 DE
X µm	67 DE
$X = 100 \times 67 / 130 = \underline{\underline{51,54 \mu m}}$	

Példák mikroszkópos nagyságmérésre

- I. Az édeskömény szkizogén illóolajjáratának átmérőjét okulármikrométerrel 345 dobegységnek mértük. Ugyanezen nagyítás mellett elvégeztük az okulármikrométer kalibrálását. Ekkor a tárgymikrométer 0,4 mm-re 552 dobegység volt. Hány μm az édeskömény szkizogén illóolajjáratának átmérője?

$$\begin{array}{rcl} 0,4 \text{ mm} & = & 400 \mu\text{m} \quad 552 \text{ DE} \\ & & X \mu\text{m} \quad 345 \text{ DE} \\ X & = & 345/552 \times 400 \mu\text{m} = \underline{\underline{250 \mu\text{m}}} \end{array}$$

Az édeskömény szkizogén illóolajjáratának átmérője: 250 μm

- II. Az okulármikrométer dobegységének kalibrálása során a tárgymikrométer 0,3 mm-e 345 dobértéknek felelt meg. Egy keményítőszemcse átmérőjét az okulármikrométerrel 46 dobegységnek mértük. Hány μm a keményítőszemcse átmérője?

$$\begin{array}{rcl} 0,3 \text{ mm} & = & 300 \mu\text{m} \quad 345 \text{ DE} \\ & & X \mu\text{m} \quad 46 \text{ DE} \\ X & = & 46/345 \times 300 \mu\text{m} = \underline{\underline{40 \mu\text{m}}} \end{array}$$

A keményítőszemcse átmérője: 40 μm

- III. Az okulármikrométer dobegységének kalibrálása során a tárgymikrométer 0,15 mm-e 165 dobértéknek felelt meg. Egy cellulózzsál átmérőjét az okulármikrométerrel 88 dobegységnek mértük. Hány μm a cellulózzsál átmérője?

$$\begin{array}{rcl} 0,15 \text{ mm} & = & 150 \mu\text{m} \quad 165 \text{ DE} \\ & & X \mu\text{m} \quad 88 \text{ DE} \\ X & = & 88/165 \times 150 \mu\text{m} = \underline{\underline{80 \mu\text{m}}} \end{array}$$

A cellulózzsál átmérője: 80 μm

3. Lanugo gossypii vizsgálata

Schweizer-reakció: Tárgylemezre helyezett néhány szál gyapotot fedőlemezzel lefedve, mikroszkóp alá helyezünk, és a mikroszkópot élesre állítjuk. Ezután a fedőlemez széléhez 1-2 csepp Schweizer-reagenst (réz(II)-oxid tömény ammóniával készült oldata) cseppentünk, és mikroszkóp alatt kb. fél óra elteltével figyeljük a duzzadás folyamatát.

Behrens-reakció: Tárgylemezre helyezett néhány szál gyapotot fedőlemezzel lefedve, mikroszkóp alatt beállítunk. A fedőlemez széléhez Behrens-reagenst (kálium-jodid és jód cink-kloridos oldata) cseppentünk. A változást 10-15 perc elteltével megfigyeljük.

4. Poliszacharid izolálása Lini semenből és Althaeae radixból és az izolált poliszacharid cukorkomponenseinek meghatározása rétegekromatográfiával

Poliszacharid izolálása Lini semenből és Althaeae radixból

Lini semenből történő poliszacharid izolálásakor a drogot nem kell porítani. 5 g drogból 40 ml desztillált vízzel 30 perces vízfürdőn történő melegítéssel kivonatot készítünk. Hűtést követően a kivonatot 3 réteg gézlapon megsűrjük. A szűrlethez 3×-os mennyiségű hideg metanolt adva a poliszacharidot kicsapjuk. A csapadékot szűrőpapíron szűrjük, majd 2×5 ml acetonnal mossuk.

Althaeae radix esetén 5 g porított drogból 50 ml desztillált vízzel 30 perces vízfürdőn történő melegítéssel kivonatot készítünk. Hűtést követően a kivonatot 5 réteg gézlapon megsűrjük. A szűrlethez 2×-es mennyiségű hideg metanolt adva a poliszacharidot kicsapjuk. A csapadékot szűrőpapíron szűrjük, majd 2×5 ml acetonnal mossuk.

Az izolált poliszacharid hidrolizálása

50 mg megszárított poliszacharidot kémcsőben 5 ml 1 M H_2SO_4 -val vízfürdőbe merítve egy órán keresztül hidrolizáljuk. Ezt követően semlegesítést végzünk vízfürdőn forralás mellett BaCO_3 -tal, míg a pezsgés meg nem szűnik (pH-ellenőrzés indikátor papírral). Lehűtés, ülepedés és szűrés után az oldatból 1 ml-t kiveszünk és a kapott hidrolizátumot metanollal a duplájára hígítjuk. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálathoz ebből az oldatból használunk fel 10 μl -t.

A hidrolízis ellenőrzése vékonyréteg-kromatográfiával

Réteg:	szilikagél lemez
Felvitel:	10-10 µl hidrolizátum 10 µl 0,1% glükóz + 10 µl 0,1% xilóz 10 µl 0,1% galaktóz + 10 µl 0,1% arabinóz
Kifejlesztő elegy:	kloroform – aceton – víz 10:90:10
Előhívó reagens:	timol-kénsav reagenssel történő bepermetezés után 105 °C-on.

5. Acaciae gummi, Tragacantha azonossági és tisztasági vizsgálata

Acaciae gummi azonossági és tisztasági vizsgálata

A vizsgálatokat az akáciamézga 10%-os vizes oldatával végezzük.

1. Poliszacharid-kimutatás:

2 ml oldathoz 20 ml 90 %-os metanolt adunk.

2. Arabinsav-kimutatás:

2,5 ml oldathoz 5 ml néhány csepp R-ecetsavval savanyított 90 %-os metanolt adunk

3. Kalcium-kimutatás:

Az arabinsav kimutatását követően az oldatot szűrőpapíron megsűrjük. Az így kapott szüredékhez 1 ml R ammónium-oxalát oldatot adunk.

Következő lépésben az oldathoz R sósavat adunk.

4. Poliszacharid-kimutatás:

2 ml oldathoz 2 csepp bázisos ólomacetát adunk.

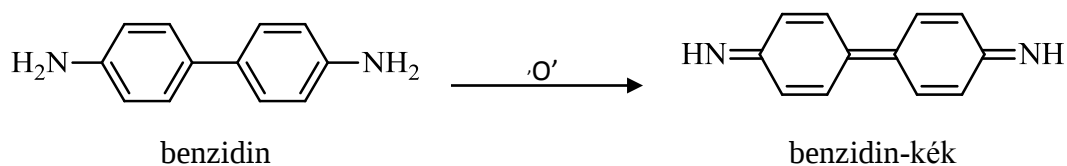
5. Keményítő kizárása:

5 ml oldathoz 1 csepp 0,01 n jóddoldatot adunk.

A folyadék felforraljuk, majd lehűtjük, és további 1 csepp jóddoldatot adunk hozzá.

6. Peroxidáz enzim kimutatása (enzimtartalmú és enzimmentes drogból) (28. ábra):

5 ml oldathoz 5 csepp 3%-os hidrogén-peroxid oldatot és 5 csepp 1%-os alkoholos benzidin oldatot adunk. A reakcióelegyet néhány perc múlva vizsgáljuk.



28. ábra Acaciae gummi (peroxidáz enzim kimutatása)

Tragacantha azonosító reakciói

A vizsgálatokat a tragakanta 0,5 %-os vizes oldatával végezzük.

1. Poliszacharid-kimutatás:

10 ml nyálkához 5 ml bázisos ólomacetát oldatot adunk.

2. Keményítő kimutatása:

5 ml oldathoz 1-2 csepp 0,01 n jóddoldat adunk.

6. Agar duzzadási értékének meghatározása

A *duzzadási érték* az a milliliterben kifejezett térfogat, amelyet 1 g drog a hozzátapadó nyálkával együtt kitölt, miután 4 órán át vizes folyadékban duzzasztottuk.

1 g porított drogot csiszolt dugós 25 ml-es mérőhengerbe teszünk. 1 ml metanollal átnedvesítjük, és desztillált vízzel feltöltjük 25 ml-re. Ezután fél órán át 10 percenként összerázzuk, majd további egy órán át állni hagyjuk. 60 perccel a vizsgálat megkezdése után a mérőhenger óvatos mozgatásával a folyadék zárványokat kiszabadítjuk. A megduzzadt drog térfogatát a hozzátapadt nyálkával együtt leolvassuk.

Ellenőrző kérdések:

- Monoszacharidok rövid jellemzése, fontosabb képviselőik
- Poliszacharidok rövid jellemzése, fontosabb képviselőik
- Keményítők kémiai felépítése, felhasználása
- Különböző növényi eredetű keményítők megkülönböztetése mikroszkópos vizsgálattal
- Keményítő kimutatása kémcsőreakcióval
- Keményítők szennyezésvizsgálatai
- Cellulóz kémiai jellemzése, kimutatása
- A nyálkák rövid jellemzése
- A mézgák rövid jellemzése
- Hogyan végeztük a poliszacharid izolálását és monoszacharid-összetételének vizsgálatát a Lini semenből?
- Az akáciamézga azonosítási reakciói
- Az akáciamézga szennyezésvizsgálatai
- A tragakanta azonosítási reakciói
- A duzzadási érték fogalma
- A duzzadási érték meghatározása

3.2. Zsíros olajok vizsgálata

Ricini oleum virginale, natív ricinusolaj

Ricinus communis (Euphorbiaceae)

A *Ricinus communis* magvaiból hidegen történő sajtolással előállított zsíros olaj. Tiszta, csaknem színtelen, vagy enyhén sárga, viszkózus folyadék; nedvszívó. Petroléterben kevésbé oldódik; alkohollal és tömény ecetsavval elegyedik. Törésmutatója kb. 1,479 és relatív sűrűsége kb. 0,958.

Olivae oleum virginale, natív olívaolaj

Olea europaea (Oleaceae)

Az *Olea europaea* érett, csonthéjas terméséből hideg sajtolással, vagy más, alkalmas mechanikus eljárással nyert zsíros olaj. Sárga vagy zöldessárga, tiszta, átlátszó folyadék. Etanolban (96%) gyakorlatilag nem oldódik; petroléterrel (fp: 50–70 °C) elegyedik. Jellemző szagú. Az anyag lehűtve 10 °C-on megzavarosodik, és 0 °C-on vajszerű tömeggé szilárdul. Relatív sűrűsége kb. 0,913.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

Zsíros olajok vizsgálata (Helianthi annui oleum raffinatum, Lini oleum virginale, Ricini oleum virginale, Olivae oleum, Jecoris oleum)

1. Zsíros olajok összehasonlító vizsgálata rétegekromatográfiával
2. Avasság kimutatása
3. A-vitamin kimutatása Jecoris oleumból

1. Zsíros olajok összehasonlító vizsgálata rétegekromatográfiával

A. Szorbens:	normál fázisú szilikagél	
	vagy normál fázisú HPTLC szilikagél	
Startpontok:	kloroformmal hígított napraforgóolaj	10 µl
	kloroformmal hígított lenolaj	10 µl
	kloroformmal hígított olívaolaj	10 µl
	kloroformmal hígított ricinusolaj	10 µl

Kifejlesztő elegy: Petroléter – éter – ecetsav 90 : 10 : 0,8

Előhívás: Jódgőzzel telített kamrába helyezzük a lemezeket, majd kivétel után néhány perc elteltével keményítő oldattal bepermetezzük.

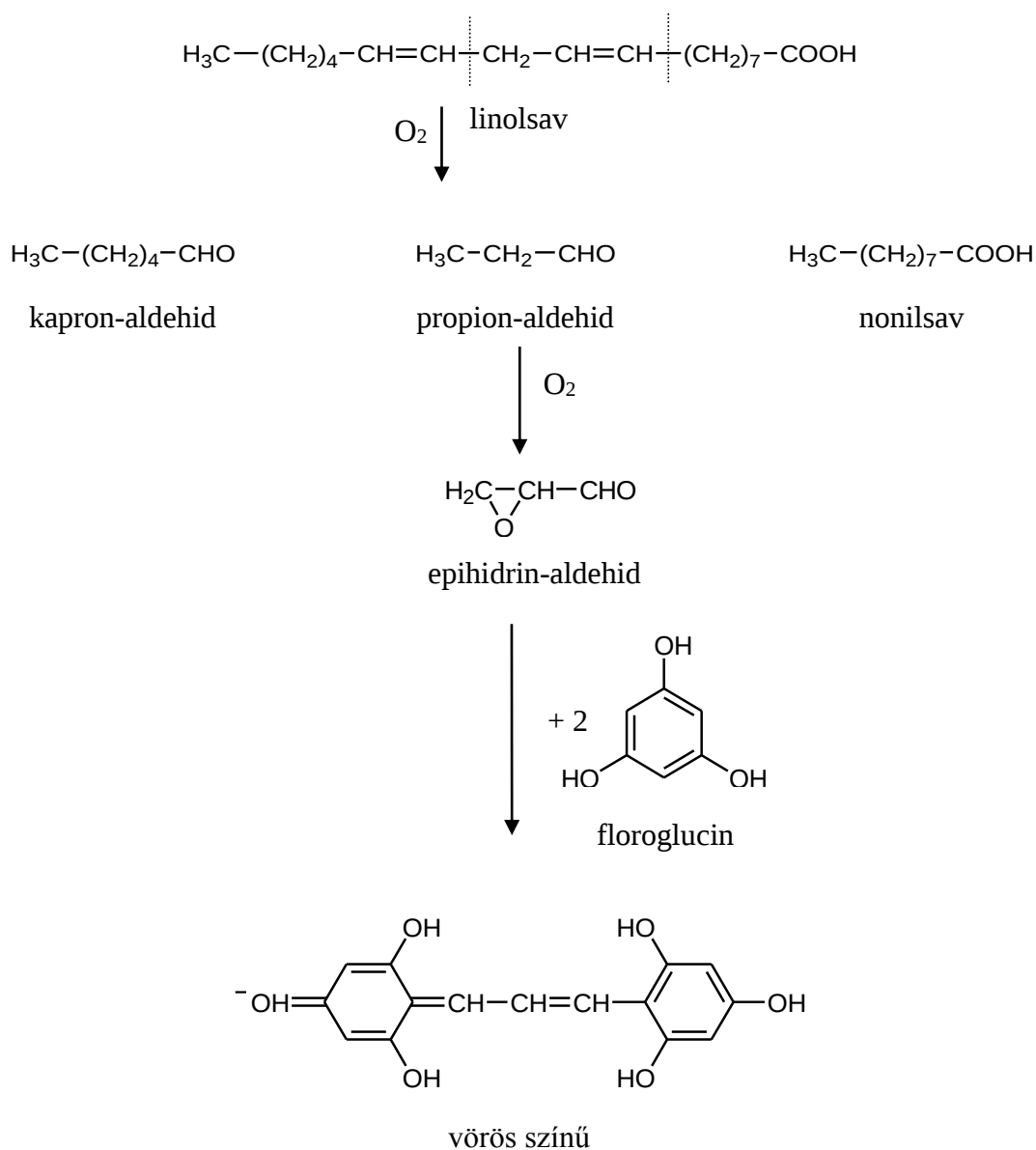
B. Szorbens:	fordított fázisú szilikagél	
Startpontok:	kloroformmal hígított napraforgóolaj	10 µl
	kloroformmal hígított lenolaj	10 µl
	kloroformmal hígított olívaolaj	10 µl
	kloroformmal hígított ricinusolaj	10 µl

Kifejlesztő elegy: diklór-metán – cc. ecetsav – acetón 20 : 40 : 50

Előhívás: Jódgőzzel telített kamrába helyezzük a lemezeket, majd kivétel után néhány perc elteltével keményítő oldattal bepermetezzük.

2. Avasság kimutatása

2 ml olajhoz 2 ml cc. HCl-t adunk („vivőgáz”). A kémcső nyílását floroglucin 0,1%-os éteres oldatával átitatott vattával zárjuk le. A kémcső tartalmát kezünkkel melegítjük.



21. ábra Az avasodás folyamata és az avasság kimutatása

3. A-vitamin kimutatás (Carr-Price-reakció):

Óraüvegre helyezett SbCl_3 kristályt 1 csepp Jecoris oleummal megcseppentünk.

Ellenőrző kérdések

- Mit tapasztalt zsíros olajok ujjenyomat-kromatográfiás vizsgálata során különféle állófázisokon?
- Milyen reakció játszódik a zsíros olajok avasodásakor?
- Avasság kimutatása zsíros olajokból.
- A-vitamin kimutatása Jecoris oleumból.

3.3. Aszkorbinsav-tartalmú drogok vizsgálata

Rosae pseudo-fructus, csipkerózsa áltermés

Rosa canina (Rosaceae)

A drog a gyepű- (vad-) rózsza, *Rosa canina*, a havasalji rózsza, *R. pendulina* és más rózsafajok megszárított, aszmagtermésektől mentes, csészelevelek maradványait viselő virágtengelye (vacokja). A szárított drog legalább 0,3% aszkorbinsavat tartalmaz.

A drog húsos, üreges, serleg alakú, csészelevelek maradványait viselő vacok darabkáiból áll, színe világos rózsaszín – narancsos rózsaszín. A vacok külső felszíne domború, fényes, ráncos. Belső oldala serteszőrökkel gazdagon fedett.

Az elporított drog narancssárga színű. Mikroszkóp alatt, R klorálhidrát-oldat alkalmazásával vizsgálva, benne nagy tömegben láthatók a vacok darabkái, amelyek narancssárga tartalommal rendelkező külső epidermisszel és vastag kutikulával borítottak. A belső epidermisz kalcium-oxalát rozettákat, alkalmanként kalcium-oxalát hasábokat tartalmazó, vékony falú sejtekből áll. Elszórtan láthatók a szőrök alapi részéhez tartozó, azonos átmérőjű, vastagodott, fásodott, gödörkés falú sejtek. Gyakori az egysejtű, max. 2 mm hosszúságú és 30-45 µm vastagságú szőrök előfordulása, amelyek erősen vastagodott falúak és csúcsi részüknél elvékonyodók. A szőrökön – az őket borító viaszszerű kutikula elrendeződése miatt – spirálisan húzódó barázda látható. A mintában nagy számban fordulnak elő narancssárga színű zsírosolajcseppek.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

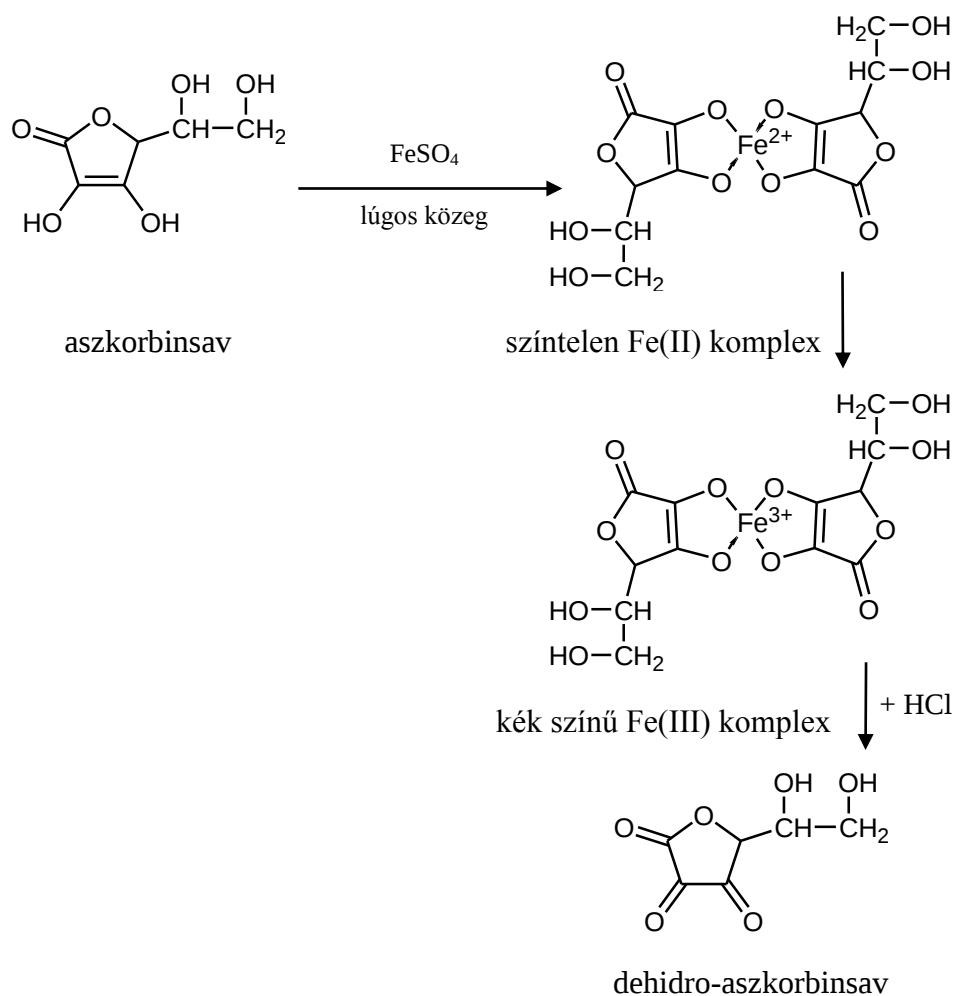
1. Rosae pseudo-fructus – aszkorbinsav kimutatása
2. Aszkorbinsav-tartalmú étrend-kiegészítő termék mennyiségi vizsgálata HPLC készülékkel

1. Rosae pseudo-fructus – aszkorbinsav kimutatása

2 g dörzsmozsárban porított droghoz 8 ml 40 °C-os vizet adunk, fél óráig állni hagyjuk, időnként rázogattjuk, majd vattán szűrjük.

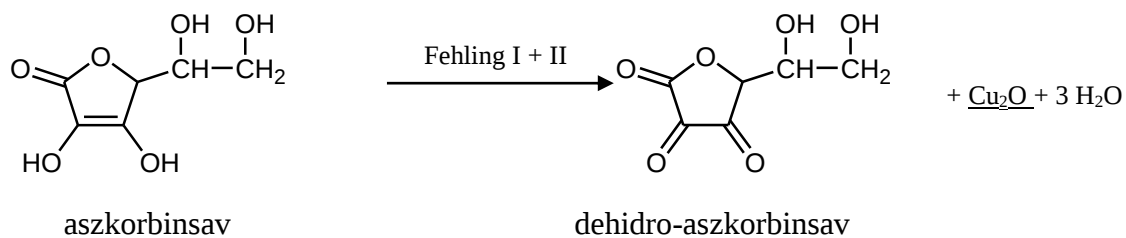
- A szűrlet 2 ml-éhez 0,1 g NaHCO₃ és 0,2 g FeSO₄ adunk.

Következő lépésben az oldathoz tömény sósavat cseppentünk. (29. ábra).



29. ábra Aszkorbinsav kimutatása

- A szűrlet 2 ml-éhez 1 ml Fehling I és 1 ml Fehling II oldatot adunk. Az oldatot vízfürdőben melegítjük.



30. ábra aszkorbinsav kimutatása Fehling I és II oldattal

2. Aszkorbinsav-tartalmú étrend-kiegészítő termék mennyiségi vizsgálata HPLC készülékkel

A gyakorlat célja egy acerolát, csipkebogyó átermést és C-vitamint tartalmazó (névleges aszkorbinsav-tartalom 500 mg) étrend-kiegészítő tabletta C-vitamin tartalmának meghatározása HPLC-vel. Két hallgató a kalibrációs egyenes meghatározását végzi, a csoport többi tagja mennyiségi mérést végez a kiadott mintából.

A HPLC berendezés precíziós, kényes és drága készülék, ezért használata során nagy körültekintéssel járjunk el. Ha bizonytalan valamiben, kérjen tanácsot a gyakorlatvezetőtől!

1. A HPLC készülék üzembeállítása

Készítsük elő az eluent (H₂O – MeOH 99:1 + 0,02% (V/V TFA), és ultrahangos fürdőben gáztalanítsuk. Ellenőrizzük, hogy az eluens tartályában a méréshez elegendő (legalább 500 ml) folyadék van, és az edényt a pumpával összekötő cső leér az edény aljára. A vizsgált mintákat és az eluent 0,45 µm pórusátmérőjű membránszűrővel meg kell szűrni.

Kapcsoljuk be a pumpát, a detektort és a számítógépet a hálózati főkapcsolókkal. Miután a detektor lefuttatta a diagnosztikai programot, a műszer mérésre kész állapotba kerül. Indítsuk el a számítógépes programot a „Wufeng HPLC” parancsikonra kattintva.

Ellenőrizzük, hogy a megfelelő mérési paraméterek vannak beállítva, ez esetben:

- 0,5 ml/min áramlási sebesség
- 260 nm mérési hullámhossz
- 4 perc detektálási idő.

Az eluens áramlásának elindítása után a készüléket az erre szolgáló fecskendővel légtelenítjük, majd néhány perces ekvibrációt követően (ez alatt a nyomás és az alapvonal állandóvá válik) elkezdődhet a mérés.

2. Kalibráló törzsoldat és oldatsorozat készítése

Aszkorbinsav pontos bemérésével ismert koncentrációjú törzsoldatot készítünk a következő módon:

25-30 mg aszkorbinsavat bemérünk egy 100 ml-es mérőlombikba, majd ezt 10% (m/V)-os citromsavoldatban oldjuk és jelre töltjük. A törzsoldat hígításával készítsünk egy kalibráló oldatsorozatot három darab 5 ml-es és 1 db 10 ml-es mérőlombikba. Az oldatsorozat elkészítésekor 1, 2, valamint 3 ml törzsoldatot mérünk be pipettával az 5 ml-es lombikokba, valamint 1 ml törzsoldatot a 10 ml-es mérőlombikba és jelre töltjük azokat a kiadott 10% (m/V)-os citromsav-oldattal. A jelre állításhoz a mellékelt Pasteur pipettát használjuk. A lombikok tartalmát a jelre állítás után alaposan össze kell rázni.

Rögzítendő adat: bemért aszkorbinsav tömege (mg)

3. Minta-előkészítés

Megmérjük 1 darab rágótabletta pontos tömegét, majd dörzsmozsárban elporítjuk. Az elporított minta 0,2 g-ját 20 ml 10% (m/V) citromsavoldattal ultrahangos fürdőben 5 perc alatt 25 ml-es mérőlombikban extraháljuk, majd 10% (m/V) citromsav-oldattal jelre állítjuk. Ebből kivéve 2 ml-t 25 ml-re hígítjuk a 10% (m/V) citromsav-oldattal mérőlombikban. A hígított mintából 2 ml-t fecskendőszűrőn (0,45 μ m pórusátmérőjű szűrő) leszűrünk.

Rögzítendő adat: rágótabletta tömege (mg)

Rögzítendő adat: bemért minta tömege (mg)

Rögzítendő adat: a kivonás kezdetének időpontja

4. Kalibrálóoldatok és minták HPLC analízise

A kromatográf és a számítógépes adatgyűjtő program beállítása után először a legkisebb koncentrációjú kalibráló oldatot fecskendezzük be az adagolószelepbe. A mintát 250 μ l-es fecskendővel juttatjuk be az adagoló szelepbe. A kalibráló oldatok között nincs szükség vízzel való öblítésre csupán a következő kalibráló oldattal kell átöblíteni. A fecskendőt 3-szor átöblítjük a mérendő oldattal oly módon, hogy a felszívott oldatot a szennyes gyűjtőbe engedjük ki. Levegőbuborék semmiképpen sem lehet a fecskendőben, ezért a mintaoldatot lassan szívjuk fel. Nagyon ügyeljünk arra, hogy a semmilyen esetben sem kerülhet levegő a HPLC készülékbe, mivel ez a mérést és a műszert is tönkreteszi.

A „Load” állásában lévő adagolószelep nyílásába injektáljuk a minta 100 µl-ét. Mivel a befecskendezett minta a mintahurok térfogatának (20 µl) többszöröse, a teljes fecskendőtartalom beadagolása nemcsak megtölti, hanem át is öblíti a mintahurkot. A HPLC oszlopra kerülő minta térfogata **20 µl**.

Határozott mozdulattal fordítsuk át az adagolószelep karját „Inject” állásba. Ezzel a minta az oszlopra kerül, és a mérés automatikusan elindul. A kromatogram felvétele után az adagolószelepet forgassuk ismét ütközésig a „Load” állásba. A C-vitamin csúcs retenciós idejét és csúcs alatti területet (AUC, area under curve) leolvassuk a kromatogramról.

4.1. Kalibrációs egyenes felvétele

A kalibrációs egyenes felvételéhez az előkészített oldatsorozatba tartozó 4, eltérő koncentrációjú oldat mindegyikéből 2-2 párhuzamos mérést végezzünk a fent leírt eljárás szerint.

Rögzítendő adatok:

	1. kalibráló oldat	2. kalibráló oldat	3. kalibráló oldat	4. kalibráló oldat
Injektált aszkorbinsav mennyisége (µg)				
AUC 1				
AUC 2				
AUC átlag				
AUC szórás				

4.2. Minták mennyiségi analízise

A C-vitamin-tartalmú étrend-kiegészítő minták esetén is 2 párhuzamos mérést végezzünk. Az aszkorbinsav azonosítása a mintában a kalibráló oldatban megjelenő aszkorbinsav retenciós idejével való R_t-egyezés alapján lehetséges.

Rögzítendő adat: a mérés kezdetének időpontja

Rögzítendő adat:

mintában mért C-vitamin	
AUC 1	
AUC 2	
AUC átlag	
AUC szórás	

4.3. Az eredmény kiszámítása

A mérés eredményeként a csúcs alatti területek átlaga alapján megállapítható az ismeretlen tabletta C-vitamintartalma aszkorbinsavra vonatkoztatva. A mennyiségi analízishez MS Office Excel segítségével a kalibrációs pontokra egyenest kell illeszteni ($y = ax+b$), majd meg kell határozni annak egyenletét, és a korrelációs együtthatót (R^2). A kalibrációs egyenes egyenletébe a mintában kimutatott aszkorbinsav AUC értékét (y) helyettesítve meghatározzuk a minta 20 μ l-ében lévő aszkorbinsav mennyiségét (x), amely alapján kalkulálható az egy rágótablettában lévő aszkorbinsav mennyisége (mg).

Meghatározandó:

egyenest egyenlete	
R^2 értéke	
egy tabletta aszkorbinsav-tartalma (mg)	

Ellenőrző kérdések

- Milyen reakciókkal mutatjuk ki a C-vitamint a Rosae pseudo-fructusból?
- Aszkorbinsav kimutatása miből, hogyan történt?
- Hogyan történhet étrend-kiegészítő termékek aszkorbinsav tartalmának meghatározása?

3.4. Alkaloidtartalmú drogok vizsgálata

Általános alkaloid reakciók

Mivel az alkaloidok számos anyaggal, köztük csersavval, jóddal, fémkomplexekkel csapadékot adnak, ez a tulajdonságuk kvalitatív kimutatásukra felhasználható.

Alkaloidtartalmú drogot megfelelő mennyiségű, néhány csepp sósavval vagy kénsavval megsavanyított vízzel enyhe melegítéssel kivonunk. A lehűtött, és szűrőpapíron szűrt kivonatot három részre osztjuk és a következő csapadékképző reagensekkel reagáltatjuk.

Reagensek:

- Mayer-reagens (kálium-higany(II)-tetrajodid vizes oldata)
- Dragendorff-reagens (kálium-bizmut(III)-tetrajodid ecetsavas oldata)
- Wagner-reagens (jódos káliumjodid oldat)

Ugyanezt a vizsgálatot elvégezzük 2-3 ml kinin-hidroklorid oldattal is.

Alkaloidtartalmú drogok általános extrakciós eljárása

Az alkaloidok növényekből történő kinyerése, valamint az alkaloidtartalmú kivonatok további tisztítása bázikus tulajdonságukon alapul, mivel bázisként szerves oldószerben, sóként vízben oldódnak jól. A kinyerési, tisztítási eljárást fáziscserének nevezzük. Kétféle módon kezdhető el az alkaloidok növényekből történő izolálása. Az alkaloidok gyenge bázisok. A növényekben gyenge savakkal képzett só formájában fordulnak elő, ezért legelőször erősebb savval vagy erősebb bázissal el kell bontani a növényben lévő alkaloid-sókat.

- 1, Híg savat (1-3%-os sósavat vagy kénsavat) adunk a drogorhoz és azzal kivonjuk. Ilyenkor az erős sav kiszorítja sójából a gyenge savat, az alkaloid az erős savval képez sót, amely vízben jól oldódik. Természetesen az alkaloidsók mellett más vízzoldékony anyagok is jelen lesznek a kivonatban. Tisztítás céljából az alkaloidtartalmú savas-vizes kivonatot meg kell lúgosítani. Az alkaloid bázissá alakul és szerves oldószerrel kirázható a vizes fázisból. Így az alkaloid bázis tisztított formában, szerves oldószeres oldatban áll rendelkezésre a további vizsgálathoz.
- 2, A drogot erős bázissal (NH_3 vagy NaOH) átnedvesítjük, amelynek hatására az alkaloidsóból az erős bázis kiszorítja az alkaloidot. A felszabadult alkaloidbázis szerves oldószerrel a drogból kivonható. Természetesen sok más anyagot is kivontunk a szerves oldószerrel is a drogból, amely szennyezi az alkaloidbázis oldatát. Ezért a szerves kivonatot összerázzuk egy

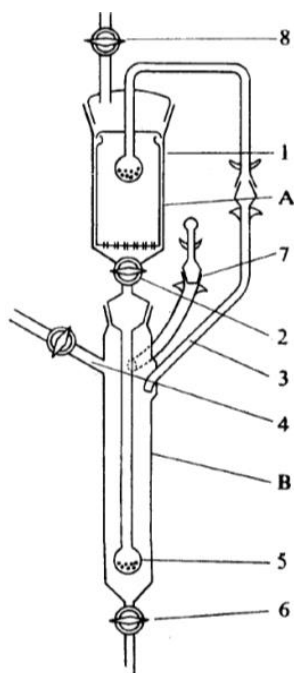
erős sav (kénsav, sósav stb.) vizes oldatával. Ilyenkor az alkaloid a savval sót alkotva vízben jól oldhatóvá válik, így átmegy a vizes-savas kirázás során az alkaloid a vizes fázisba.

Az alkaloidtartalmú drogok hatóanyagainak mennyiségi meghatározása során többnyire az összalkaloid-tartalmat mérjük. Némely esetben viszont valamely jellemző alkaloidkomponens mennyiségét kell meghatározni. A drog előkészítéséhez és az alkaloidok kivonásához a következő eljárást használjuk.

A drog előkészítése: A vizsgálatához szükséges drog teljes mennyiségét megfelelő finomságúra őröljük, szitáljuk és gondosan homogenizáljuk.

Az alkaloidok kivonása:

A porított drog pontosan mért mennyiségét dörzsmozsárban 0,5–1,0 ml tömény ammónia-oldattal átgyúrjuk, majd maradéktalanul a készülék kivonóhüvelyébe (1) helyezett üveggyapotra szórjuk (31. ábra).



31. ábra Alkaloid kivonó készülék

A dörzsmozsarat és a pisztilyust az előírt kivonószerrel (benzol) a készülékbe öblítjük. A szilárd-folyadék (A) és a folyadék-folyadék kivonó rész (B) között levő csapot (2) kinyitjuk, és a folyadék-folyadék kivonó hengertestbe (B) az adagolócsonkon keresztül (7) 10,0 ml 0,2 M kénsavat öntünk. A szilárd kivonó hengertestbe a drogra annyi benzolt öntünk, hogy az alsó

részben (B) a benzol elérje a cirkulálócsövet (3), és az említett csap (2) elzárása után a drog fölött 3-4 cm-es benzolréteg legyen. Ezután a nyomócsonkon (4) keresztül létesített folyamatos, gyenge túlnyomás vagy a felső légtelenítő csapon (8) át gyenge szívás révén megindítjuk a benzol körbeáramoltatását.

A kénsav fölött levő benzol a cirkulálócsövön át a drogra permetez, azon áthatol, a perforált gömbön (5) át kénsavas rétegbe jut, abban felemelkedik, annak felszínén összegyűlik, majd a cirkulálócsövön át újra a drogra permetez. Ezáltal kialakul a benzolos fázis körforgása. A drogból a benzollal kivont alkaloidok a benzolos fázisnak a kénsav-oldaton való áthatolása során a vizes kénsavas fázisba oldódnak át. Ezt a körfolyamatos kivonást egy órán át végezzük. Ezután a nyomást, illetve a szívást megszüntetjük, a folyadék mozgást leállítjuk, majd a két rész közötti csapot (2) elzárjuk.

A folyadék-folyadék kivonórész alján levő csap (6) nyitásával a savas fázist 50 ml-es mérőlombikba bocsátjuk, a készülékbe az adagolócsonkon (7) át újabb 10 ml 0,2 M kénsavat öntünk, és a kivonást még kétszer egy-egy órán át, majd egyszer két órán át megismételjük. Az egyes kivonások után összegyűjtött, összesen 40 ml savas oldatot a mérőlombikban 0,2 M kénsavval 50,00 ml-re egészítjük ki.

A mérőlombikban levő savas-vizes alkaloid-oldat 20,00 ml-es részletét tömény ammónia-oldattal meglúgosítjuk ($\text{pH} = 8-9$), és kétszer 20-20 ml, majd még két ízben 10-10 ml kloroformmal kirázzuk. Az egyes kloroformos oldatrészeket kb. 2 g vízmentes nátrium-szulfáttal fedett zsírtalanított vattapamaton szűrjük. Az így összegyűjtött kloroformos oldatból a kloroformot mintegy 5,0 ml térfogatig bedesztilláljuk. Ezt az oldatot használjuk az egyes drogok esetén leírt alkaloidtartalom meghatározásokhoz.

Ellenőrző kérdések

- Mi a fáziscsere? Hogyan és mire használjuk?
- Hogyan nyerhetők ki az alkaloidok bázisként a drogból?
- Hogyan nyerhetők ki az alkaloidok sóként egy drogból?
- Milyen, az alkaloidok kimutatására alkalmas csapadékképző reagenseket ismer?
- Ismertesse az alkaloidkivonó készülék működésének elvét!

Ornitinből keletkező alkaloidokat tartalmazó drogok

Hyoscyami folium, beléndeklevél

Hyoscyamus niger (Solanaceae)

A drog a beléndek, *Hyoscyamus niger* hazánkban megtalálható, kétéves, ritkán egyéves növény virágzás kezdetén gyűjtött, megszárított levele. A drog legalább 0,05% atropinbázisban kifejezett alkaloidot tartalmaz.

A levelek hosszúkás tojásdadok, szárnyasan öblösen karéjosan fogazottak. A kevés számú karéjok, illetve fogak hegyes csúcsúak, tompán zöld színűek, különösen a szélükön, a fonák kiálló erezetén és a nyélen bozontos, puha szőrűek, válluk szív alakú. Frissen bódító szagúak. A tölevelek 20–30 cm hosszúak, 10–12 cm szélesek, szíves vállúak, nyelesek, a szárlevelek közül az alsóbbak rövid szárnyas nyélbe keskenyedők, a felső szárlevelek ülők, félig szárölelők. A drog jellemző szagú, íze kesernyés, csípős, kissé sós.

A levél dorziventrális szerkezetű. A felszín és a fonák epidermiszében többé-kevésbé izodiametrikus, vékony kutikulájú sejtjei közül a sztómák kissé kiemelkednek és a fonákon sűrűbben helyezkednek el. A felszínepidermisz alatt egyrétegű, gyakran a mezofillum közepéig lenyúló, keskeny, hosszú sejtű paliszádparenchimát látunk. Alatta egysoros, kalcium-oxalát kristályokat tartalmazó ún. gyűjtősejtekből álló réteg következik, amely 2-3 sejt soros szivacsos parenchimába megy át. A kristályok leggyakrabban oszlop alakú egyes kristályok, de látunk átnőtt és ikerkristályokat, sőt ritkán buzogányfej alakú kristályokat is. Az epidermisz alatt 1-3 sejtsorú, kismértékben vastagodott, intercellulárisos kollencima helyezkedik el. Az ívesen alakult szállítószövetet fiatalabb korban keményítővel telt nyalábhüvely veszi körül. A szállítónyalábok bikollaterálisak.

A drog pora zöld, ill. szürkészöld színű. Benne igen gyakoriak az egyes kalcium-oxalát kristályok, a fonák- és felszínepidermisz-részletek sztómákkal, valamint a mezofillumnak paliszádparenchima- és kalcium-oxalát kristályokat tartalmazó szivacsos parenchimatöredékei.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Tropánvázak alkaloidokat tartalmazó drogok (*Belladonnae folium*, *Belladonnae radix*, *Hyoscyami folium*, *Stramonii folium*) rétegekromatográfiás vizsgálata
2. Vitali-reakció
3. Szkopoletinkimutatás

1. Tropánvázak alkaloidokat tartalmazó drogok (*Belladonnae folium*, *Belladonnae radix*, *Hyoscyami folium*, *Stramonii folium*) rétegekromatográfiás vizsgálata

Kivonat készítése: 1 g drogból 15 ml 0,5%-os kénsavval 10 perces vízfürdőn történő melegítéssel kivonatot készítünk, majd hűtés után vattán választótölcsérbe szűrjük. A szűrlet pH-ját tömény ammóniával lúgosra (8-9) állítjuk. Ezután 2×10 ml kloroformmal kirázzuk. A szerves fázisokat egyesítjük, és vízmentes nátrium-szulfáttal vízmentesítjük. Porcelántálban vízfürdőn bepároljuk és a száraz maradékot 0,5 ml metanolban oldjuk.

Réteg: szilikagél

Felvitel:	1. <i>Belladonnae folium</i> kivonata	20 µl
	2. <i>Belladonnae radix</i> kivonata	20 µl
	3. <i>Stramonii folium</i> kivonata	20 µl
	4. <i>Hyoscyami folium</i> kivonata	20 µl
	5. atropin teszt 0,1%	10 µl
	6. szkopolamin teszt 0,1%	10 µl
	7. szkopoletin teszt 0,1%	10 µl

Kifejlesztő elegy: aceton – víz – tömény ammónia 90 : 7 : 2

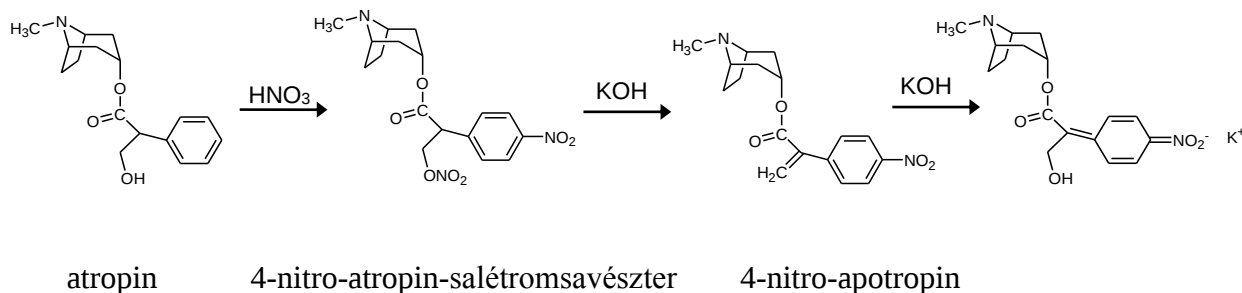
Detektálás:

1. UV fény (366 nm)
2. Dragendorff reagens

2. Vitali-reakció (tropánvázak alkaloidok kimutatása)

Kivonat készítés: 1 g drogot 10 ml 0,05 M kénsavval 2 percig rázogatunk, majd papíron megsűrjük. A szüredékhez 1 ml R tömény ammóniaoldatot és 5 ml vizet adunk, 15 ml éterrel összerázzuk, ügyelve arra, hogy az emulzióképződést elkerüljük. Az éteres fázist vízmentes nátrium-szulfáttal megszáritjuk, majd megsűrjük, és porcelántálban bepároljuk.

A beszáradt maradékot 0,5 ml tömény salétromsav hozzáadása után vízfürdőn szárazra pároljuk. A maradékhoz 10 ml acetont és R kálium-hidroxid alkohollal készült oldatából (30 g/l) néhány cseppet adunk (32. ábra).



32. ábra Tropánvázás alkaloidok kimutatása Vitáli-reakcióval

3. Szkopoletinkimutatás: 0,2 g drogporból 10 ml vízzel 2 percen át rázogatva kivonatot készítünk, majd a vizes kivonathoz 10 csepp R ólomacetát oldatot adunk, szűrjük és a szűrletet azonos térfogatú kloroformmal kirázzuk. A szerves fázist 2-3 ml néhány csepp ammóniával lúgosított vízzel osszerázzuk. Az elkülönülő lúgos-vizes fázist UV fényben vizsgáljuk.

Ellenőrző kérdések

- Milyen kristályok (fajta, alak) találhatók a három vizsgált drogban (maszlagos nadragulyalevél, csattanó maszlag levél, beléndeklevél)?
- Melyek a három drog főbb alkaloidkomponensei?
- Mely vegyület kimutatására alkalmas a Vitáli-reakció és hogyan végezzük?
- Milyen típusú vegyület a szkopoletin?
- Hogyan mutatható ki a szkopoletin a három drogból?

Fenilalanin eredetű alkaloidokat tartalmazó drogok

Opium crudum, nyers ópium

Papaver somniferum (Papaveraceae)

A nyers ópium a termesztett (kerti) mák – *Papaver somniferum* levegőn megszárított tejnedve, amely az éretlen toktermés bemetszésével nyerhető ki. Legalább 10,0% morfint és legalább 2,0% kodeint tartalmaz, 100–105 °C-on szárított drogra vonatkoztatva.

A nyers ópium jellegzetes szagú, feketésbarna színű. Különböző méretű darabok alkotják, amelyek lágyak, fényesek, és szárítás után keménnyé, rideggé válnak.

A nyers ópium R kálium-hidroxid 20 g/l-es oldatával készített szuszpenzióját mikroszkóp alatt vizsgáljuk. Benne szabálytalan alakú halmazokká összeállt tejnedvszemcsék és világosbarna, hosszúkás fonalak figyelhetők meg. Szállítónyalábok töredékei és megnyúlt, fénytörő kristályok láthatók, továbbá kisebb számban kerek virágporszemek és hosszúkás rostok részletei. A drog – a tejnedv feldolgozása során belekerült – hegyes csúccsal rendelkező, változatos hosszúságú szőröket és néhány keményítőszemcsét tartalmazhat. Az epi(exo)karpium töredékei is jelen lehetnek, amelyek sokszögletű, csillag alakú üreggel rendelkező, vastag falú sejtekből állnak.

Chelidonii herba, vérehulló fecskefű virágos hajtás

Chelidonium majus (Papaveraceae)

A drog a vérehulló fecskefű – *Chelidonium majus* virágzó állapotban gyűjtött, egész vagy aprított, szárított föld feletti hajtása. Chelidoninban kifejezett összes alkaloid-tartalma legalább 0,6% (szárított drogra).

A hengeres, bordázott, 3–7 mm átmérőjű, és kissé szőrös szár üreges, de általában összenyomódott, sárgás-zöldes-barna színű. A levelek vékony lemezűek, szabálytalanul szárnyasak, a levélszeletek alakja tojásdadtól hosszúkás-szögletesig változhat, a szélük durván fogazott, a végálló levélszelet gyakran háromkaréjú; a levelek színi oldala kékeszöld és csupasz, a fonáki felszín halványabb és bolyhosan szőrös, különösen az erek felett. A virágtakaró két mélyen kiöblösödő, könnyen lehulló csészelevélből, és négy sárga, széles-tojásdad, 8–10 mm hosszú szíromlevélből épül fel; a porzók sárgák és számosak, a felső állású magházról rövid bibeszál ered; ritkán előfordulnak hosszú, éretlen toktermések is.

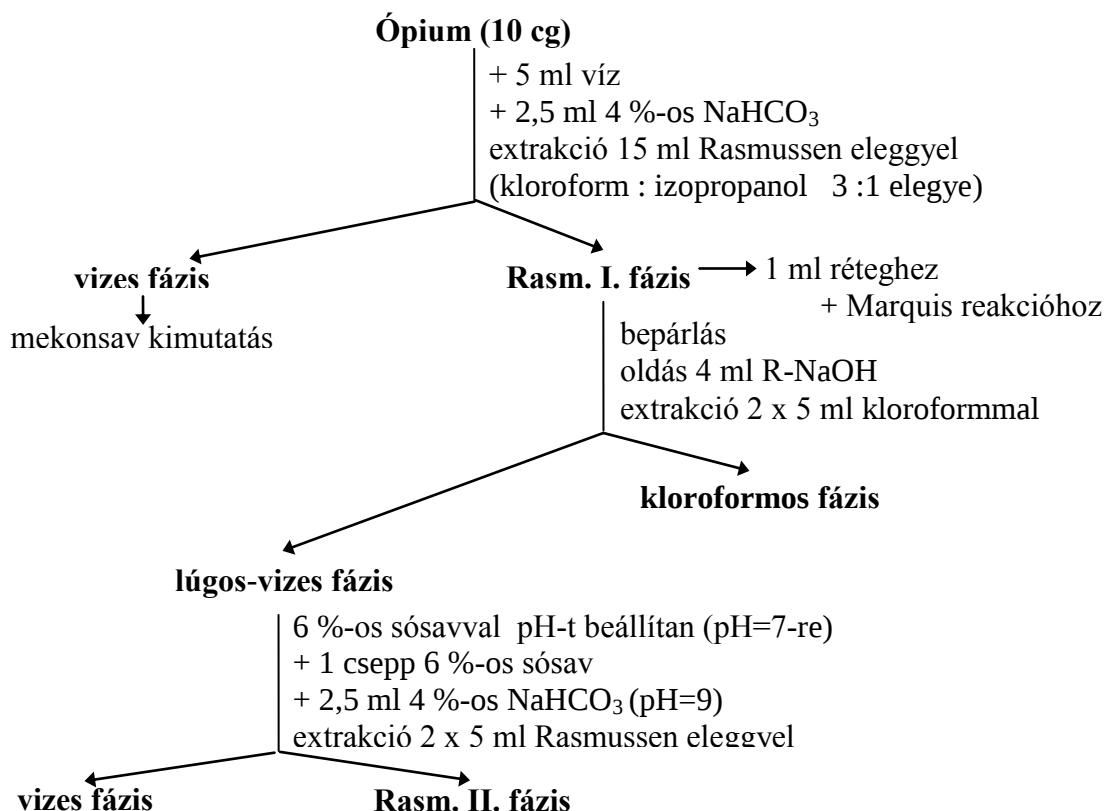
A porított drog sötét szürkészöld-barnászöld színű, benne mikroszkóp alatt számos levéltöredék észlelhető, felülnézetben hullámos falú bőrszöveti sejtekkel; anomocitikus sztómaapparátusokat csak a fonáki epidermisz tartalmaz; láthatók még hosszú, egysoros, gyakran darabokra töredezett fedőszőrök is. A levélből vagy a szárból származó szállítószövet rostok, illetve a gödörkés és spirális sejtfalvastagodású edények csoportosan jelennek meg. Ezekhez szorosan kapcsolódnak a sárgásbarna anyagot tartalmazó tejcsövek. Ritkán a szíromlevelek töredékei is jelen lehetnek, vékony falú és részben papillás felszínű sejtekkel, melyek halványsárga olajcseppeket tartalmaznak. A pollenszemek gömb alakúak, átmérőjük 30–40 µm, három csírákapu jellemzi és az exine finoman gödörkés.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Opium crudum vizsgálata
 - 1.1. Morfin elválasztása a társalkaloidoktól, rétegekromatográfiás ellenőrzés
 - 1.2. Marquis-reakció
 - 1.3. Mekonsav-kimutatás
2. Ipecacuanhae radix azonossági reakciói: emetin-, cefelin-kimutatás (rubremitin reakció, Frohde-reakció)
3. Chelidonii herba és a drog kivonatát tartalmazó készítmény rétegekromatográfiás vizsgálata

1.1 Morfin elválasztása a társalkaloidoktól

0,10 g ópiumot 5 ml vízzel eldörzsölünk, szűrjük, majd 2,5 ml 4%-os NaHCO₃ oldatot adunk hozzá. 15 ml Rasmussen eleggyel (kloroform–izopropanol 3:1) kirázzuk (33. ábra). Rétegekromatográfiához (Rasmussen I.) és a Marquis-reakcióhoz 1 ml-t félreteszünk. A vizes fázisból elvégezzük a mekonsav-kimutatást. A kb. 14 ml Rasmussen I. fázist vízfürdőn porcelántálban betöményítjük, a száraz kivonatot 4 ml R NaOH oldatban oldjuk. A lúgos oldatot 2 × 5 ml kloroformmal kirázzuk (Kloroformos fázis rétegekromatográfiához). A vizes fázis kémhatását előbb kb. 1 ml 6%-os sósavval pH 7-re állítjuk, majd további 1 csepp R sósavat adunk hozzá. Ezt követően kb. 2,5 ml 4%-os NaHCO₃ oldattal a pH-t 9-re állítjuk, majd 2 × 5 ml Rasmussen-eleggyel kirázzuk (Rasmussen II. rétegekromatográfiához).



26. ábra Morfin és a társalkaloidok elválasztásának menete

Rétegekromatográfiás ellenőrzés

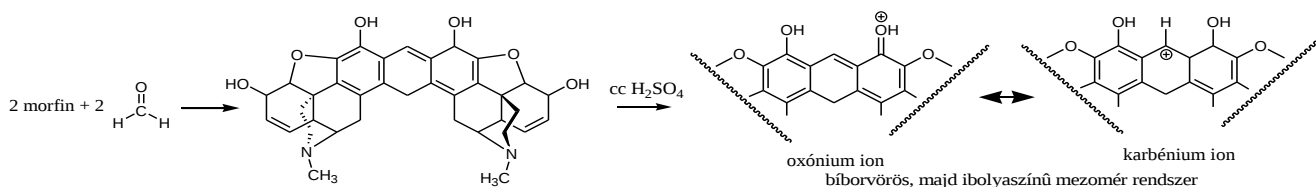
Réteg:	szilikagél lemez	
Felvitel:	1. Rasmussen I. fázis	60 µl
	2. 0,1% papaverin teszt + 0,1% morfin teszt	10–10 µl
	3. kloroformos fázis	60 µl
	4. 0,1% tebain teszt + 0,1% kodein teszt	20–20 µl
	5. Rasmussen II. fázis	60 µl

Kifejlesztő elegy: EtOAc – MeOH – cc. NH₃ 85 : 10 : 5

Előhívás: Dragendorff-reagens

1.2 Mekonsav-kimutatás: 0,10 g ópiumot 5 ml vízzel eldörzsölünk, szűrjük, majd 2,5 ml 4%-os NaHCO₃ oldatot adunk hozzá. 15 ml Rasmussen-eleggyel (kloroform–izopropanol 3:1) kirázzuk. A vizes fázist R kénsavval megsavanyítjuk, majd 2-3 csepp FeCl₃-ot adunk hozzá.

1.3 Morfinkimutatás (Marquis-reakció): 0,10 g ópiumot 5 ml vízzel eldörzsölünk, szűrjük, majd 2,5 ml 4%-os NaHCO₃ oldatot adunk hozzá. 15 ml Rasmussen-eleggyel (kloroform–izopropanol 3:1) kirázzuk. A Rasmussenes fázist betöményítése után a beszáradt maradékot 1-2 csepp frissen készített Marquis-reagenssel (1 ml tömény kénsav + 1 csepp tömény formaldehid) megcseppentjük.

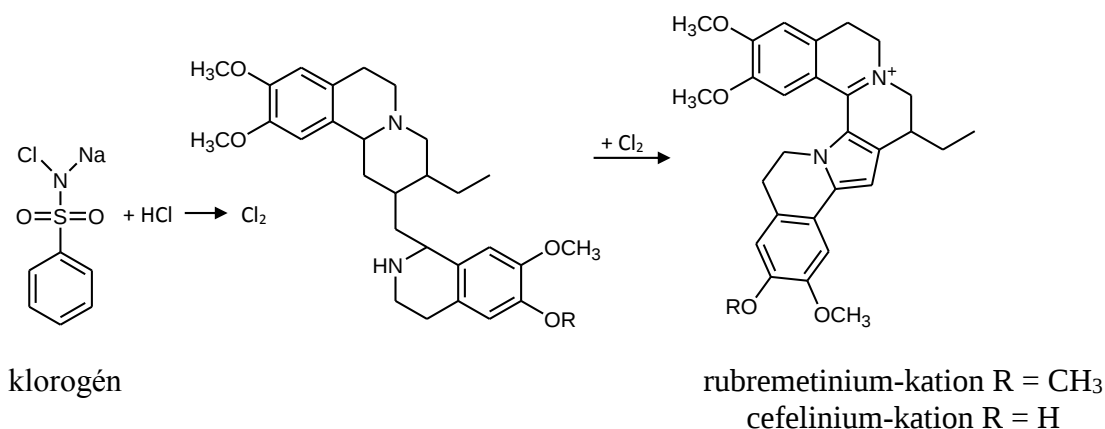


34. ábra Morfin kimutatása Marquis-reakcióval

2. Ipecacuanhae radix azonosságai reakciói: emetin-, cefelin-kimutatás

Kivonat készítés: 0,5 g drogport 10 csepp R ammónia oldattal átnedvesítünk, majd 10 ml kloroformmal történő rázogatóssal végezzük a kivonást. A papíron szűrt kivonatot két részre osztjuk, és porcelántálban mind a két részt szárazra pároljuk.

Emetin kimutatását (rubremetin reakció): a száraz maradékhoz morzsányi klorogént és 2-3 csepp R-HCl-t adunk.



35. ábra Emetin kimutatása rubremetin reakcióval

Cefelin-kimutatás (Froehde-reakció): a másik porcelántál tartalmát Froehde-reagenssel (NH₄-molibdenát cc. H₂SO₄ oldata) megcseppentjük.

3. Chelidonii herba és a drog kivonatát tartalmazó készítmény rétegekromatográfiás vizsgálata

Kivonatkészítés 0,4 g porított drogot 50 ml 30%-os ecetsavval vízfürdőn 30 percen át forralunk úgy, hogy a lombik szájába tölcsezt teszünk, majd lehűtjük, és szűrőpapíron át szűrjük. A szüredéket tömény ammóniaoldattal erősen meglúgosítjuk, majd 30 ml kloroformmal összerázzuk. A szerves fázist vízmentes nátrium-szulfáttal vízmentesítjük, szűrőpapíron porcelántálba szűrjük, szárazra pároljuk, a maradékot 1 ml metanolban oldjuk.

Réteg: szilikagél lemez

<u>Felvitel:</u>	1. 1% metilvörös + 1% papaverin teszt	10 µl
	2. 0,1% kelidonin teszt	10 µl
	3. fecskefű kivonat	20 µl
	4. 0,1% koptizin teszt	10 µl
	5. termék minta	20 µl

Kifejlesztő elegy: 2-propanol – víz – hangyasav 90 : 9 : 1

Előhívó reagens: 1. UV 254, 366 nm
2. Dragendorff-reagens

Ellenőrző kérdések

- Hogyan választjuk el a morfint a társalkaloidoktól?
- Miért különíthető el a morfin a társalkaloidoktól?
- Hogyan mutatható ki a morfin az ópiumból?
- Hogyan végezzük a mekonsav kimutatását?
- Mely drogból és hogyan mutatjuk ki az emetint?
- Mely drogból és hogyan mutatjuk ki az cefelint?
- Milyen típusú és milyen alakú kristályokat tartalmaz az Ipecacuanhae radix?
- Milyen vegetatív állapotban gyűjtik a Chelidonii herbát?
- Melyek a vérehulló fecskefű főbb komponensei?
- Mire vonatkoztatva fejezik ki a drog alkaloidtartalmát?
- Mely vegyületeket azonosítottuk vékonyrétegekromatográfia segítségével a vérehulló fecskefű kivonatában?

Triptofán eredetű alkaloidokat tartalmazó drogok

Strychni semen, ebvészmag

Strychnos nux-vomica (Loganiaceae)

A drog a *Strychnos nux-vomica* fa vagy bokor érett, száraz magja. A mag korongalakú, 1–2,5 cm átmérőjű, 3–5 mm vastag, világosszürke, a sűrűn rásimuló szőröktől selyemfényű, selymes tapintású, szarukeményességű. A korong széle párkányszerűen vastagodott. Egyik oldalán a központban található a köldök, amelytől egy, a szőrök összehajlásából eredő vonalka halad a mag szélén lévő mikropiléig; itt a gyököcske szemölcszerűen kinyomja a maghéjat. A szürke, szaruszerű magfehérje a lap irányában két részre választható, közte található az embrió 2 sziklevele és gyököcskéje. Epidermisz sejtjei kb. 1 mm hosszú, tompavégű, egysejtű szőrökké alakultak át.

Jellemző szagú, erősen keserű ízű. Pora sárgásszürke, jellezetes szőrtöredékeket és endospermium töredékeket tartalmaz.

Secale cornutum, anyarozs, varjúkőröm

Claviceps purpurea (Clavicipitaceae)

A drogot a *Claviceps purpurea* gomba áttelelő alakja, szklerociuma szolgáltatja. A drog 1–5 cm hosszú, 2–5 mm átmérőjű két végén elvékonyodó, orsó alakú, egyenes, vagy kissé meggörbült képlet, amely ritkán hengeres és sima felületű, gyakran tompán háromszög alakú és hosszan barázdás felületű. Frissen húsos, száraz szaruszerű, fekete vagy ibolyásfekete, kissé fénylő. Törési felülete szélén ibolyaszerű, közepén fehéres, törése egyenes. A gomba vegetatív testét gombafonalak (hifa) alkotják, amelyek összessége kusza szövedékhez hasonló micéliumot képez.

Pora kékesszürke és a hifafonalak, valamint a kéreg sötét töredékeit tartalmazza. Pora R nátrium-hidroxiddal eldörzsölve bomlott fehérjére (trimetilamin) emlékeztető szagot áraszt.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Strychni semen

1.1. Az alkaloidok rétegekromatográfiás vizsgálata

1.2. Sztrichnin, brucin és loganin kimutatása

2. Chinchonae cortex

2.1. Alkaloidtartalom kvantitatív meghatározása fotometriás módszerrel

2.2. Thalleiochin-reakció, Grahe-próba

3. Secale cornutum

3.1. Vízoldékony és peptidalkaloidok elválasztása, rétegekromatográfiás ellenőrzés

3.2. van Urk-reakció, szklereritrin kimutatása

1.1. Strychni semen alkaloidjainak rétegekromatográfiás vizsgálata

Kivonat készítés: 0,3 g drogport 20 ml vízzel 10 percig forralunk. Hűtés után vattán át rázóüvegszerűbe szűrjük. Kirázzuk 2×5 ml kloroformmal. Víztenítés után a szerves fázisból 2 ml-t rétegekromatográfiás vizsgálathoz kiveszünk, a maradék kivonatot kémiai reakció céljára használjuk oly módon, hogy két porcelántálba elosztva bepároljuk.

Réteg: szilikagél lemez

Kivonat: Strychni semenből készült kivonat 2 ml-es részletét betöményítjük, majd a száraz kivonatot 0,5 ml metanolban oldjuk.

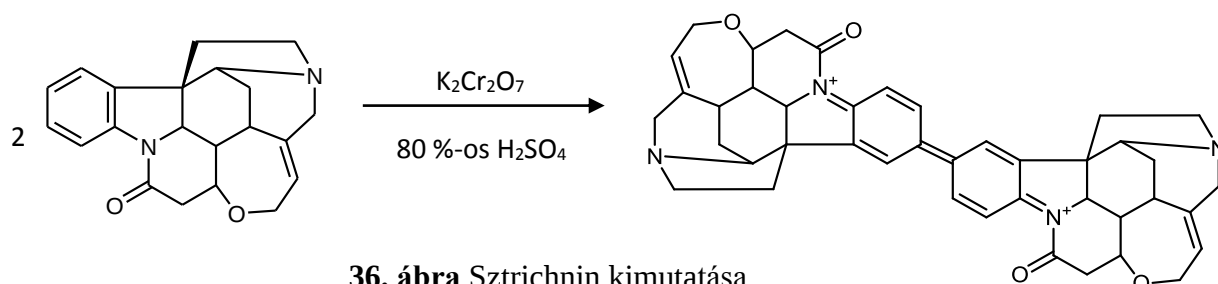
Felvitel:	1. ebvésmag kivonat	60 μ l
	2. 0,1% sztrichnin teszt	20 μ l
	3. 0,1% brucin teszt	20 μ l

Kifejlesztő elegy: MeOH – cc NH₃ 95 : 5

Előhívás: Dragendorff-reagens

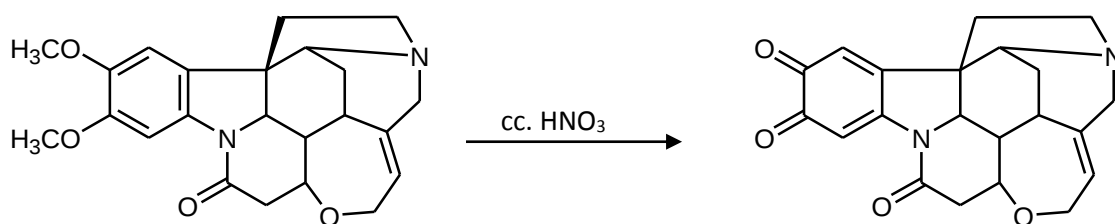
1.2. Strychni semen: sztrichnin, brucin és loganin kimutatása

Sztrichnin kimutatás: a rétegekromatográfiás vizsgálatnál leírt módon készült egyik száraz kivonathoz kevés K₂Cr₂O₇ kristályt és néhány csepp 80%-os kénsavat adunk.



36. ábra Sztrichnin kimutatása

Brucinkimutatás: a rétegekromatográfiás vizsgálatnál leírt módon készült másik beszárított kivonatot cc. salétromsavval megcseppentjük.



37. ábra Brucin kimutatása

Loganin-kimutatás: a kloroformos kirázás után megmaradt vizes szűrletből 1-2 ml-t savanyítást (1-2 csepp R H₂SO₄) követően szárazra párolunk.

A bepárolt maradékhoz vizet adunk, majd újra bepároljuk.

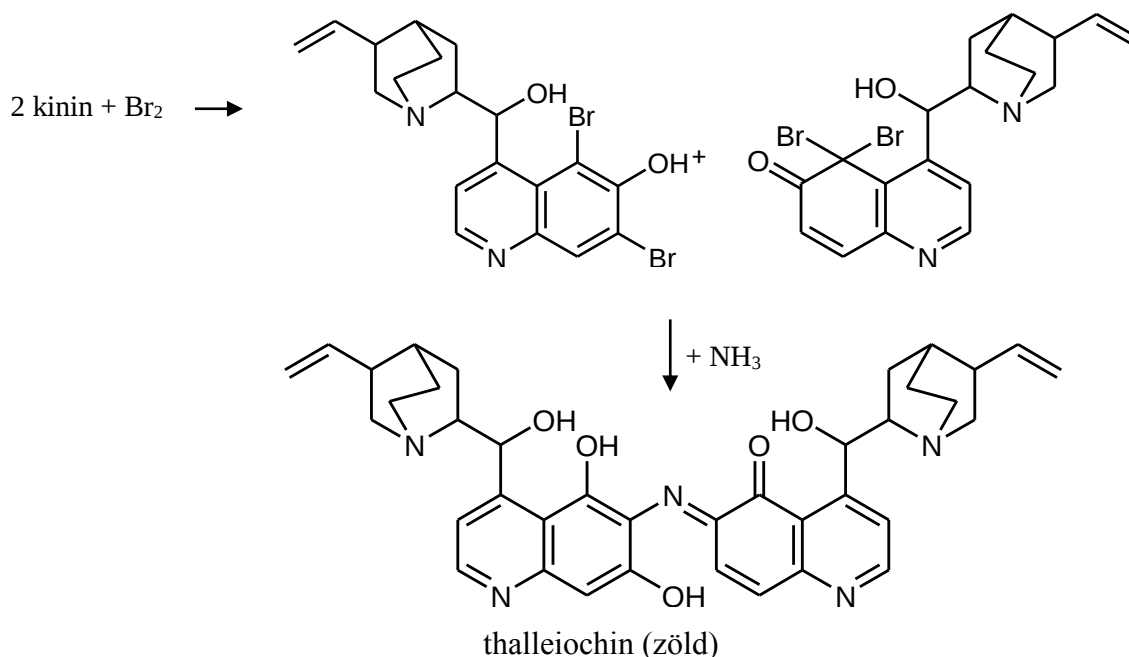
2.1. Cinchonae cortex alkaloidjainak kvantitatív meghatározása fotometriás módszerrel

0,5000 g drogport 20 ml 6,25%-os hangyasavval vízfürdön 30 percig melegítünk. Lehűtés után bürettából 50,00 ml diklórmétánt, majd pipettával 7 ml 40%-os nátrium-hidroxidot adunk hozzá. 10 perces erőyes rázogatós után 2 g porított tragakantát adunk hozzá, és addig rázzuk, míg az elegy fel nem tisztul. A folyadékot papíron szűrjük, és 10,00 ml-et mérőlombikba töltjük, majd ezt 100 ml-es csiszolatos gömblombikba öntjük (a mérőlombikot 2 × 5 ml diklórmétánnal átmossuk) és vákuumdesztillációval szárazra pároljuk. A beszáradt maradékot 10 ml metanolban oldjuk, és 25 ml-es mérőlombikba öntjük, majd a csiszolatos gömblombikot 2 × 5 ml metanollal átmossuk. A metanollal (25 ml) jelre töltött oldatból 1 ml aliquotot kiveszünk, 10 ml-es mérőlombikban metanollal jelre töltjük, majd az extinkciót 282 nm-en UV-spektrofotométerrel mérjük. Összehasonlító oldat: metanol. A drog alkaloidtartalmát (%) az alábbi összefüggés segítségével számítjuk ki:

$$\% = \frac{E}{0,436} \times 0,00406 \times 12,5 \times \frac{100}{m}$$

2.2. Cinchonae cortex alkaloidjainak kimutatása

Thalleiochin-reakció (kinin, kinidin): A kvantitatív vizsgálathoz használt diklór-metános kivonatból 5 ml-t porcelántálban vízfürdön betöményítünk. A maradékot kb. 3 ml 50%-os metanolban oldjuk, kémcsőbe öntjük. Az oldathoz addig adunk friss brómos vizet, míg a becseppentés helyén keletkezett csapadék feloldódik. A halványsárga oldathoz 1-2 csepp R ammónia oldatot adunk.



38. ábra Kinin, kinidin kimutatása thalleiochin-reakcióval

Grahe-próba (kinin, kinidin): 0,05 g drogport száraz kémcsőben Bunsen-láng felett hevítve ibolyás színű gőzök keletkeznek, amelyek a kémcső hidegebb felületén lecsapódnak. Lehűlés után a szublimátumot 2 ml metanolban oldjuk. Az oldatból 1-2 cseppet néhány csepp R kénsavval savanyított 15 ml vízhez adunk. UV₃₆₆ fényben vizsgáljuk.

3.1. A *Secale cornutum* vízoldékony- és peptid típusú alkaloidjainak elkülönítése:

Kivonat készítés: 1 g drogport néhány csepp tömény ammóniával átnedvesítünk, majd 10 ml etilacetáttal 10 perces rázogatással kivonunk. Szűrés után a kivonatot 10 ml 1%-os borkősavval kirázzuk. A borkősavas fázis kémhatását R nátrium-hidroxiddal pH = 5,3-ra beállítjuk és 1 × 10 ml, majd 2 × 5 ml kloroformmal kirázzuk (I. kloroformos fázis). A vizes fázist pH-ját ezután R nátrium-hidroxiddal 8-ra állítjuk és 1 × 10 ml kloroformmal kirázzuk (II. kloroformos fázis). A kloroformos fázisokat bepároljuk és 1 ml metanolban oldjuk.

Réteg: gyári szilikagél lemez

Felvitel:	1. I. kloroformos fázis	20 µl
	2. II. kloroformos fázis	40 µl
	3. 0,1% ergokrisztin + ergokornin teszt	20 µl
	4. 0,1% ergotamin teszt	20 µl
	5. 0,1% ergometrin teszt	20 µl

Kifejlesztő elegy: toluol – diklór-metán – etanol 28,5 : 57 : 14,5

Előhívó reagens: van Urk-reagens, hevítés 105 °C-on 5 percig

3.2. Secale alkaloidok kimutatása (van Urk-reakcióval): a rétegekromatográfiás vizsgálatához készült és metanolban oldott I. kloroformos fázist szárazra pároljuk, majd a száraz kivonathoz 3-5 csepp van Urk-reagenst (*p*-dimetil-amino-benzaldehid tömény kénsavas oldata) és 2-3 csepp hidrogén-peroxidot adunk.

Antrakinon származékok kimutatása (szklereritrin kimutatás): 0,2 g drogport 5 csepp 20%-os kénsav hozzáadása után 5 ml etil-acetáttal 2 percen át rázogtatunk. A vattán átszűrt kivonatot 2-3 ml hidegen telített NaHCO₃ oldattal összerárruk, majd 1-2 ml R kénsavat adunk hozzá.

Ellenőrző kérdések

- Milyen morfológiai sajátosságok jellemzőek az ebvészmagra?
- Mely drogból és hogyan mutatjuk ki az sztrichnint?
- Mely drogból és hogyan mutatjuk ki a brucint?
- Milyen típusú vegyület a loganin?
- Mely drogból és hogyan mutatjuk ki a loganint?
- Mely vegyület(ek) kimutatására alkalmas a Grahe-próba?
- Miből és hogyan végezzük a Grahe-próbát?
- Mit mutatunk ki a thalleiochin-reakcióval?
- Miből és hogyan végezzük a thalleiochin-reakciót?
- Mi az anyarozs?
- Hogyan választható el az ergometrin a peptidalkaloidoktól?
- Mely drogból, milyen reakcióval mutatjuk ki az ergotalkaloidokat?
- Hogyan mutathatók ki az ergotalkaloidok?
- Hogyan és mely drogból mutatjuk ki a szklereritrin?

Xantinszármazékokat tartalmazó drogok

Theae folium, tealevél

Camellia sinensis (Theaceae)

A drog a *Camellia sinensis* 6 m magasra is megnövő, örökzöld bokor levelei. A fiatal levelek szőrösek, apróbbak. Az idősebbek csaknem csupaszok, megnőhetnek 8–10 cm hosszúra és 2–5 cm szélesre is, lándzsa vagy ellipszis alakúak. A jó kereskedelmi tea 2,5–3,5% koffeint tartalmaz.

A drog szaga jellemző, illatos; íze fanyar, kesernyés.

Mate folium, máté-level

Ilex paraguariensis (Aquifoliaceae)

A drog a különböző *Ilex*-fajok, főleg az *I. paraguariensis* Közép- és Dél-Brazíliában, Paraguayban, Uruguayban és Argentína északi részén honos, 5–6 m magas, karcsú, örökzöld fák 10–16 cm hosszú, tojás alakú, bőrnemű levelei.

A drog íze aromás, kissé keserű, összehúzó, csaknem szagtalan. Forrázata kozmás, füstös szagú.

Cacao semen, kakaómag

Theobroma cacao (Sterculiaceae)

A drog a trópusi Amerikában honos, 10–15 m magasra megnövő *Theobroma cacao* fának a magja. A magok (kb. 60 db) a termés színtelen, nedvdús, édeskés-savanykás gyümölcshúsában, 5 hosszanti sorban helyezkednek el. A drog lapos, tojás alakú, 2–2,5 cm hosszú, 5–8 mm széles, vörösbarna színű. Kívül a gyümölcshús maradványai vannak rajta. A maghéj vékony, törékeny, alatta az embrió ibolyásbarna színű. Az embrió két nagy sziklevele összehajtogatott, ezért a mag könnyen törik szögletes darabokra.

Coffeae semen, kávébab

Coffea arabica, *C. liberica* (Rubiaceae)

A drog a *Coffea arabica* Abesszíniától délre honos és számos trópusi vidéken termesztett, 5–6 m magasra megnövő fa, vagy a *C. liberica* Afrika nyugati partján honos, magasabb termetű, nagyobb virágú és termésű fának a magja. A cseresznyéhez hasonló csonthéjas termés éretlenül

sötétzöld, érés közben megsárgul, majd megpirosodik. A magvak egyik oldalukon laposak, és ezen az oldalon egy barázda található. A másik oldalukon gömbölyűek, hosszúkásak, 8–10 mm hosszúak, 4–6 mm szélesek, kemények, zöldesszürke színűek. Endokarpiuma pergamenszerű. Egy termésben rendszerint két mag található.

Colae semen, kóladiómag

Cola nitida (*C. vera*), *C. acuminata* (Sterculiaceae)

A drog a kóla fák közül a *Cola nitida* és változatainak, illetve a *C. acuminata* szárított, egész vagy aprított, héj nélküli magja. Szárított drogra vonatkoztatott koffeintartalma legalább 1,5%. A héj nélküli mag (magbél) hosszúkás, a termésekben fellépő nyomóerők következtében többé-kevésbé tompa csúcsú szubtetragonális alakú. Mérete és tömege tág határok között változhat; tömege általában 5 és 15 g közötti. A külső oldal kemény, sima felszínű és sötétbarna, a belső oldal vörösbarna. A *C. nitida* és változatai esetében a magél a két sziklevelnek megfelelően két, csaknem plan-konvex részre különül. A kereskedelemben kapható drog ennek megfelelően általában kettéosztott. A sziklevelek 3–4 cm hosszúak, 2–2,5 cm szélesek és 1–2,5 cm vastagok.

A *C. acuminata* esetében a sziklevelek kisebbek, és 4–6 szabálytalan részre tagoltak.

A drogpor vörösesbarna színű. Mikroszkóp alatt, R glicerín 50% (V/V)-os oldatában vizsgálva, a mintában számos, 5–25 µm nagyságú, tojásdad, vagy vese alakú keményítőszemcse található, amelyek koncentrikus csíkozottsággal, és csillag alakú, kissé excentrikus helyzetű lerakódási centrummal rendelkeznek. A sziklevel-töredékek sejtjei nagyméretűek, vastag falúak, vöröses színűek, sokszögletűek, keményítőszemcsékkel teltek. Alkalmanként megtalálhatóak a sziklevelek epidermiszének töredékei.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Coffeae semen, Cacao semen, Mate folium, Theae folium koffein-, teobromin-, teofillintartalmának összehasonlító rétegekromatográfiás vizsgálata
2. Koffein mennyiségi vizsgálata HPLC módszerrel

1. Coffeae semen, Cacao semen, Mate folium, Theae folium rétegekromatográfiás vizsgálata

Kivonatkészítés: 1 g drogot néhány csepp tömény ammóniával átnedvesítünk, és 10 ml metanollal vízfürdőn 5 percig kivonunk. Szűrőpapíron porcelántálba szűrjük, szárazra pároljuk, a maradékot 1 ml metanolban oldjuk.

Réteg:	szilikagél lemez	
Felvitel:	1. Coffeae semen kivonata	20 µl
	2. Mate folium kivonata	10 µl
	3. Cacao semen kivonata	20 µl
	4. Theae folium kivonata	20 µl
	5. 0,1% koffein teszt	20 µl
	6. 0,1% teofillin teszt	20 µl
	7. 0,1% teobromin teszt	60 µl

Kifejlesztő elegy: Kloroform – metanol – cc. ammónia 47,5 : 4,5 : 0,5

Előhívó reagens: Kálium-jodidos jód oldat, majd 5 perc eltelte után sósav etanolos oldata

2. Koffein mennyiségi vizsgálata HPLC készülékkel

A gyakorlat célja kávé, instant kávé, fekete és zöld tea koffeintartalmának meghatározása HPLC-vel. A mennyiségi mérést a kiadott mintából párban végzi el mindenki.

2.1. A HPLC kromatográf üzembeállítása

Készítsük elő az eluent (0,1% foszforsavas H₂O – acetonitril 90:10) és ultrahangos fürdőben gáztalanítsuk. Ellenőrizzük, hogy az eluens tartályában a méréshez elegendő (legalább 500 ml) folyadék van, és az edényt a pumpával összekötő cső leér a folyadékedény aljára. (A vizsgált mintákat és az eluent 0,45 µm pórusátmérőjű membránszűrővel meg kell szűrni.)

Kapcsoljuk be a pumpát, a detektort és a számítógépet a hálózati főkapcsolókkal. Miután a detektor lefuttatta a diagnosztikai programot, a műszer mérésre kész állapotba kerül. Indítsuk el a számítógépes programot a „Wufeng HPLC” parancsikonra kattintva.

Ellenőrizzük, hogy a megfelelő mérési paraméterek vannak beállítva, ez esetben:

- 0,4 ml/perc áramlási sebesség az első 9 percben majd 0,5 perc alatt az áramlási sebesség növelése 2 ml/perc-re a következő 2,5 percben
- termosztálás 60 °C-ra
- 274 nm mérési hullámhossz
- 12 perc detektálási idő.

Az eluens áramlásának elindítása után a készüléket az erre a célra szolgáló fecskendővel légtelenítjük, majd néhány perces ekvilibrációt követően (ez alatt a nyomás és az alapvonal állandóvá válik) elkezdődhet a mérés.

2.2. Minta-előkészítés

250 mg instant kávé bemérünk és 100 ml forró HPLC tisztaságú vízzel ultrahangos fürdőben 5 perc alatt extraháljuk. A kapott kivonatot szűrőpapíron szűrjük egy Erlenmeyer-lombikba. A mintából 4 ml-t fecskendőszűrőn (0,45 µm pórusátmérőjű teflonszűrő) leszűrünk. Őrölt kávé, valamint a fekete és zöld tea esetén a mintaelőkészítés a fenn leírt módszer szerint történik, de a kiindulási minta mennyisége mindkét esetben 500 mg.

Rögzítendő adat: minta neve

Rögzítendő adat: bemért minta tömege (mg)

3. Minták HPLC analízise

A kromatográfot és a számítógépes adatgyűjtő programot beállítjuk. A mintát 250 µl-es fecskendővel juttatjuk be az adagoló szelepbe. A minták között vízzel való öblítésre van szükség. Ez után a fecskendőt 3-szor átöblítjük a mérendő oldattal oly módon, hogy a felszívott oldatot a szennyes gyűjtőbe engedjük ki. Levegőbuborék semmiképpen sem lehet a fecskendőben, ezért a mintaoldatot lassan szívjuk fel. Nagyon ügyeljünk arra, hogy semmilyen esetben sem kerülhet levegő a HPLC készülékbe, mivel a mérést és a műszert is tönkretesz.

A „Load” állásban lévő adagolószelep nyílásába injektáljuk a minta 100 µl-ét. Mivel a befecskendezett minta a mintahurok térfogatának (20 µl) többszöröse, a teljes

fecskendőtartalom beadagolása nemcsak megtölti, hanem át is öblíti a mintahurkot. A HPLC oszlopra kerülő minta térfogata **20 µl**.

Határozott mozdulattal fordítsuk át az adagolószelep karját „Inject” állásba - ezzel a minta az oszlopra kerül, és a mérés elindul. A kromatogram felvétele után az adagolószelepet forgassuk ismét ütközésig a „Load” állásba. A koffein csúcs retenciós idejét és csúcs alatti területet (AUC, area under curve) leolvassuk a kromatogramról.

3.1. Minták mennyiségi analízise

A minták esetén 1 mérést végezzünk. A koffein azonosítása a mintában retenciós idő, azaz t_R - egyezés alapján lehetséges. $t_R = \sim 7,7$ perc

Rögzítendő adat: minta AUC értéke

3.2. Az eredmény kiszámítása

Koffein pontos bemérésével ismert koncentrációjú törzsoldatot készítettünk a következő módon:

3,18 mg koffeint bemértünk egy 10 ml-es mérőlombikba, majd ezt metanolban oldottuk és jelre töltöttük. A törzsoldat hígításával készítettünk egy kalibráló oldatsorozatot három darab 5 ml-s mérőlombikba. Az oldatsorozat elkészítésekor 1, 2, 3, valamint 4 ml törzsoldatot mértünk be pipettával a lombikokba, és jelre töltöttük azokat metanollal.

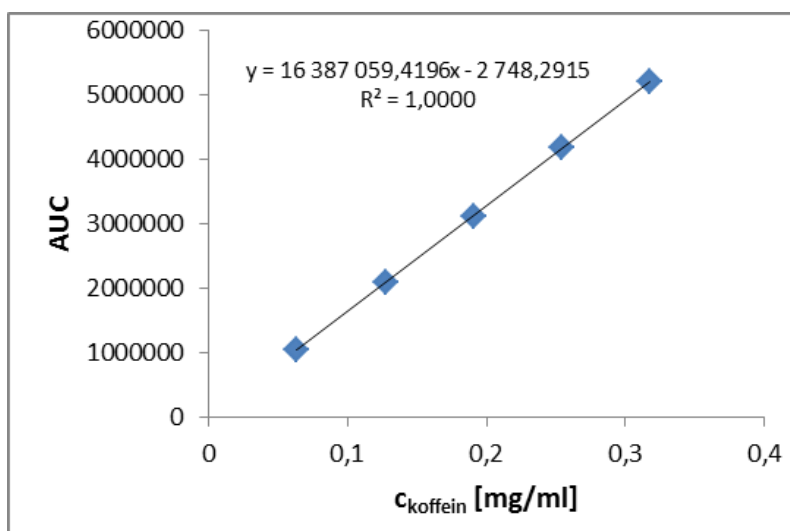
Szükséges adatok:

	AUC 1	AUC 2	AUC 3	AUC átlag	C _{koffein} [mg/ml]	szórás	RSD%
1. kalibráló oldat	1031573	1039113	1042335	1037674	0,0636	5523	0,53
2. kalibráló oldat	2077355	2081974	2088432	2082587	0,1272	5564	0,27
3. kalibráló oldat	3124386	3119639	3125827	3123284	0,1908	3238	0,10
4. kalibráló oldat	4171081	4175574	4168844	4171833	0,2544	3427	0,08
Törzsoldat	5199523	5203313	5209025	5204136	0,3180	4783	0,09

Számítás:

A mérés eredményeként a csúcs alatti terület alapján megállapítható a minta koffein tartalma. A mennyiségi analízishez MS Office Excel segítségével a megadott kalibrációs pontokra

egyenest kell illeszteni ($y = ax+b$), majd meg kell határozni annak egyenletét és a korrelációs együtthatót (R^2). A kalibrációs egyenes egyenletébe a minta AUC értékét (y) behelyettesítve meghatározzuk a minta **1 ml**-ében lévő koffein mennyiségét (x), amely alapján kalkulálható az 1 g mintában lévő koffein mennyisége (mg).



39. ábra Kalibrációs egyenes

Meghatározandó: 1 g minta koffein-tartalma (mg)

Ellenőrző kérdések:

Milyen típusú vegyületeket tartalmaz a kakaó, a kávé és a tea drogja?

Milyen morfológiai sajátosságokkal rendelkezik a kóladiómag?

Milyen főbb részekből áll a HPLC készülék?

Hogyan határozható meg drogok és készítményeik koffeintartalma HPLC módszerrel?

3.5. Illóolajtartalmú drogok vizsgálata

Monoterpénekben gazdag illóolajtartalmú drogok vizsgálata

Coriandri fructus, koriandertermés

Coriandrum sativum (Apiaceae)

A drog a *Coriandrum sativum* (kerti koriander) szárított ikerkaszattermése. A Ph. Hg. VIII. szerint a *Coriandri fructus* legalább 3 ml/kg illóolajat tartalmaz. A *C. sativum* terméséből vízgőzdesztillálással előállított illóolaj tiszta, színtelen, vagy halványsárga folyadék.

Az ikerkaszattermés 1,5-5 mm átmérőjű, többé-kevésbé gömbölyű. Színe barna vagy világosbarna. A termések 2-6 mm hosszúak, ovális formájúak. A résztermések egymással rendszerint szorosan összekapcsoltak. A csupasz felszínű termés 10 kevésbé kiemelkedő főbordával és 8 egyenes, erőteljesen kiemelkedő mellékbordával rendelkezik. A merikarpiumok belső felszíne konkáv alakú. A termés felső részén található a kihegyezett bibepárna. A terméskocsány rövid darabja a termésen maradhat.

Mikroszkóppal vizsgálva számtalan olajcsepp mellett az endospermium töredékek apró, vastag falú, szabályos sejtjeit láthatóak, amelyek kalcium-oxalát összetételű mikrokristályokat, rozettákat és olajcseppeket tartalmaznak. Megfigyelhetők továbbá az endokarpium parkettaszerűen elrendeződő, nagyon keskeny sejtjei, amelyek általában a mezokarpiumból származó, téglalap alakú, vékonyfalú, vagy vastagabb falú szklereidák rétegével kapcsolódnak össze. A mezokarpium erősen megvastagodott, gödörkés falú sejtekből álló szklerenchima rétegének töredékei, amelynek fuziform sejtjeihez merőlegesen kapcsolódnak a szomszédos sejtrétegek. A mezokarpium parenchima töredékei (keresztmetszeti sík) apró, enyhén megvastagodott falú sejtekkel; alkalmanként kiválasztó csatorna maradványokkal és szklereidákkal. Az epikarpium töredékei (felszíni nézet) vékony falú soklapú sejtekkel, amelyek közül néhány kalcium-oxalát hasáb kristályokat tartalmaz. Ritkán a kiválasztó csatornák töredékei láthatók barna sejtekkel (felszíni nézet), és edénynyaláb kötegek töredékei észlelhetők alkalmanként.

***Menthae crispae folium*, fodormentalevél**

Mentha spicata var. *crispa* (Lamiaceae)

A drog a *Mentha spicata* var. *crispa* és a *Mentha aquatica* var. *crispa* nálunk különböző változatokban és fajtákban termesztett évelő növények levele. Szárított drogra számolva 100 g legalább 1,0 ml illóolajat tartalmazzon.

A drogot adó levél nyeles, a nyél legfeljebb 1 cm hosszú. A felső levelek ülők, félig szárölelők. A levél lemeze kb. 5-6 cm hosszú, alakja általában kerek, tojásdad, szív alakú, felülete ráncos, hullámos, ritkán sima. A levél csúcsa kihegyezett, válla kerek vagy szív alakú. A levéllemez széle fűrészes, amellet fódros, hullámos. A fogak egyenlőtlenül hosszúak, rendszerint görbültek. A *Mentha spicata* var. *crispa* levele teljesen kopaszt, a *Mentha aquatica* var. *crispa* levele gyéren szőrös. A drog összemorzsolva jellemző, a konyhaköményre emlékeztető szagú, íze jellemző, csípős.

Mikroszkóppal vizsgálva a következő ismertetőjegyek láthatóak:

Keresztmetszet: a levél dorziventrális szerkezetű. A szín- és fonákepidermisze is enyhén hullámos falú gödörkézett téglalapalakú sejtekből áll. Az epidermiszen a *M. piperitához* hasonló mirigyek és mirigypikkelyek láthatók. Mind a szín-, mind a fonákepidermiszen többsejtű, kissé görbült fedőszőrök megtalálhatók. A levél többi szövete (palizád, szivacsos parenchima, szállítónyalábok) a *M. piperita* levelével nagyjából megegyezően alakult ki.

Derített készítmény: A felszínepidermisz legtöbb sejtje szabálytalan alakú és gyengén hullámos falú; az erek felett egyirányban erősebben megnyúltak, helyenként gödörkésen vastagodottak. Gázcsereenyílások csak szórványosan vannak. A szőrök nagyjából ugyanolyanok, mint a *M. piperita* levelein. A *M. crispae* levelein találunk azonban meggörbült, többsejtű, tagolt fedőszőröket is. A fonákepidermiszen a sejtek nagy része erősebben hullámos falú, Lamiaceae típusú mirigypikkelyek, valamint a diacitikus gázcsereenyílások (sztómák) sokkal nagyobb számban találhatóak.

Az érszigetek általában sokszögletűek. Az átlagos érszigetszám 11. Az érszigeteket határoló erek 1–2 tracheida szélesek. Az érágak leggyakrabban egyszerűek, el nem ágazók; az érszigetbe legfeljebb két ág nyúlik be. Kristályok sem az erek mentén, sem pedig az érszigetekben nincsenek.

A *M. crispának* két változata ismeretes: a kopasz és a szőrös. A kopasz változat (*Mentha spicata* var. *crispa*) levelén az erek felett az edénnyalábok irányában megnyúlt, egyenes falú epidermiszsejtek között gyakoriak a kis fejcskék kiválasztósejtek. Az érszigetekben elszórtan a 8 sejtű, tipikus, az ajakosokra jellemző mirigyszőrök láthatók. A szőrös változat annyiban tér

el a csupasz változattól, hogy mind a felszín, mind pedig a fonák epidermiszt az erek és az érszigetekben kissé görbült, többsejtű, hosszú, tagolt fedőszőrök egyaránt sűrűn borítják.

Lavandulae flos, valódi levendula virág

Lavandulae aetheroleum, levendulaolaj

Lavandula angustifolia (Lamiaceae)

A drogot a valódi (keskenylevelű) levendula megszárított virágai adják. A drog legalább 13 ml/kg illóolajat tartalmaz, szárított drogra vonatkoztatva. A drog erős, aromás illattal rendelkezik.

A rövidnyelű virágok egy kékesszürke, csöszzerű, disztális végén négy rövid foggal és egy kicsiny, kerekded cimpával rendelkező csészéből, egy kétcimpájú felső ajakkal és háromcimpájú alsó ajakkal rendelkező, kék színű, kétajkú pártából, és négy, tojásdad portokkal rendelkező porzóból állnak.

A porított drogport mikroszkóppal vizsgálva, benne egyszer, vagy többször elágazó fedőszőröket; rövid nyéllel és 8 sejtű fejjel rendelkező Lamiaceae típusú mirigyszőröket; egy- vagy többsejtű nyéllel, és egysejtű fejjel rendelkező mirigyszőröket; illetve egyenetlen, hosszú nyéllel és egysejtű fejjel, valamint a fejet a nyéltől elválasztó, sima felszínű kutikulával borított köztes sejttel rendelkező mirigyszőröket láthatunk. Ez utóbbiaknál néha a nyélen, közvetlenül a köztes sejt kezdete alatt egy sejtkoszorú is látható, amely kisméretű, gömbölyű sejtekből épül fel. Láthatók a viráglevelek belső oldalán lévő bibircses felszínű epidermisz, továbbá a hullámos falú, kalcium-oxalát piramiskristályokat tartalmazó csészeepidermisz töredékeit.

Az illóolajat a valódi levendula virágzó ágvégződéseiből vízgőzdesztillációval állítják elő.

A levendulaolaj színtelen vagy halványsárga, tiszta folyadék linalil-acetátra emlékeztető illattal.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Illóolajok általános vizsgálata (Minőségi vizsgálata, szennyezések kimutatása)
2. Növényi drogok illóolaj-tartalmának meghatározása
3. Lavandulae flos, Coriandri fructus, Menthae piperitae folium, Menthae crispae folium, Carvi fructus: monoterpének azonosítása rétegekromatográfiával

1. Illóolajok általános vizsgálata (Minőségi vizsgálata, szennyezések kimutatása)

Minőségi vizsgálat:

Illóolajok szaga és íze: az illóolaj 3 cseppjét 5 ml R alkohollal (90%) elegyítjük, és 10 g porított szacharózzal elkeverjük. A szag és az íz gyakorlatilag egyezzen meg annak a növénynek vagy növényi résznek a szagával és ízével, amelyből az illóolaj származik.

Szennyezés kimutatása:

1. Etanol kimutatása: 1 ml illóolajat kémcsőbe öntünk, amelynek nyílását fukszinkristályt tartalmazó vattapamattal lezárjuk, majd forró vízfürdőben melegítjük.
2. Zsíros olajok és elgyantásodott illóolajok kimutatása: egy csepp illóolaj szűrőpapírra cseppentve ne hagyjon áttetsző vagy zsíros foltot maga után, 24 órán belül teljesen párologjon el.

2. Növényi drogok illóolaj-tartalmának meghatározása

A növényi drogok illóolaj-tartalmát speciális, körfolyamatos illóolajdesztilláló-készülékben, az alábbiakban megadott körülmények között, vízgőzdesztillációval határozzuk meg. A desztillátumot a beosztásokkal ellátott mérőcsőben fogjuk fel, amely R xilolt tartalmaz az illóolaj felvétele céljából; a vizes fázis automatikusan visszajut a desztilláló lombikba.

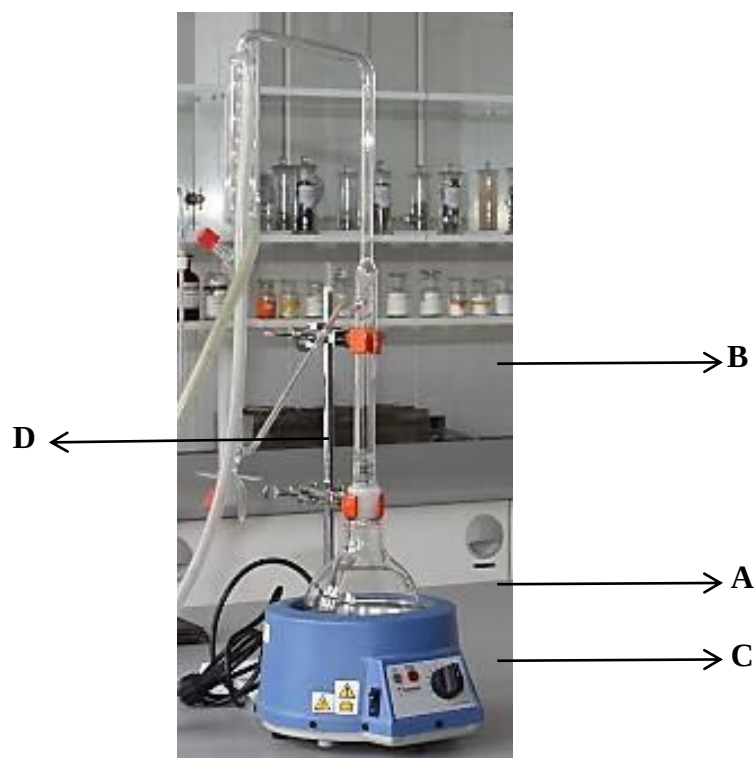
A készülék részei (40., 41. ábra)

- A. Rövid nyakú, csiszolatos gömblombik; a csiszolat kiszélesedő végénél a belső átmérő kb. 29 mm
- B. Desztillálófeltét, amelynek különböző részeit egybeforrasztották és pontosan illeszkedik a lombikhoz. A K' üveg dugó a nyomáskiegyenlítés céljából szellőztető furattal van ellátva, amely összeillik a K csővön lévő, kb. 1 mm átmérőjű nyílással; a K cső csiszolatos, kiszélesedő végének belső átmérője 10 mm; a körte alakú J rész térfogata 3 ml; a JL cső

0,01 ml-es beosztású; a gömb alakú L rész térfogata kb. 2 ml; az M csap háromállású; a B elágazás 20 mm-rel a beosztott rész felső végének síkja felett csatlakozik

C. Pontosan szabályozható, megfelelő fűtőberendezés

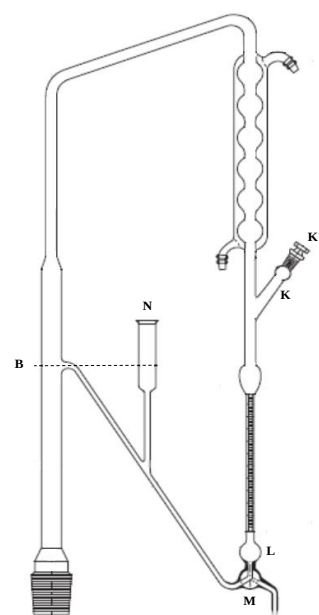
D. Függőleges állvány, vízszintesen felszerelt, szigetelőanyaggal bevont gyűrűvel



40. ábra Desztillálófeltét

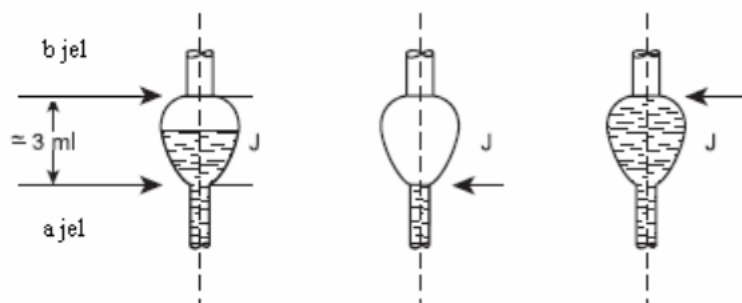
Eljárás

A meghatározást a vizsgálandó drog tulajdonságaitól függő módon végezzük. A lombikba a desztilláló folyadék előírt mennyiségét öntjük, néhány apró porózus porcelándarabkát dobunk bele, majd felszereljük a desztillálófeltétet (41. ábra). A készülékbe az N tölcseren keresztül a B szint eléréséig R vizet töltünk. A K' dugót eltávolítva előírt mennyiségű R xilolt juttatunk be pipettával úgy, hogy a pipetta hegye a K cső végéig érjen. A K' dugót úgy helyezzük vissza, hogy a nyílás és a szellőztető furat között biztosítsuk az átjárhatóságot. A folyadékot a lombikban forrásig melegítjük és – ha nincs más előírás – a desztilláció sebességét 2-3 ml/perc-re állítjuk be.



41. ábra Desztillálófeltét

A desztilláció sebességének meghatározásához a desztillálás folyamán a háromállású csap segítségével addig csökkentjük a víz szintjét, amíg a meniszkusz az alsó jelzést (a) el nem éri (42. ábra). A csap elzárását követően mérjük azt az időt, amíg a folyadék szintje eléri a felső jelzést (b). A csapot megnyitjuk, és a fűtést a kívánt sebességnek megfelelően szabályozva, folytatjuk a desztillációt. 30 percen át desztillálunk, majd a melegítést megszüntetjük és legalább 10 perc várakozás után leolvassuk a xilol térfogatát a beosztott mérőcsőben.



42. ábra A desztilláció sebességének meghatározása

A drog előírt mennyiségét a lombikba juttatjuk, és a desztillációt a fentiek szerint, az előírt ideig, a megadott sebességgel folytatjuk. A melegítés megszüntetése után 10 perccel leolvassuk a beosztott mérőcsőben összegyűlt folyadék térfogatát, majd ebből levonjuk az előzőleg feljegyzett xiloltérfogatot. A különbség a bemért drog illóolajtartalma. Az eredményt a drog 100 grammjára vonatkoztatva, milliliterben adjuk meg.

Ha az illóolajat más analitikai célra is fel kell használni, a xilol és az illóolaj vízmentes elegyét a következőképpen nyerhetjük ki: a K' dugót eltávolítva R fluoreszcein-nátrium oldatából (1 g/l) 0,1 ml-t és 0,5 ml R vizet juttatunk a készülékbe.

A háromállású csap segítségével a xilol-illóolaj elegyet a gömbalakú L részbe engedjük. 5 perc múlva az elegyet lassan leeresztjük, amíg az éppen eléri az M csap magasságát. A csapot az óramutató járásával ellentétes irányban kinyitjuk, ekkor a víz a BM összekötő csőből kifolyik. A csövet az N tölcséren keresztül R-acetonnal és kevés R-toluollal átmoszuk. A csapot az óramutató járásával ellentétes irányban tovább forgatjuk, és alkalmas lombikban felfogjuk a xilol és illóolaj elegyét.

3. *Lavandulae flos*, *Coriandri fructus*, *Menthae piperitae folium*, *Menthae crispae folium*, *Carvi fructus*: monoterpének azonosítása rétegekromatográfiával

Linalool és mentol kimutatása (levendulavirágból, koriandertermésből és borsosmentalevélből)

Kivonat készítése: frissen porított 1-1 g *Menthae piperitae folium*ból, *Lavandulae flos*ból, ill. *Coriandri fructus*ból 5-5 ml kloroformmal (levendula esetén 10 ml) szobahőmérsékleten rázogatással kivonatot készítünk. A kivonatot kloroformmal megnedvesített papírszűrőn szűrjük. A rétegekromatográfiás ellenőrzést szilikagél lemezen végezzük.

Réteg: szilikagél réteg

Startpontok:	1. <i>Lavandulae flos</i> kloroformos kivonata	20 µl
	2. 0,1%-os linalool teszt	10 µl
	3. <i>Coriandri fructus</i> kloroformos kivonata	40 µl
	4. 0,1%-os mentol teszt	10 µl
	5. <i>Menthae piperitae folium</i> kloroformos kivonata	60 µl

Kifejlesztő elegy: *n*-hexán – aceton 8 : 2

Detektálás: a szobahőmérsékleten megszáritott kromatogramot R-vanillin-kénsav reagenssel bepermetezzük, majd 5 percig 105 °C-on hevítjük.

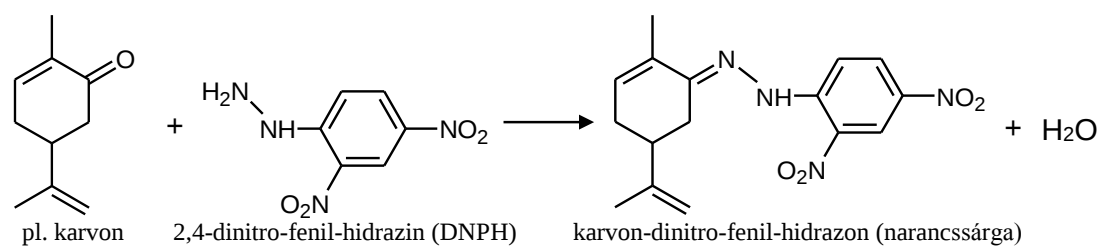
Karvontartalom kimutatása (fodormenta levélből és köménytermésből)

Kivonat készítése: frissen porított 2,5 g *Menthae crispae folium*ból ill. 1 g *Carvi fructus*ból 15, ill. 5 ml kloroformmal szobahőmérsékleten rázogatással kivonatot készítünk. A kivonatot kloroformmal megnedvesített papírszűrőn szűrjük. A rétegekromatográfiás ellenőrzést szilikagél lemezen végezzük.

Startpontok:	1. <i>Carvi fructus</i> kloroformos kivonata	40 µl
	2. 0,1%-os karvon teszt	20 µl
	3. <i>Menthae crispae folium</i> kloroformos kivonata	60 µl

Kifejlesztő elegy: *n*-hexán – aceton 8 : 2

Detektálás: DNPH (2,4-dinitro-fenilhidrazin) reagens



43. ábra A karvon detektálása DNPH-reagenssel

Ellenőrző kérdések

- Hogyan nyerhetünk drogokból illóolajat?
- Hogyan végezzük illóolajok szennyezés-vizsgálatát?
- Hogyan végezzük a növényi drogok illóolaj-tartalmának meghatározását?
- Hogyan vizsgáljuk az illóolajok összetételét rétegekromatográfiával?
- Hogyan mutatjuk ki a karvont? (ketonok, aldehidek kimutatása)

Szeszkviterpénekben gazdag illóolajtartalmú drogok vizsgálata

Matricariae flos (kamillavirágzat)

Matricariae aetheroleum (kamillaolaj)

Matricaria recutita (Asteraceae)

A drog az orvosi székfű (kamilla) szárított fészekvirágzata. A kamillavirágzat illóolajtartalma szárított drogra vonatkoztatva legalább 4 ml/kg, összes apigenin-7-glükozid tartalma pedig legalább 0,25%.

A kinyílt virágzat virágzati tengelye megnyúlt kúp, esetenként félgömb alakú (fiatal virágzatoknál). A számos fészekpikkely 1-3 sorba rendeződve helyezkedik el. A virágzat szegélyén 12-20, fehér pártájú nyelves virág, középső részén több tucat sárga színű, csöves virág található. A fészekpikkelyek tojásdadok vagy lándzsásak, szegélyük hártvás, barnásszürke. A virágzati tengely üreges, vacokpelyvák nem találhatók rajta. A nyelves virágok pártája alul egy barnássárga csöves részből áll, amely fehér színű, megnyúlt tojásdad alakú nyelvben folytatódik. A magház alsó állású, sötétbarna színű, tojásdad vagy gömbölyű alakú; hosszú bibeszálban és kétágú bibében folytatódik. A csöves virágok pártája sárga színű, felső kiszélesedő részük öt cimpában végződik; öt epipetal porzójuk portokjai összenöttek; a termőtáj alakulása a nyelves virágokéval megegyező.

A virágzatot részeire szedjük, majd a részeket mikroszkóp alatt vizsgáljuk. A fészekpikkelyek szegélyét vékony falú sejtek alkotják, míg központi részükön megnyúlt szklereidák, ritkán gázcserenyílások találhatók. A nyelves virágok pártájának belső epidermisze felülnézetben vékony falú, sokszögletű, kissé papillás sejtekből, külső epidermisze erősen hullámos falú, csíktolt felszínű kutikulával borított sejtekből áll. A csöves virágok pártáját hosszában megnyúlt epidermiszsejtek borítják. A pártacimpák csúcsának közelében papillák kis csoportjai fordulnak elő. A fészekpikkelylevelek külső felszínén, illetve a csöves és nyelves virágok pártáján egyaránt találhatók mirigyszőrök, melyek rövid nyélből és 2–3 sorban, soronként 2-2 sejtéből álló fejből állnak. A magházat alapi részénél szklereidákból álló gyűrű vesz körül. A magház falában hosszanti bordák húzódnak, melyekben vékony falú, hosszában megnyúlt sejtek találhatók, illetve ezekkel váltakozva apró, sugárirányban megnyúlt, nyálkatartalmú sejtek fuziform csoportjai láthatók. A hosszanti bordákon sok mirigyszőrt találunk. A bibe csúcsi része papillákkal borított. A magház alapszöve és a portokok nagy mennyiségben tartalmaznak apró kalcium-oxalát rozettákat. A pollenszemek gömbölyűek vagy háromszögletesek, mintegy 30 µm nagyságúak, csapos falvastagodású exinével és három csírapuval rendelkeznek.

Az illóolajat a kamilla friss vagy szárított virágzatából vagy virágzó ágvégeiből vízgőzdesztillációval nyerik. A kamillaolaj két típusa ismeretes: az egyik bizabolol-oxidokban, a másik (-)- α -bizabololban gazdag. Az illóolaj, tiszta, sötétkék színű, sűrűnfolyó folyadék. Szaga erős, jellegzetes.

Arnicae flos, hegyi árnika virágzat

Arnica montana (Asteraceae)

A drog a hegyi árnika egész vagy részben szétesett, szárított virágzata. A gyógyszerkönyvi minőségű drognak legalább 0,40%(m/m) szeszkviterpén-laktont kell tartalmaznia (helenalin-tiglatban kifejezve; szárított drogra). A drog aromás illatú.

A virágzat mintegy 20 mm átmérőjű és 15 mm vastag. A kocsány 2–3 cm hosszú. A 18–24 db hosszúkás-lándzsás, merev csúcsú fészekpikkely (fellevél) egy vagy két sorba rendeződött. Nagyítóval vizsgálva a zöld színű fellevelek külső felszínén zöldessárga szőrök figyelhetők meg. A domború virágzati tengely mintegy 6 mm átmérőjű, finom szemcsés felszínű, és szőrökkel fedett. A virágzat szélén lévő, körülbelül 20 db nyelves virág 20–30 mm-es; a fészek tengelyén ülő nagyszámú csöves virág mintegy 15 mm nagyságú. A 4–8 mm-es magház tetején 4–8 mm nagyságú, durva, szürkésfehér szőrökből álló bóbíta található. Néhány barna színű, bóbíta nélküli, vagy bóbítás kaszat is előfordulhat a drogban.

A fészekpikkelyek megnyúlt tojásdadok, merev csúcsúak. Szegélyük szőrökkel borított. A nyelves virágok csészéje csökevényes; apró, érdes szőröket viselő finom, fényes, szürkésfehér sertékből áll. A narancssárga párta 7-10 párhuzamosan futó szállítónyalábbal rendelkezik, és három kisméretű cimpában végződik. A porzók portokjai szabadok. A keskeny, barna magház egy kifelé görbülő, kétágú bibeszálat, ill. bibét visel. A csöves virágok sugaras szimmetriájúak, magházuk és csészéjük a nyelves virágokéhoz hasonló. A rövid párta öt begöngyölt, háromszögletes cimpával rendelkezik. Az öt fertilis porzó a portokjainál összenőtt.

A virágzatot alkotórészeire szedve mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldat alkalmazásával vizsgálva, a következő láthatjuk: a fészekpikkelyek epidermiszén gázcserenyílások és szőrök láthatók, melyek a fészekpikkelyek külső oldalán nagyobb számban találhatók. Különböző szőrtípusok figyelhetők meg: egy sejtsoros, soksejtű, 50-500 μ m nagyságú fedőszőrök, melyek nagy számban fordulnak elő a fellevelek szegélyén; mintegy 300 μ m nagyságú mirigyszőrök, melyek egy vagy két sejtsoros, soksejtű nyéllel, és soksejtű fejjel rendelkeznek, és túlnyomórészt a fellevelek külső felszínén találhatók meg; mintegy 80 μ m nagyságú, egy sejtsoros, soksejtű nyéllel és soksejtű fejjel rendelkező mirigyszőrök, melyek a fellevelek belső

felszínén fordulnak elő nagy számban. A nyelvcsőrök pártájának epidermisze hullámos falú, vagy hosszúkás sejtekből áll. Kevés gázcsere nyílás és az alábbi, különböző típusú szőrök is előfordulnak: akár 500 µm nagyságot is meghaladó fedőszőrök, melyek 1-3 db, vastagodott falú alapi sejttel, 2-4 vékonyfalú nyélsel és nagyon hegyes csúccsal rendelkeznek; két sejt soros, soksejtű fejjel rendelkező mirigyszőrök és soksejtű nyéllal és soksejtű fejjel rendelkező mirigyszőrök. A nyelvcsőrök kerekded, papillás felszínű sejtekben végződnek. A magház epidermiszén az alábbi szőrtípusok láthatók: rövid nyéllal és soksejtű fejjel rendelkező mirigyszőrök; ikerszőrök, melyek általában két, oldaluknál összenőtt sejtéből állnak. Az ikerszőrök közös sejtfalai általában gödörkésen vastagodottak, és egy hegyes, néha kétágú csúcsban végződnek. A csészecsőrök epidermisze hosszúkás sejtekből épül fel; rövid, egysejtű, a serték felső végével ellentétes irányban hajló fedőszőröket visel. A pollenszemek mintegy 30 µm átmérőjűek, kerekdedek, csapos vastagodású exinével és három csírákapuval rendelkeznek.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Matricariae flos rétegekromatográfiás vizsgálata
2. Proazulén kimutatása EP-reakcióval (Millefolii herba, Matricariae flos)
3. Hegyi árnik és mexikói árnik (*Heterotheca inuloides*) rétegekromatográfiás összehasonlító vizsgálata

1. Matricariae flos rétegekromatográfiás vizsgálata

Kivonat készítése: 1 g porított drogból 10 ml kloroformmal szobahőmérsékleten 10 perces rázogatással kivonatot készítünk. A kivonatot porcelántálba szűrjük, majd szobahőmérsékleten 5 ml-re betöményítjük.

Szorbens: szilikagél lemez

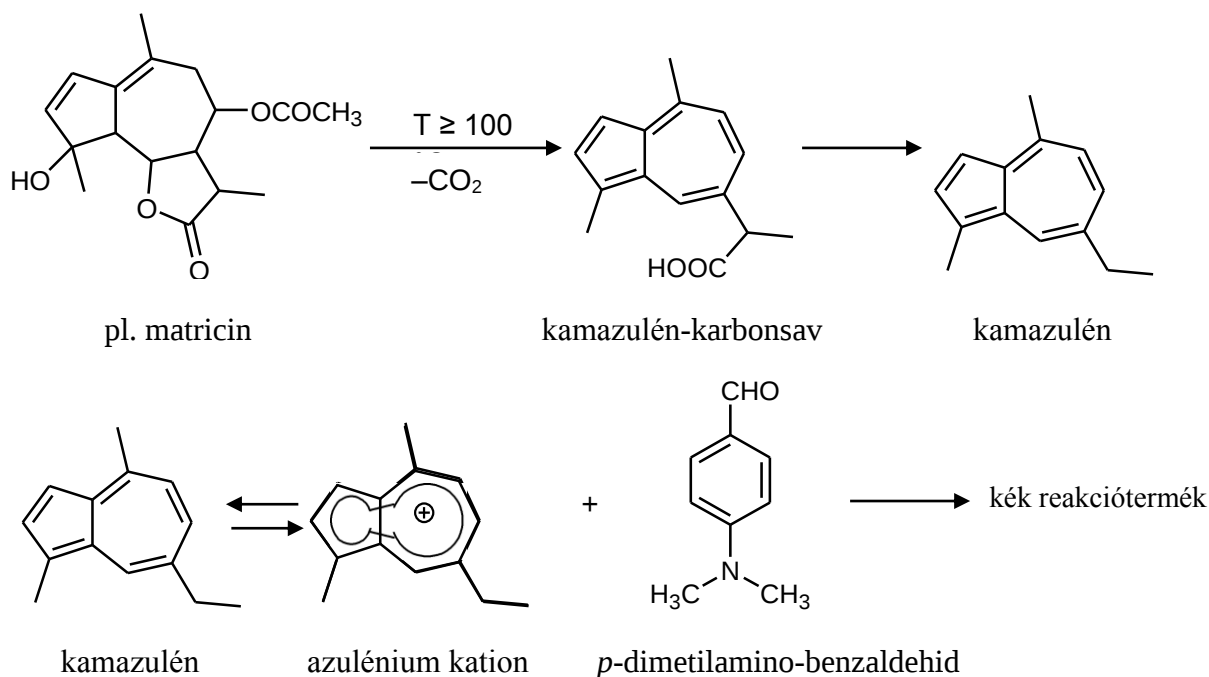
Startpontok:	1. Matricariae flos kloroformos kivonata	80 µl
	2. Kloroformmal hígított Matricariae aetheroleum	20 µl

Kifejlesztő elegy: benzol – etil-acetát 8 : 2

Detektálás: EM-reagens (*p*-dimetilamino-benzaldehid ecetsavas oldata)

2. Proazulének kimutatása EP-reakcióval (Millefolii herba, Matricariae flos)

1 g porított drogból 10 ml kloroformmal szobahőmérsékleten 5 perces rázogatással kivonatot készítünk. A kivonatot porcelántálba szűrjük és vízfürdőn óvatosan bepároljuk. A maradékot 2,5 ml EP-reagens (*p*-dimetilamino-benzaldehid ecetsavas oldata) és 1 ml víz elegyében feloldjuk, kémcsőbe öntjük, és a kémcsövet forró vízfürdőben tartjuk 5 percig. Ezután a reakcióelegyet lehűtjük, és 2 ml petroléterrel összerázzuk. Az alsó fázis kék vagy kékeszöld színű lesz.



44. ábra Proazulének átalakulása kamazuléné, kimutatásuk EP-reakcióva

3. Hegyi árnika és mexikói árnika (*Heterotheca inuloides*) rétegekromatográfiás összehasonlító vizsgálata

Kivonatkészítés 2,00 g porított drogot 10 ml R metanollal 60 °C-os vízfürdőben 5 percig rázogatás közben melegítünk. A lehűtött kivonatot megsűrjük.

Réteg: gyári szilikagél lemez

Felvitel: 1. rutin 1%-os oldata 10 µl

2. mexikói árnika metanolos kivonata 10 µl

3. hegyi árnika metanolos kivonata 20 µl

Kifejlesztő elegy: hangyasav – víz – etil-metil-keton – etilacetát 10 : 10 : 30 : 50

Előhívó reagens: bázisos ólomacetát oldat, 366 nm

Ellenőrző kérdések

- Mit nevezünk proazulénnek?
- Milyen vegyületeket és hogyan mutathatunk ki EP-reakcióval?
- Vázolja fel a proazulén-azulén átalakulást!
- A hegyi árnik és mexikói árnik összetételében milyen hasonlóságokat illetve különbségeket észlelt?

Fenilpropán származékokban gazdag illóolajtartalmú drogok vizsgálata

Cinnamomi cassiae cortex (kassziai fahéjfa kéreg)

Cinnamomi cassiae aetheroleum (kasszia fahéj olaj)

Cinnamomum cassia (Lauraceae)

A drog a kassziai (kínai) fahéjfa 6-7 éves örökzöld fa ágairól lefejtett, parájától részben megtisztított és megszáritott héjkérge. A fahéjfa főleg Kína délnyugati részein és Vietnámban honos, e helyeken és más trópusi területeken termesztik. Száritott drogra számolva 100 g legalább 1,2 ml illóolajat tartalmazzon.

A parakéregtől részben megtisztított, kb. 40 cm hosszú kéregdarabok csövekké vagy csatornaszerű félcsövekké göngyölődnek össze. Kiegyenesítve 2-6 cm szélesek, 1-3 mm vastagok, kívül sötétbarnák, belül valamivel sötétebbek. Friss törési lapjuk világosabb, sárgásbarna színű, sima, vagy alig rostos. Keresztmetszetén kézi nagyítóval a közepétől kissé kifelé egy világosabb, úgynevezett „mechanikai gyűrű” látható. Szaga jellemző, fűszeres. Íze fűszeres, édeskés, csípős, fanyar.

A drog keresztmetszetét mikroszkóppal vizsgálva a bőrszövet egyes részletei, az elsődleges kéreg és a hánctest (másodlagos kéreg) látható. A felületen helyenként epidermisz, gyakrabban a periderma megmaradt részleteit, ennek sötétbarna és lapos sejt sorokból álló paraszövetét és a fellogént figyelhetjük meg. Az elsődleges kéreg parenchimás, csak elszórtan fordulnak elő benne vastag falú kősejtek. Szembetűnők viszont az áttetsző nyálkatartók, valamint a parenchimasejtekben a sok egyszerű és összetett keményítőszem. Méretük 1-15 μm , de 30 μm -t elérők is lehetnek. A kéreg- és a hánctest határán kősejtekből álló, parenchimahidakkal csak helyenként megszakított, ún. „mechanikai gyűrű” helyezkedik el. Ennek sejtjei gödörkések, többnyire a befelé néző faluk vastagodott erőteljesebben.

A hánctestben a bélsugarak többnyire kétsorosak, helyenként kalcium-oxalát tűket tartalmaznak. A hánccparenchima sejtjeiben keményítőt, a parenchimasejtek között azoknál nagyobb nyálkasejteket és sok illóolajtartót találunk. A háncsban helyenként inkább magányos, legfeljebb kettesével vagy hármával csoportosult hánccsrost, egy-egy kősejt és összenyomódott rostacsövek láthatók. A hánccsrostok hossza 250–400 μm , vastagsága 30-40 μm .

A porított drog barna színű. Mikroszkópos képében színtelen vagy sárga színű hánccsrostokat és parenchimarészleteket találunk. A parenchimasejtekben egyszerű vagy összetett keményítőszemek láthatók. A befelé és oldalt megvastagodott falú kősejtek csoportokat

alkotnak. Parasejtek ritkán fordulnak elő. Ne legyenek a porban fatestből származó elemek (tracheák, tracheidák).

A kasszia fahéj olajat a kassziai fahéjfa leveleiből és fiatal ágaiból vízgőzdesztillációval állítják elő. Az illóolaj tiszta, könnyen mozgó, sárga vagy vörösbarna folyadék. Szaga jellegzetes, a fahéjaldehidre emlékeztető.

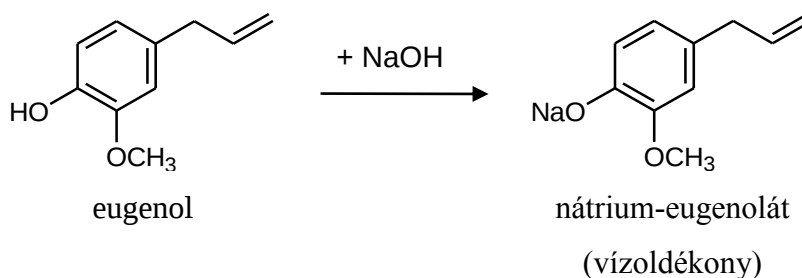
Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Caryophylli floris aetheroleum: eugenoltartalom meghatározása Cassia lombikban
2. Cinnamomi cassiae aetheroleum fahéjaldehidtartalmának meghatározása Cassia lombikban
3. Anisi fructus és Foeniculi dulcis fructus fenilpropán-származékainak rétegekromatográfiás vizsgálata

1. Caryophylli floris aetheroleum: eugenoltartalom meghatározása Cassia lombikban (Ph.Hg. VII. szerint)

5,00 ml illóolajat Cassia lombikba (nyaki részen beosztással ellátott 100 ml-es lombik) pipetázunk. A lombikot 4/5 részéig (~70 ml) megtöltjük 3%-os NaOH oldattal, majd a reakciókeveréket több ízben erősen összerázzuk, és vízfürdőn melegítjük mindaddig, amíg a reakcióban részt nem vett illóolajrészlet a folyadék felszínén összegyűlve a vizes fázistól elválk. Ezután a lombikot lehűtve 3%-os NaOH oldattal olyan módon töltjük fel, hogy az elkülönült olaj térfogata könnyen leolvasható legyen (a lombik nyaki részébe emelkedjen fel). A feltöltés és 20 °C-ra történt lehűtés után a maradék térfogatot leolvassuk.

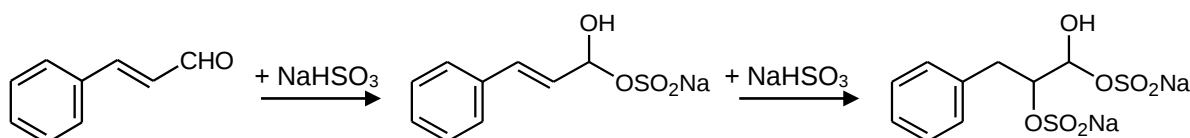
Az elkülönült illóolaj térfogatát a vizsgálatra bemért illóolaj térfogatából levonva és ezt 100 ml-re vonatkoztatva az illóolaj %(V/V)-ban kifejezett eugenol tartalmát kapjuk.



45. ábra Caryophylli aetheroleum eugenoltartalmának meghatározása

2. Cinnamomi cassiae aetheroleum fahéjaldehydtartalmának meghatározása Cassia lombikban (Ph.Hg. VII. szerint)

Ismert hőmérsékletű illóolaj 5,0 ml-ét Cassia lombikba pipetázzuk, 10 ml 30%-os NaHSO_3 oldattal elegyítjük. A lombik tartalmát összerázzuk, és a lombikot forró vízfürdőbe mártva addig melegítjük, míg a kezdetben levált csapadék fel nem oldódik. Ezután további 10 ml 30%-os NaHSO_3 -ot öntve a reakcióelegyhez, ugyanolyan módon járunk el. Ezt az eljárást további 10,0 ml 30%-os NaHSO_3 oldattal addig ismételjük, míg a reakcióelegyből csapadék már nem válik ki. A lombikot a nyaki rész beosztásának alsó jeléig 30%-os NaHSO_3 oldattal feltöltve vízfürdőn addig melegítjük, míg tartalma két fázisra nem különül el. A lombikot szobahőmérsékletre hűtjük, s tartalmát 30%-os NaHSO_3 oldattal oly módon töltjük fel, hogy az elkülönült illóolaj térfogata leolvasható legyen. Az elkülönült illóolaj térfogatát a vizsgálatra bemért illóolaj térfogatából levonva, majd ezt 100 ml-re vonatkoztatva kapjuk az illóolaj % (V/V)-ban kifejezett aldehydtartalmát.



fahéjaldehyd

46. ábra Cinnamomi cassiae aetheroleum fahéjaldehyd-tartalmának meghatározása

3. Anisi fructus és Foeniculi dulcis fructus fenilpropán-származékainak rétegekromatográfiás vizsgálata

Kivonat készítése: 1 g frissen porított drogból 5 ml kloroformmal szobahőmérsékleten 10 perces rázogatással kivonatot készítünk, majd ezt megszűrjük.

Réteg: szilikagél lemez

Startpontok:	1. Anisi fructus kivonat	40 μl
	2. 0,1% Ánizsaldehyd teszt	20 μl
	3. Foeniculi dulcis fructus kivonat	40 μl

Kifejlesztő elegy: *n*-hexán – etil-acetát 8 : 2

Detektálás: DNPH (2,4-dinitrofenil hidrazin) reagens

Ellenőrző kérdések

- Hogyan határozzuk meg a Caryophylli aetheroleum eugenoltartalmát?
- Hogyan határozzuk meg a Cinnamomi cassiae aetheroleum fahéjaldehyd-tartalmát?
- Mit tapasztalunk az Anisi fructus és Foeniculi dulcis fructus rétegekromatográfiás vizsgálata során?

3.6. Iridoidokat, keserűanyagot tartalmazó drogok vizsgálata

Absinthii herba (fehér üröm leveles vagy virágos hajtás)

Artemisia absinthium (Asteraceae)

A drog a fehér üröm egész, vagy aprított, szárított töleveleiből, vagy a virágzáskor gyűjtött, szárított felsőbb hajtásrészeiből és lombleveleiből, illetve ezek keverékéből áll. Szárított drogra vonatkoztatott illóolaj-tartalma legalább 2 ml/kg.

A levelek színe szürkéstől zöldesig változik, mindkét felszínen sűrű, molyhosan szőrösek. Hosszúnyelű tölevelei két-háromszorosán szárnyasan szeldeltek, a levélszeletek kerekdedtől lándzsásig, a levelek alakja háromszögletűtől tojásdadig terjed. A szárlevelek kevésbé tagoltak, a felsőbb levelek lándzsásak. A szár virágokat viselő része zöldesszürke, molyhos, legfeljebb 2,5 mm vastag, és rajta hosszanti irányban általában öt lapos borda fut. A lándzsás, kissé tagolt levelek szintjében figyelhetők meg laza füzéres bugában a gömb, vagy félgömb alakú fészekvirágzatok. Ezek átmérője 2-4 mm, a fészekörv szürke, molyhos, a külső fészekpikkelyek hegyes lándzsásak, a belsők tojásdadok, csúcsuk tompa, szélük hártyás; a pelyvaszőrök hossza 1 mm, vagy e feletti; közöttük számos, körülbelül 2 mm hosszú hímnős csöves virág és néhány sugárvirág látható.

A porított drog zöldesszürke színű. Mikroszkóp alatt vizsgálva, a porkészítményben számos T-alakú fedőszőr látható, melyek 1-5 kicsiny sejtből felépülő egysoros nyaki részből és ezen kalapácsfejszerűen elhelyezkedő egyetlen, hosszú, hullámos falú és két végén kihegyezett végsejtből állnak; kissé, vagy erősen hullámos falú sejteket tartalmazó epidermisz-darabok figyelhetők meg anomocitikus sztómaapparátussal valamint mirigyszőrökkel, melyek rövid, kétsoros, kétsejtes nyaki részből és kétsoros, két- vagy négysejtű feji részből épülnek fel. A csöves és a nyelvcsöves virágok töredékeinek némelyike apró kalcium-oxalát kristályokat tartalmaz. A nagy számban jelen lévő pelyvaszőrökre jellemző, hogy egy talpsejtből és egyetlen, nagyon hosszú (1-1,5 mm), szalagszerűen megnyúlt, vékonyfalú végsejtből állnak. Kerekded, körülbelül 30 µm átmérőjű virágporszemek figyelhetők meg, melyeket finoman érdes felületű exime és 3 csírapapu jellemez. Megtalálhatók a szárból származó rostkötegek, a mérsékelten, gödörkésen vastagodott falú parenchimasejtek, illetve szállítószöveti edények, melyek közül a vékonyak spirális és gyűrűs sejtfalvastagodással rendelkeznek, a vastagok vermes-gödörkések.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Valerianae radix: valepotriátok kimutatása
2. Az Absinthii herba, Marrubii herba, Gentianae radix keserűértékének meghatározása

1. Valerianae radix: valepotriátok kimutatása

0,5 g drogot elporítunk, majd 5 perces rázogatással 5 ml kloroformmal kivonatot készítünk. A kivonatot porcelántálba szűrjük, vízfürdőn szárazra pároljuk. A maradékhoz 1 csepp tömény ecetsavat, majd 1 csepp tömény sósavat adunk.

2. Az Absinthii herba, Marrubii herba, Gentianae radix keserűértékének meghatározása

A keserűérték valamely vegyület, folyadék, vagy kivonat azon legnagyobb hígítása, amely még keserű ízű. Drogok esetén a keserűérték 1 g 105 °C-on szárított drogra vonatkoztatott vizes kivonatnak azon legnagyobb hígítását jelenti, amelynek 10 ml-s részlete a szájban fél perc alatt, főleg a nyelvgyök tájékán ide-oda mozgatva még éppen a keserű íz érzetét kelti. A kapott eredmény szubjektív adat, amelyet normalizálnunk kell, ezért meg kell határoznunk egy korrekciós faktort (szájfaktort). A száj keserűíz-érzékenységet a kinin-hidroklorid vizes oldatának különböző hígításaival állapítjuk meg. Így a keserű érték meghatározása a kinin-hidrokloriddal történő összehasonlításon alapul. (A kinin-hidrokloridra megadott keserűérték: 200 000.)

Korrekciós faktor (szájfaktor) meghatározása:

Alapoldat: 0,010 g R kinin-hidrokloridból csapvízzel 100,0 ml térfogatú oldatot készítünk.

Összehasonlító oldatok: az alapoldatból 10 000-es léptékkel haladva a következő hígítási sort készítjük el:

kinin-hidroklorid		csapvíz	hígítás
1 ml	+	9 ml	100 000
1 ml	+	10 ml	110 000
.	.	.	.
1 ml	+	19 ml	200 000

Azt a legkisebb koncentrációjú oldatot, amely már éppen keserű, a következő módon határozzuk meg (az ízlelést mindenkor a legnagyobb hígítású oldattal kezdjük): a leghígabb

összehasonlító oldat 10 ml-ét szájba vesszük és 30 másodpercen át az egyik oldalról a másikra mozgatjuk a nyelvgyök felett. Amennyiben az oldatot nem érezzük keserűnek, kiköpjük és 1 percig várakozunk. A szájat csapvízzel kiöblítjük. Az oldatok vizsgálatát a növekvő koncentráció sorrendjében mindaddig folytatjuk, amíg 10 ml-t a szánkba véve éppen a keserű íz érzetét nem kelti.

Az 1:200 000 hígítású sósavas kininoldat 10 ml-e az emberek döntő többségénél a keserűérték határa, tehát azt a hígítást jelenti, amelynél a sósavas kininoldatot még éppen keserűnek érzik. Saját értékünket erre az értékre vonatkoztatjuk, vagyis 200 000-et osztva az általunk megállapított hígítással kapjuk a szájfaktorunkat, amellyel megszorozva a droggal kapott keserűértéket, a drogot normalizálni tudjuk.

$$\text{Szájfaktor} = 200\,000 / \text{észlelt hígítás}$$

A minta előkészítése:

250 ml-es titrálólombikban 1,00 g mintához 100 ml forrásban lévő csapvizet adunk, majd 60 percen át 5 percenként körkörösén mozgatva kivonatot készítünk. Lehűtés és vékony vattarétegen végzett szűrést követően térfogatát 100,00 ml-es mérőlombikban csapvízzel 100,00 ml-re kiegészítjük. A törzsoldat hígítása 100.

Gentianae radix

Hígítási sor: 20 000–60 000 tartományban, 5000-es léptékkel

Marrubii herba

Hígítási sor: 2 000–12 000 tartományban, 1000-es léptékkel

Absinthii herba

Hígítási sor: 10 000–26 000 tartományban, 2000-es léptékkel

A szájfaktorral megszorozva az adott droggal kapott keserűértéket, kapjuk a drog normál keserűértékét.

Példák keserűérték meghatározásra:

I. 1,00 g porított *Absinthii herba*ból forró vízzel 100 ml kivonatot készítettünk. Kivettünk 5 ml kivonatot és 100 ml-re hígítottuk, majd ebből 1 ml-t vettünk ki és 12 ml-re hígítottuk, ezt éreztük keserűnek. A szájfaktor meghatározásánál a kininoldat 160 000-szeres hígításánál volt keserű.

1. Mennyi a szájfaktor?

2. Mennyi a drog normál keserűértéke?

1. Szájfaktor értéke:

$$\frac{200000}{160000} = 1,25$$

2. A példa szerint az *Absinthii herba*-ból 100× hígítást készítünk.

Ebből kiveszünk 5 ml-t és 100 ml-re hígítva 2000× hígítást kapunk (20×100)

<i>Absinthii herba</i> kivonat	csapvíz	keseűnek érzett hígítás
2000× hígítás		
1 ml	+ 11 ml	24000 (2000×12)

A drog normál keseűértéke: 1.25 (szájfaktor) × 24000 (hígítás) = 30 000

- 1,00 g porított *Gentianae radix*-ból forró vízzel 100 ml kivonatot készítettünk. Kivettünk 2 ml kivonatot és 100 ml-re hígítottuk, majd ebből 1 ml-t vettünk ki és 11 ml-re hígítottuk, ezt éreztük keseűnek. A szájfaktor meghatározásánál a kininoldat 160 000-szeres hígításánál volt keseű.

1. Mennyi a szájfaktor?
2. Mennyi a drog normál keseűértéke?

1. Szájfaktor értéke:

$$\frac{200000}{160000} = 1,25$$

2. A példa szerint a *Gentianae radix*-ból 100× hígítást készítünk.

Ebből kiveszünk 2 ml-t és 100 ml-re hígítva 5000× hígítást kapunk (50×100)

<i>Gentianae radix</i> kivonat	csapvíz	keseűnek érzett hígítás
5000× hígítás		
1 ml	+ 10 ml	55000 (5000×11)

A drog normál keseűértéke: 1.25 (szájfaktor) × 55000 (hígítás) = 68 750

- 1,00 g porított *Marrubii herba*-ból forró vízzel 100 ml kivonatot készítettünk. Kivettünk 10 ml kivonatot és 100 ml-re hígítottuk, majd ebből 2 ml-t vettünk ki és 10 ml-re hígítottuk, ezt éreztük keseűnek. A szájfaktor meghatározásánál a kininoldat 125 000-szeres hígításánál volt keseű.

1. Mennyi a szájfaktor?
2. Mennyi a drog normál keserűértéke?

1. Szájfaktor értéke:

$$\frac{200000}{125000} = 1,60$$

2. A példa szerint a *Marrubii herba*-ból 100x hígítást készítünk.

Ebből kiveszünk 10 ml-t és 100 ml-re hígítva 1000× hígítást kapunk (10×100)

<i>Marrubii herba</i> kivonat	csapvíz	keserűnek érzett hígítás
1000× hígítás		
2 ml	+ 8 ml	5000 (1000×5)

A drog normál keserűértéke: 1.60 (szájfaktor) × 5000 (hígítás) = 8 000

Ellenőrző kérdések Ezek nem kérdések!!

- Mely drogból és hogyan mutattuk ki a valepotriátokat?
- Keserűérték fogalma
- Keserűérték meghatározása
- Szájfaktor kiszámítása

3.7. Szaponintartalmú drogok vizsgálata

Primulae radix (kankalingyökér)

Primula veris, *P. elatior* (Primulaceae)

A drog a tavaszi kankalin, vagy a sugár (sudár) kankalin egész, vagy aprított, szárított gyökértörzse és gyökere. A drog keserű ízű.

A durván göcsörtös felszínű szürkésbarna gyökértörzs egyenes, vagy enyhén görbült, hossza 1-5 cm, vastagsága 2-4 mm. A gyökértörzs csúcsán gyakran megfigyelhetők a száraz és levelek maradványai. A gyökértörzshöz számos 1 mm vastag, 6-8 cm hosszú, merev gyökér kapcsolódik. A *P. elatior* gyökere világosbarna, ill. vörösesbarna, a *P. veris* gyökere világosbarna, ill. sárgásfehér színű. A drog törési felülete sima.

A porított drog színe szürkésbarna. Mikroszkóp alatt vizsgálva, a drogporban a gyökér kérgéből, a gyökértörzs kérgéből és bélszövetéből származó parenchima-töredékek láthatók, melyek kerekded, gödörkésen vastagodott falú sejtekből épülnek fel, gyökérszőröket viselő, a felszíni szövetekből származó barnás töredékek figyelhetők meg; az edények hálózatosan vastagodott falúak. Az erőteljesen gödörkésen vastagodott falú kö sejtek sárgászöld csoportja *P. elatior* jelenlétére utalnak. A drogporban változatos méretű és alakú, egyszerű, vagy összetett keményítőszemek láthatók.

Saponariae albae radix (fátyolvirág-gyökér)

Gypsophila paniculata (Caryophyllaceae)

A drog a buglyos fátyolvirág (magyar szappangyökér) élő növény hámozott, megszártított gyökere.

A gyökérből és rövid gyökértörzsből álló egész drog 4-8 cm vastag és 40-80 cm hosszú, néha csavarodott. A vastagabbakat 2-5 mm vastag ferde korongokra, a vékonyabbakat 3-6 cm hosszú darabokra vágva szárítják meg, és hozzák forgalomba. Kívül fehéres színű, belül halványsárga, és sugarasan repedezett. A koncentrikusan övezett fatestet barna kambium választja el a fehér színű kéregtől. A gondatlanul hámozott, parával borított darabok kívül sárgásbarnák, rajtuk harántgyűrűvé összefolyt, keresztben megnyúlt dudor, vagy maradványai láthatók.

Pora az orron át belélegezve tüsszentésre ingerel. Íze eleinte édeskés, később csípős, karcoló.

A hámozott drog külső szöveti állománya laza intercellulárisokat tartalmazó parenchimából épül fel, melyek sejtjei vékony falúak és elszórtan nagy, buzogányfej alakú kalcium-oxalát

kristályokat tartalmaznak. E parenchimatól befelé sugarasan váltakozva, tölcészerűen kiszélesedő bélsugar és kúpszerű háncssugarak helyezkednek el.

A háncssugarakban vékony falú háncsparenchima, rostacsövek és kíséresejtek találhatók. A bélsugar sejtjeiben olykor 80 µm átmérőjű, buzogányfej alakú kalcium-oxalát kristályok helyezkednek el. A háncstest 1-3 sejtsoros kambiumgyűrű, majd a fatest követi. Mind a fiatal, mind az idősebb fatestben a többnyire 3-5 sejt széles bélsugarak nagyobb sejtű, vékony falú parenchimából állnak, és számos buzogányfej alakú kalcium-oxalát kristályt tartalmaznak. A fatest sugaras szerkezetű. Az idősebb gyökér fatestében, különösen a kambiumhoz közelebb fekvő részében az alapállomány szklerenchimás, a középpont szomszédságában pedig parenchimás. A tracheális elemek különböző átmérőjűek, rendszerint rostok határolják. Ezek gyakran kettesével, vagy többesével csoportokat alkotnak. A bélszövet közepén az összenyomott egyszerű fanyalábok láthatók.

A porított drog szürkésfehér színű. A drogporban – mikroszkóp alatt vizsgálva – buzogányfej alakú kalcium-oxalát kristályokat, parenchima részleteket, edénytöredékeket, idősebb gyökér esetében tracheális rostrészleteket is láthatunk.

Hederae folium (borostyánlevél)

Hedera helix (Araliaceae)

A drog a közönséges borostyán tavasszal gyűjtött, megszáritott, egész, vagy aprított levele. A gyógyszerkönyvi minőségű drog legalább 3,0% hederakozid C-t tartalmaz (száritott drogra).

A levelek bőrneműek, ép szélűek, szíves vállúak, méretük 4–10 cm. A levéllemez tenyeresen 3–5 karéjú, a karéjok többé-kevésbé háromszögletesek. A levelek színi oldala sötétzöld, a sugarasan szétágazó erezet közelében világosabb árnyalatú; fonáki oldaluk szürkészöld, jól láthatóan kidomborodó erezzel. A levélnyel hosszú, hengeres, 2 mm átmérőjű, hosszában barázdált. A levélnyélen és a fiatal levelek felszínén elszórtan fehér szőrök találhatók, az idősebb levelek kopaszak. Alkalmanként előfordulnak ép, tojásdad, vagy lándzsás, 3–8 cm nagyságú levelek is, melyek a virágzatok közeléből származnak.

A porított drog zöld színű. Mikroszkóp alatt vizsgálva a következő ismertetőjegyek láthatók: a levéllemez töredékeinek színi, és fonáki oldalán lévő epidermisz sejtek antiklinális fala megvastagodott, kanyargós-hullámos, felszínüket vastag kutikula borítja. Gázcserenyílasok nagyobb számban csak a fonáki oldalon fordulnak elő, főleg anomocitikus, ritkán anizocitikus szerkezetűek, melléksejtjeik közül néhánynak felszínén a kutikula alig láthatóan barázdált. Elszórtan előfordulhatnak 4-8 egysejtű ággal rendelkező csillagszőrök. A levéldarabok

keresztmetszetén 1-3 (általában 2) réteg vastagságban oszlopos paliszád sejtekből, és nagy sejt közötti járatokkal rendelkező szivacsos parenchimából álló mezofillum figyelhető meg, melyben nagyméretű nyálkatartó sejtek találhatók. A mezofillumban 40 µm nagyságú kalcium-oxalát rozettakristályok fordulnak elő. Láthatók az erezetből származó, fásodott falú szállítószöveti elemek is.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Szaponinok kimutatása Liebermann-Burchard-reakcióval
2. Hederae folium rétegekromatográfiás vizsgálata
3. Liquiritiae radix rétegekromatográfiás vizsgálata

1. Szaponinok kimutatása **Liebermann-Burchard-reakcióval**

Saponariae albae radix, Primulae radix esetén

0,5 g drogport 5 ml kloroformmal kivonunk, majd a kivonatot szűrőpapíron át porcelántálba szűrjük. Az oldószert vízfürdőn elpárologva, a maradékot 2 ml tömény ecetsavban oldjuk, és óvatosan kémcsőben lévő, kb. 5 ml tömény kénsavra rétegezzük. 1-2 perc múlva figyeljük meg, mi történik a két folyadék érintkezési felületén!

2. Hederae folium rétegekromatográfiás vizsgálata

1,5 g friss, ill. 0,5 g 50 °C-on szárított borostyánlevélből 15, ill. 5 ml 70%-os metanollal 10 perces melegítéssel kivonatot készítünk. A kivonatot metanollal megnedvesített papírszűrőn szűrjük, porcelántálban szárazra pároljuk, majd 1 ml metanolban oldjuk. A rétegekromatográfiás ellenőrzést gyári szilikagél lemezen végezzük.

Startpontok

- | | |
|---|-------|
| 1. 0,1%-os α-hederin teszt | 20 µl |
| 2. metanolos kivonat (friss drogból) | 10 µl |
| 3. metanolos kivonat (50 °C-on szárított drogból) | 10 µl |
| 4. 0,1%-os hederaszaponin C teszt | 20 µl |

Kifejlesztőelegy: Kloroform – metanol – víz 64 : 30 : 5

Detektálás: a szobahőmérsékleten megszáritott kromatogramot R-vanillin-kénsav reagenssel bepermetezzük, majd 5 percig 105 °C-on hevítjük.

3. *Liquiritiae radix* rétegekromatográfiás vizsgálata

1 g porított édesgyökeret 20 ml metanollal 10 perc rázogatással kivonunk. A kivonatot metanollal megnedvesített papírszűrőn szűrjük. A kivonat 2 ml-es részletét rétegekromatográfiás vizsgálathoz szárazra pároljuk, majd 1 ml metanolban oldjuk, és ebből viszünk fel a rétegre. A maradék kivonatot 10 ml R sósavval 1 órán át hidrolizáljuk vízfürdőn Erlenmeyer-lombikban, a lombik szájába üveg-tölcsért helyezve. A hidrolizátumot szobahőmérsékletre hűtjük, ezután 2×10 ml etil-acetáttal óvatosan kirázzuk (emulzióképződés veszélye!). Az egyesített szerves fázisokat 2×10 ml vízzel savmentesre mossuk rázó-tölcsérben történő kirázással, majd szárított nátrium-szulfáttal Erlenmeyer-lombikban vízmentesítjük, és porcelántálban szárazra pároljuk. A maradékot 2 ml metanolban oldjuk. A rétegekromatográfiás ellenőrzést szilikagél lemezen végezzük.

Startpontok:

- | | |
|---|------------|
| 1. metanolos kivonat (hidrolizálás előtt) | 40 μ l |
| 2. 0,1%-os glicirretinsav-teszt | 40 μ l |
| 3. hidrolizátium | 20 μ l |

Kifejlesztőelegy: Kloroform – metanol 95 : 5

Detektálás: UV fény (254 nm)

Ellenőrző kérdések

- Mely vegyületek kimutatására szolgál a Liebermann-Burchard-reakció?
- Mely drogból és hogyan végezzük Liebermann-Burchard-reakciót?
- Mi játszódik le a *Liquiritiae radix* kivonatának hidrolízise során?

3.8. Szívreható glikozidokat tartalmazó drogok vizsgálata

Digitalis lanatae folium (gyapjas gyűszűvirág levél)

Digitalis lanata (Scrophulariaceae)

A drogot a gyapjas gyűszűvirág tőlevelei és virágzás előtt gyűjtött szárlevelei szolgáltatják. A drog szagtalan, íze keserű.

A tőlevelek 15-20 cm hosszúak, 2-3,5 cm szélesek, alsó részükön levélnyélszerűen elkeskenyednek. A levél széle a csúcs felé gyakran gyengén fogazott. A keskenyebb részek szélén gyéren szőröket találunk, egyébként a levelek csupaszok. A szárlevelek hosszúkás lándzsa alakúak, az alsók a levélnyélben elkeskenyednek, a felsők üllők, 8-12 cm hosszúak, 1-2 cm szélesek, többnyire épek, kihegyezettek. Erős főerük és rendszerint két erősebb mellékerük van; az erezet ívesen felfelé hajló, helyenként párhuzamos.

Mikroszkóposan vizsgálva felülnézetben az epidermiszsejtek egy része hullámos falú, más része sokszögletű, az erek feletti epidermiszsejtek megnyúltak. Az oldalfalak megvastagodottak és gödörkések. Sztómák az alsó és felső epidermiszen is vannak, melléksejtek nincsenek. Az érzugokban egy-egy mirigyszőrt is találunk, amely egy nyélből és egy- vagy kétsejtű fejecskéből áll. Keresztmetszetben az epidermiszsejtek izodiametrikusak; a sztómák kissé kiemelkednek. A mezofillum palizádparenchimája 3-4 sejtsoros, szivacsos parenchimája szorosan illeszkedő izodiametrikus sejtekből áll. A szállítószövet edényei spirálisan és gyűrűsen vastagodottak. A bordák ék alakban kiemelkedettek, alattuk a mezofillum közepe az epidermisztől gyakran elválk.

A porított drog világoszöld színű. Mikroszkóposan vizsgálva a porított drogban az epidermisz töredékek radiális gödörkézettsége feltűnő. Ritkán fejes mirigyszőröket találhatunk. Kristályok, szklerenchimatikus elemek nincsenek. A szivacsos és palizádparenchima aránylag tömött.

Oleandri folium (leanderlevél)

Nerium oleander (Apocynaceae)

A drog a leander megszárított levelei. A drog szagtalan, kellemetlen, keserű ízű. A levelek keskeny, lándzsa alakúak, bőr neműek és ép szélűek. Hosszuk 10-15 cm, szélességük 1-2 cm, rövidnyelűek, a levelek nyélre keskenyedők. A főér a fonákon erősen kiemelkedik, a számos, párhuzamos mellékér viszont alig.

A drog mikroszkópos vizsgálata során sokszögletű (poligonális) felső és alsó epidermisz sejtek és a felső epidermiszen ritkán egysejtű szőrök láthatók. Keresztmetszeten mindkét oldalon 2-3-soros, színtelen sejtekből álló hipodermisz látható. A palizádréteg három soros. A levél fonákán gömbölyű üregek figyelhetők meg, amelyeknek fala egysejtű, sima felületű, görbült szőrökből áll. Sztómák csak ezekben az üregekben vannak. A mezofillumban kalcium-oxalát rozettákat tartalmaznak az egyes sejtek.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Digitalis purpureae folium, Digitalis lanatae folium, Oleandri folium: szívre ható glikozidok kimutatása
 - 1.1 Keller-Kiliani-reakció
 - 1.2 Baljet-reakció
 - 1.3 Kedde-reakció
2. Digitalis lanatae folium rétegekromatográfiás vizsgálata

1. Digitalis purpureae folium, Digitalis lanatae folium, Oleandri folium: szívre ható glikozidok kimutatása

1.1 Keller-Kiliani-reakció:

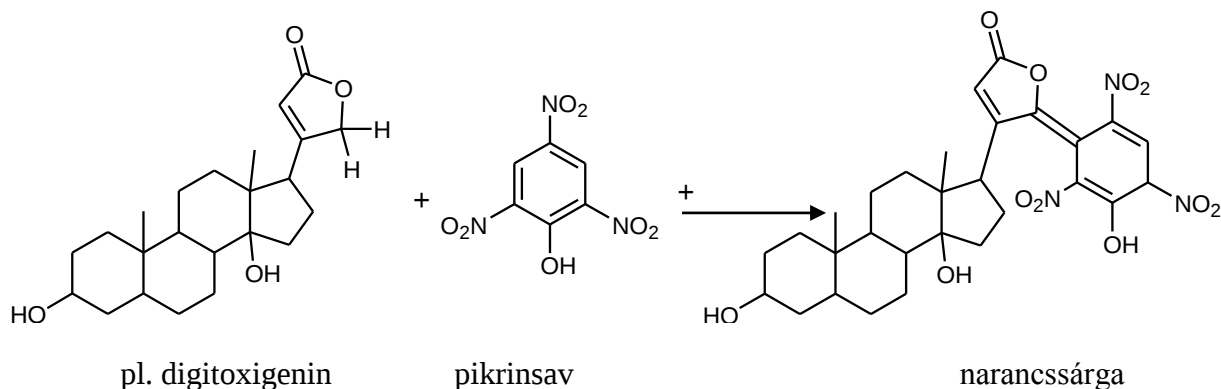
0,5 g (*Digitalis* sp.), illetve 0,3 g (*Nerium oleander*) drogot 5 ml vízzel Erlenmeyer-lombikban átnedvesítünk, majd 5 ml forrásban lévő vizet öntünk hozzá. Időnként rázogatójuk, majd 20 perc múlva vattán át rázótölcsérbe szűrjük, és 2×10 ml kloroformmal kirázzuk. A kloroformos fázisokat porcelántálban egyesítjük, vízfürdőn szárazra pároljuk. A maradékot 3 ml jégecetben (cc. ecetsav) oldjuk, hozzáadunk 1 csepp FeCl_3 -oldatot. Az oldatot kémcsőben 5 ml tömény kénsavra rétegezzük. -2 perc múlva figyeljük meg, mi történik a két folyadék érintkezési felületén!

1.2 Baljet-reakció:

0,5 g (*Digitalis* sp.), illetve 0,3 g (*Nerium oleander*) drogot 10 ml vízzel telített etil-acetáttal 15 percen át rázogatóva kivonunk. A kivonatot vattán át porcelántálba szűrjük, vízfürdőn szárazra pároljuk. A bepárlási maradékot 2 ml vízben oldjuk (A oldat).

1. kémcső 3,5 ml Baljet-reagens (3 ml 1%-os pikrinsav + 0,5 ml 10%-os NaOH oldat)
2. kémcső: 3,5 ml Baljet-reagens + 0,5 ml A oldat
3. kémcső: 3,5 ml Baljet-reagens + 1,5 ml A oldat

Néhány perc után hasonlítsuk össze a 2. és a 3. kémcső tartalmának színét az 1. kémcső tartalmának színével!



47. ábra Kardenolidok kimutatása Baljet-reakcióval

1.3 Kedde-reakció:

0,5 g (*Digitalis* sp.), illetve 0,3 g (*Nerium oleander*) drogot 10 ml vízzel telített etil-acetáttal 15 percen át rázogatunk. A kivonatot vattán át porcelántálba szűrjük, vízfürdőn szárazra pároljuk. A bepárlási maradékot 2 ml vízben oldjuk és kémcsőbe öntjük. Az oldathoz 2 ml, etanollal készült 1%-os 3,5-dinitro-benzoészav oldatot, majd 2 ml KOH-oldatot adunk.

2. *Digitalis lanatae folium* rétegekromatográfiás vizsgálata

Kivonat készítés: 1,0 g drogot 10 ml 50%-os metanol és 5 ml 10%-os ólom-acetát oldat elegyével vízfürdőn Erlenmeyer-lombikban 10 perces melegítéssel kivonunk. A melegítés során a lombikot üvegtölcsérrel lefedjük. A kivonatot lehűtjük, rázótölcsérbe szűrjük, 2 × 10 ml kloroformmal kirázzuk. A kloroformas fázisokat porcelántálban egyesítjük, vízfürdőn szárazra pároljuk. A bepárlási maradékot kloroform–metanol 1:1 arányú elegyének 1 ml-ében oldjuk.

Réteg: szilikagél lemez

Startpontok: 1. 0,1%-os digitoxin teszt 20 µl
2. 0,1%-os digoxin teszt 20 µl
3. Digitalis lanatae folium kivonat 80 µl
4. 0,1%-os lanatozid A teszt 20 µl

Kifejlesztés: Etil-acetát – metanol – cc. ammónia 85 : 10 : 5

Előhívás: Bepermetezés 3,5-dinitro-benzoésav 1%-os oldatával, majd száradás (105 °C-on) után kálium-hidroxid 5%-os alkoholos oldatával.

Ellenőrző kérdések

- Milyen vegyületeket kimutatására alkalmas a Keller-Kiliani-reakció?
- Mely drogból és hogyan végezzük a Keller-Kiliani-reakciót?
- Milyen vegyületeket kimutatására alkalmas a Baljet-reakció?
- Mely drogból és hogyan végezzük a Baljet-reakciót?
- Milyen vegyületeket kimutatására alkalmas a Kedde-reakció?
- Mely drogból és hogyan végezzük a Kedde-reakciót?
- Milyen szívreható glikozidokat észlelt a Digitalis lanatae folium kivonatában?

3.9. Triterpéneket tartalmazó drogok vizsgálata

Calendulae flos (körömvirág)

Calendula officinalis (Asteraceae)

A drog a körömvirág teltvirágú fajtáinak a virágzati vacokról leválasztott, egész vagy aprított, szárított, teljesen kinyílt virága. A hiperozidban kifejezett és a szárított drogra vonatkoztatott flavonoid tartalma legalább 0,4%.

A nyelves (sugar) virágok egyrészt a sárga, vagy narancsszínű, körülbelül 3–5 mm széles, és a középső részén körülbelül 7 mm-es, három cimpájú, nyelvyszerű részből, másrészt a szőrös, részben sarló alakú, sárgásbarna-narancsosbarna pártacsóból állnak, ez utóbbi folytatódik a termővel. Utóbbi görbült, sárgásbarna-narancsosbarna magházból, kinyúló bibeszálból és kétágú bibéből áll. Mintegy 5 mm hosszú csöves virágok is jelen vannak, melyeket a sárga, narancsospiros vagy pirosaslila, öt cimpájú pártakarima, a sárgásbarna vagy narancsosbarna, alsó részén szőrös pártacsó, és a legtöbbször részben hajlott, sárgásbarna-narancsosbarna színű termő alkot.

Az elporított drogpor színe sárgásbarna. A drogport mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldatban vizsgálva, benne a párta töredékei láthatók, melyeket világossárga olajcseppek, igen nagy anomocitikus sztómaapparátusok, valamint kalcium-oxalát oszlop- és igen kicsiny rozetta-kristályok jellemeznek. Kétsoros, többsejtes és kúpos fedőszőrök, illetve egy- vagy kétsoros, többsejtes kétsoros nyaki részből, és nagy, tojásdad, kétsoros és soksejtű feji részből felépülő mirigyszőrök is megfigyelhetők. Gömbölyű virágporszemek láthatók még, melyek átmérője legfeljebb 40 µm, hegyesen csapos exinével, és három csírapuval rendelkeznek. Ritkán a bibék darabjai is előtűnnek, melyek rövid, bunkós végű papillákat viselnek.

Urticae folium (csalánlevél)

Urtica dioica (Urticaceae)

A drog a nagy csalán – *Urtica dioica*, illetve az apró csalán – *Urtica urens* egész vagy aprított, szárított leveleiből, illetve a két fajból származó levelek keverékéből áll. A drog kaffeoil-almasav és klorogénsav tartalmának együttes mennyisége klorogénsavban kifejezve és a szárított drogra vonatkoztatva legalább 0,3%.

A levelek színi oldala sötétzöld, sötét szürkészöld, vagy barnászöld színű, fonáki oldala világosabb árnyalatú. Csalánszőrök szórtan a levelek mindkét oldalán megtalálhatók. Kisebb

méretű fedőszőrök nagyobb számban a levelek szélén, és a fonáki oldalon az erek mentén fordulnak elő. A levéllemez kifejezetten ráncos, tojásdad vagy hosszúkás. A nagy csalán levelei 100 mm hosszúak és 50 mm szélesek, szélük durván fűrészes; válluk szíves, vagy lekerekített. Erezetük hálózatos, a fonáki oldalon határozottan kidomborodó. A levélnyél zöld vagy barnászöld színű, hengeres, vagy lapított, kb. 1 mm vastag, hosszában barázdált, csavarodott; csalánszőrökkel és fedőszőrökkel fedett.

A porított drog zöld, vagy szürkészöld színű. A drogot mikroszkóp alatt vizsgálva a következő szövettani ismertetőjegyek láthatók: egysejtű csalánszőrök, melyek legfeljebb 2 mm-esek, egy megnyúlt, kihegyesedő sejtből állnak, melynek csúcsa kissé duzzadt, kiszélesedett, és könnyen letörni képes. Alapi részük soksejtű, kiemelkedő szövetpárnában (emergencia) ül. Előfordulnak még egysejtű, egyenes, vagy kissé görbült fedőszőrök, melyek 700 μm hosszúak, alapjuknál kiszélesedők, valamint kisméretű mirigyszőrök (35-65 μm) 1, vagy 2 sejtből álló nyéllel, és 2, vagy 4 sejtű fejjel. Az apró levéltöredékeken helyenként kanyargós, hullámos falú epidermiszsejtek láthatók, anomocitikus stómaapparátusokkal. Nagy számban fordulnak elő csisztolitok, melyek sűrű szemcséjű kalcium-karbomát kristály aggregátumok. A szivacsos parenchimában kalcium-oxalát kristályok kis csoportja is található, illetve alkalmanként a szárból származó, vermes gödörkés vastagodású edények kis csoportjai láthatók.

Urticae radix (csalángyökér)

Urtica dioica (Urticaceae)

A drog a nagy csalán illetve az apró csalán, vagy ezek hibridjeinek földalatti részeiből származó egész, vagy törmelék szárított részei.

Szabálytalan, henger alakú rizóma, szürkésbarna, elszórtan bíbor vagy zöldes színű, 3-10 mm átmérőjű, az ízközök legfeljebb 2-3 cm hosszúak, mély hosszanti barázdákkal, melyek között rövid, enyhén duzzadt csomók vannak. A csomók számos gyökeret viselnek, melyek kívül szürkésbarnák, 0,5-2 mm átmérőjűek, és legfeljebb 10 cm hosszúak. Keresztmetszetben vékony, sötét kérgű, belül krémfehér színű mélyedő középső résszel. A rizóma törése rostos és egyenetlen, különösen a belső résznél.

A drogpor halvány sárgásbarna. Mikroszkóp alatt, R-klorál-hidrát-oldatban vizsgálva, benne a következő diagnosztikus jegyek figyelhetők meg: barnás színű paratöredékek vékony falú sejtekkel. Az edénynyalábok töredékei szegélyezett gödrökkel, 50-150 μm átmérőjűek. A fásodott falú rostok töredékei vastagok, magányosan, vagy csoportosan fordulnak elő. A

parenchima sok töredéke látszik vékony falú sejtekkel, melyek közül néhány nagyméretű kalcium-oxalát fürtkristályokat, illetve ritkábban szórtan egyszerű kalcium-oxalát kristályokat hordoz. A bélsugár töredékei enyhén vastagodott, gödörkés sejtekkel bírnak.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Hippocastani semen rétegekromatográfiás vizsgálata
2. Calendulae flos rétegekromatográfiás vizsgálata
3. Urticae radix β -szitoszterintartalmának meghatározása denzitometriával

1. Hippocastani semen rétegekromatográfiás vizsgálata

1 g drogot 7,5 ml 70%-os metanollal tíz percig vízfürdőn melegítve kivonunk. A kivonatot porcelántálba szűrjük, szárazra pároljuk, majd a száraz maradékot 1 ml metanolban oldjuk.

Réteg: Szilikagél lemez

Startpontok: 1. Hippocastani semen kivonata 20 μ l

2. 0,1% eszcin teszt 10 μ l

Kifejlesztőelegy: etil-acetát – izopropanol – ecetsav – víz 30 : 25 : 5 : 15)

Előhívás: vanillin-kénsav reagens és 105 °C-on történő hevítés

2. Calendulae flos rétegekromatográfiás vizsgálata

0,5 g szíromlevelet 10 ml kloroformmal 15 perc rázogatással kivonunk. A kivonatot porcelántálba szűrjük, szárazra pároljuk, majd a száraz maradékot 1 ml metanolban oldjuk.

Startpontok: 1. Calendulae flos kivonata 40 μ l

2. 0,1% faradiol teszt 30 μ l

Kifejlesztőelegy: *n*-hexán – aceton 8 : 2

Előhívás: vanillin-kénsav reagens és 105 °C-on történő hevítés

3. Urticae radix β -szitoszterintartalmának meghatározása denzitometriával

A gyakorlat célja csalángyökér β -szitoszterintartalmának meghatározása denzitometriával. A mennyiségi méréshez szükséges kalibráló oldatsorozat elkészítését asztalonként csoportosan kell elvégezni.

1. Mintaelőkészítés

1,00 g darált drogot analitikai mérlegen kimérünk, és 10 ml metanollal ultrahangos vízfürdőben 10 percig extraháljuk. A kapott kivonatot szűrőpapíron porcelántálba szűrjük, a főzőpoharat 1 ml metanollal átmossuk, végül a teljes szűrletet vízfürdőn bepároljuk. A bepárlási maradékot (pipettával mért) 2,00 ml metanolban visszaoldjuk. (A visszaoldást közvetlenül a minta lemezre való felvitele előtt végezzük, kizárólag már kihűlt porcelántálban!) A mintából Hagedorn-pipetta segítségével 10 µl-t kell felvinni a lemezre. (Ajánlatos a 10 µl-t kétszer 5 µl-es részletben felvinni!)

Rögzítendő adat: bemért minta tömege (g)

2. Kalibráció

A kalibrációhoz szükséges β -szitoszterin-törzsoldatot (STD; pontos koncentrációja a lombikon lesz feltüntetve) a gyakorlaton készen kapja. Ebből az oldatból kell készíteni mikropipetta segítségével egy ötszörös (STD5x) és egy tízszeres (STD10x) metanolos hígítást a kiadott zárható mintatartó üvegekbe (200 µl STD + 800 µl metanol valamint 100 µl STD + 900 µl metanol). Ezekből az oldatokból, illetve a kivonatból Hagedorn-pipetta segítségével a következő térfogatokat kell felvinni a lemezre:

- STD10x: 5 µl
- STD10x: 10 µl ($2 \times 5 \mu\text{l}$)
- STD5x: 10 µl ($2 \times 5 \mu\text{l}$)
- STD: 5 µl
- csalángyökér-kivonat: 10 µl ($2 \times 5 \mu\text{l}$)

Rögzítendő adat: β -szitoszterin-törzsoldat koncentrációja (µg/µl)

3. A lemez kifejlesztése és előhívása

A kész lemezt (amelyen 4 kalibráló pont és annyi minta pont van, ahány hallgató dolgozott az asztalnál) toluol – etilacetát 7:3 arányú elegyében kell kifejleszteni.

Előhívás: MeOH + 10%(V/V) H₂SO₄ elegybe történő mártás, majd 1 perc szárítás 110 °C-on

4. Kiértékelés

Az előhívott lemezt a gyakorlatvezető segítségével le kell fényképezni és a fényképet a CP Atlas nevű programmal kiértékelni.

Rögzítendő adatok

Minta	c (µg/µl)	V (µl)	m β -szitoszterin (µg)	Csúcs alatti terület
STD10x				
STD10x				
STD5x				
STD				
kivonat	-		ismeretlen	

5. Beadandó adatok, eredmények

- kalibrációs egyenes grafikonja
- a csalángyökér β -szitoszterin tartalma %(m/m)-ban (µg/g)

3.10. Antranoidtartalmú drogok vizsgálata

Frangulae cortex (kutyabengekéreg)

Rhamnus frangula (syn. *Frangula alnus*) (Rhamnaceae)

A drogot a kutyabenge törzsének és ágainak megszáritott, egész, vagy aprított kérgé képezi. Legalább 7% glükofrangulint tartalmaz.

A drog hajlított, majdnem sík, vagy görbült, illetve egyszerű, vagy kettős csövecskéhez hasonló, 0,5-2 mm vastag, különböző hosszúságú és átmérőjű kéregdarabokból áll. A kéreg szürkésbarna-sötétbarna színű, hosszan ráncolt, külső oldalán számos szürkés színű, keresztirányban húzódó, hosszúkás lenticella látható. A felületi réteg eltávolítása után egy meggypiros réteg válik láthatóvá. A lúgok hatására vörösre színeződő vörösbarna színű belső oldal sima felszínű, hosszában sávozott. Törése tömör, belső része rostos.

A drogpor sárga-vörösbarna színű. Mikroszkóp alatt R klorál-hidrát-oldatban vizsgálva, benne számos kalcium-oxalát oszlopkristályt tartalmazó sejtréteggel kísért fásodott hancsrostköteg; paraszövet vörösbarna töredékei; kalcium-oxalát rozettákat tartalmazó parenchimatöredékek láthatók. Kö sejtek nincsenek jelen.

Aloe barbadensis (orvosi aloé)

Aloe barbadensis (Liliaceae)

A drog az *Aloe barbadensis* leveleiből kinyert, betöményített és szárított sejtnedv. Szárított drogra vonatkoztatott, barbaloinban kifejezett hidroxiantracén-származék tartalma legalább 28%.

A drog kissé fényes, vagy opálos, sötétbarna anyag, mely kagylós törésű, vagy barna por. Forró alkoholban oldódik, forrásban lévő vízben részben oldódik, éterben gyakorlatilag oldhatatlan.

Aloe capensis (tövises aloé)

Aloe ferox (Liliaceae)

A drog különböző *Aloe* fajok – főleg *Aloe ferox* és hibridjei – leveleiből kinyert, betöményített és szárított sejtnedv. Szárított drogra vonatkoztatott, barbaloinban kifejezett hidroxiantracén-származék tartalma legalább 18%.

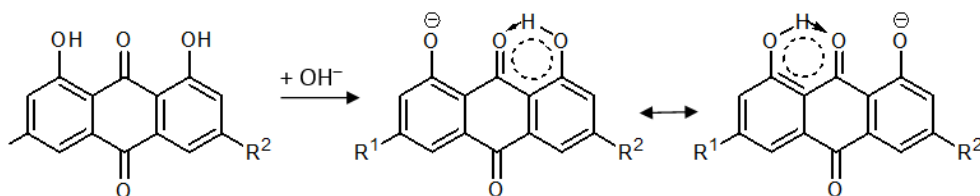
A drog zöldes árnyalatú sötétbarna anyag, mely fényes, kagylós törési felszínnel rendelkezik. Lehet zöldesbarna por is. Forró alkoholban oldódik, forrásban lévő vízben részben oldódik.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Antranoidok kimutatása Bornträger-reakcióval (Frangulae cortex, Rhei rhizoma, Sennae folium, aloé)
2. Szabad antranoidok, antranoid-O-glikozidok és antranoid-C-glikozidok kimutatása (aloé, szenna)
3. Barbaloin kimutatása Schouteten-reakcióval (aloé)
4. Aloe barbadensis és Aloe capensis megkülönböztetése (Rosenthaler-reakció)
5. Frangulae cortex antrakinon-származékainak gélkromatográfiás elválasztása

1. Antranoidok kimutatása Bornträger-reakcióval

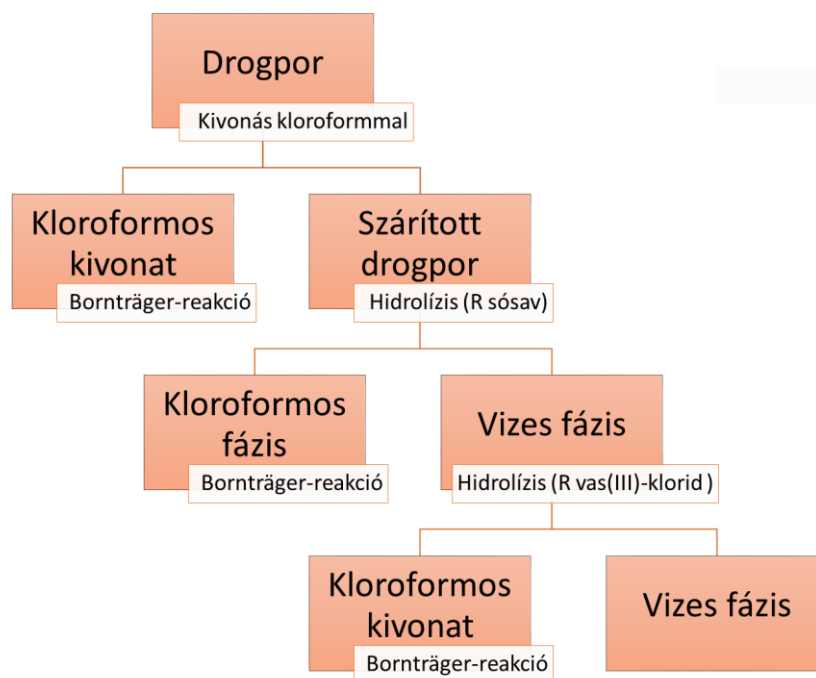
0,5 g drogot 10 ml kloroformmal rázogatva kivonunk. A kivonatot leszűrjük, és 1 ml R ammóniát adunk hozzá.



48. ábra Bornträger-reakció

2. Szabad antranoidok, antranoid-O-glikozidok és antranoid-C-glikozidok kimutatása

2 g drogot 10 ml kloroformmal szobahőmérsékleten rázogatva kivonunk. A kivonatot megsűrjük, a drogot óraüvegre helyezve megsűrítjük. A kloroformos kivonat antranoidtartalmát 1 ml R ammónia hozzáadásával Bornträger-reakcióval ellenőrizzük. A megsűrített droghoz 10 ml R sósavat adunk, és 100 °C-os vízfürdőn 10 percig melegítjük. Hűtést követően a kivonatot választótölcsérbe szűrjük, és 3×5 ml kloroformmal kirázzuk. A kloroformos fázis antranoidtartalmát 1 ml R ammónia hozzáadásával Bornträger-reakcióval ellenőrizzük. A vizes fázishoz 10 ml R vas(III)-klorid-oldatot adunk és 5 percig 100 °C-os vízfürdőn melegítjük. Hűtést követően az elegyet választótölcsérbe öntjük és 3×5 ml kloroformmal kirázzuk. A kloroformos fázis antranoidtartalmát 1 ml R ammónia hozzáadásával, Bornträger-reakcióval ellenőrizzük.



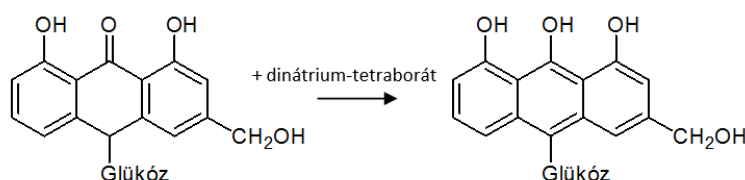
49. ábra Szabad antranoidok, antranoid-O-glikozidok és antranoid-C-glikozidok kimutatásának vázlata

3. *Aloe barbadensis* és *Aloe capensis* megkülönböztetése (Rosenthaler-reakció)

0,5 g tövises, illetve orvosi aloét 100 ml forrásban lévő vízzel összerázunk, majd a hűtött keveréket megsűrjük. 5 ml szüredékhez 5 ml brómos vizet adunk.

4. Barbaloin kimutatása (Schouteten-reakció)

0,5 g tövises, vagy orvosi aloét 100 ml forrásban lévő vízzel összerázunk, majd a hűtött keveréket megsűrjük. 5 ml szüredékhez 5 ml telített dinátrium-tetraborát-oldatot adunk. Az oldatot kb. 2 perc elteltével UV-fényben 366 nm-en vizsgáljuk.



50. ábra Barbaloin-kimutatás

5. *Frangulae cortex* antrakinnon-származékainak gélkromatográfiás elválasztása

Vizsgálati minta készítése: 50 g porított *Frangulae cortex*ből 500 ml 70%-os metanollal 100 °C-os vízfürdőn 15 percig tartó visszafolyatással kivonatot készítünk. A kivonatot leszűrjük, majd

vákuum alatt szárazra pároljuk. A bepárolt kivonat 0,1 grammját 2,0 ml metanolban oldjuk, üvegszűrőn szűrjük.

Gélkromatográfiás oszlop készítése: 10 g Sephadex LH-20 gél metanolban duzzasztunk, majd csappal zárható kromatográfiás oszlop készítésére alkalmas üvegcsőbe töltjük.

Kromatográfiás elválasztás: 1 ml metanolos kivonatot pipettával óvatosan az oszlop tetejére viszünk. Az eluálást metanollal végezzük. 20 db frakciót gyűjtünk, az 1. frakció 20 ml, a továbbiak 2,5 ml térfogatúak. Az elválasztást rétegekromatográfiával ellenőrizzük.

A frakciók rétegekromatográfiás ellenőrzésére állófázisként szilikagél réteglapot, kifejlesztő elegyként kloroform – metanol – víz 90:20:2 arányú elegyét alkalmazzuk. A lemezeket UV-fényben 366 nm-en értékeljük.

Startpontok: eredeti metanolos kivonat (20 µl), 20 darab gyűjtött frakció (10 µl), glükofrangulin B (1 mg/ml; 10 µl), frangulin B (1 mg/ml; 10 µl), frangulaemodin (1 mg/ml; 10 µl).

Ellenőrző kérdések

Hogyan mutathatók ki egy drog antranoidjai?

Milyen színű a lúgos vizes fázis a kutyabengekéreggel végzett Bornträger-reakció esetén?

Milyen színű a lúgos vizes fázis a szennalevéllal végzett Bornträger-reakció esetén?

Milyen színű a lúgos vizes fázis a rebarbara gyökérrel végzett Bornträger-reakció esetén?

Milyen színű a lúgos vizes fázis az aloéval végzett Bornträger-reakció esetén?

Mely drogból és hogyan mutatjuk ki a barbaloint?

Hogyan különböztethető meg az Aloe barbadensis és az Aloe capensis?

Milyen sorrendben eluálódtak a gélkromatográfiás oszlopról a kutyabengekéreg antranoidjai?

Min alapszik a gélszűrési kromatográfia?

Az antranoidok melyik típusa mutatható ki egy drog kloroformos kivonatából?

Melyik antranoid-glikozid-típus hidrolizálható R sósavval történő melegítéssel?

Melyik antranoid-glikozid-típus hidrolíziséhez szükséges sósavas közegben R-vas(III)-kloriddal történő melegítés?

3.11. Flavonoidtartalmú drogok vizsgálata

Tiliae flos, hársfavirágzat

Tilia cordata; *Tilia platyphyllos*; *Tilia* × *vulgaris* (Tiliaceae)

A drogot a kislevelű hárs, a nagylevelű hárs, vagy a közönséges hárs egész, szárított virágzata, illetve ezek keveréke adja. A drog enyhe, aromás illattal rendelkezik, íze édeskés, nyálkás.

A virágzat sárgászöld színű. A virágzat főtengele sárgászöld, gyakorlatilag kopasz, nyelv alakú hártvás murvalevelet visel, mely főere mentén, körülbelül fele hosszában a tengelyhez nő. A virágzatban lévő virágok száma általában kettőtől hétig, ritkán tizenhatig terjed. A csészelevelek a vacokról könnyen leválnak, hosszuk legfeljebb 6 mm, fonákuk általában kopasz, színi oldaluk és szélük sűrűn molyhos. Az öt visszás tojásdad, vékony szíromlevél színe sárgásfehér, hosszúságuk legfeljebb 8 mm. Ezek finom erezettel rendelkeznek, és a szélük csak ritkán visel magányos fedőszőröket. A számos porzó szabadon áll, de alul gyakran öt csoportba rendeződik. A felsőállású termő magháza enyhén ötágú bibében zárul.

A virágzatot elemeire szétválasztjuk, a részeket mikroszkóp alatt, R klorál-hidrátdoldatban vizsgáljuk. A murvalevél színi epidermiszét egyenes, vagy enyhén hullámos falú sejtek építik fel; a fonáki bőrszövet hullámos falú sejtekből és anomocitikus sztómaapparátusokból áll. A mezofillumban elkülönült sejtek kicsiny kalcium-oxalát rozetta-kristályokat tartalmaznak. A csészelevelek parenchimájában, különösen az erek közelében számos nyálkatartó sejt és kicsiny kalcium-oxalát rozettákat tartalmazó sejtek figyelhetők meg. A csészelevelek színi epidermisze görbe, vastag falú fedőszőröket visel, melyek egysejtűek, vagy csillag alakúak és legfeljebb öt sejtből állnak. A szíromlevelek bőrszöveti sejtjei egyenes fallal és ráncolt kutikulával rendelkeznek, gázcsereenyílasok hiányoznak. A szíromlevelek parenchimájában kicsiny kalcium-oxalát rozetták és – különösen a szíromlevél kihegyesedő részén – nyálkatartók láthatók. A virágporszemek alakja ovális, vagy enyhén háromszögű, átmérőjük 30–40 µm, három csírapuval és finoman szemcsés exinével. A magház kopasz vagy szőrökkel sűrűn borított; ezek gyakran erősen csavarodottak, egysejtűek, vagy 2–4 ágú csillagszőrök.

Crataegi folium cum flore, galagonya virágos hajtás

Crataegus monogyna; *C. laevigata*; *C. pentagyna*; *C. nigra*; *C. azarolus* (Rosaceae)

A drog az egybibés galagonya, a cseregalagonya, vagy ezek hibridjeinek, ritkábban más európai *Crataegus* fajoknak (ötbibés galagonya, fekete galagonya, azárol galagonya) egész vagy

aprított, szárított virágos hajtásvégeiből (summitas) áll. Szárított drogra vonatkoztatott, hiperozidban kifejezett flavonoidtartalma legalább 1,5%.

A sötétbarna, fásodó, mintegy 1–2,5 mm vastag ágakon szórt állású, nyeles, gyakran lehulló, kis pálhalevelekkel rendelkező lomblevelek, és számos bogernyős virágzatba rendeződött fehér virág található. A levelek erőteljesen, vagy kevésbé karéjosak, a lemez széle gyengén vagy alig fűrészkes; a *C. laevigata* esetében a levelek karéjosak, három, öt, vagy hét tompa karéjjal; a *C. monogyna* esetében pedig erőteljesen karéjosak, vagy osztottak, három, vagy öt hegyes karéjjal. A levél színi oldala sötétzöld, vagy barnászöld színű, fonáki oldala világosabb szürkészöld, sűrű erezettel. A *C. laevigata*, *C. monogyna* és a *C. pentagyna* levelei csupaszak, vagy csak szórványosan szőrözöttek, a *C. azarolus* és a *C. nigra* levelei szőrökkel sűrűn borítottak. A virágok csészéje öt barnászöld színű, szabadon álló, visszahajlott csészelevélből, a pártá öt szabadon álló, sárgásfehértől barnáig változó színű, kerekded, vagy széles tojásdad, rövid körmű szíromlevélből, a porzótáj számos porzóból áll. A magházról 1-5 bibeszál indul. A magház a bibeszálaknak megfelelő számú rekeszre tagolódik, mindegyikben egy termékeny magkezdeménnyel. A *C. monogyna* egy, a *C. laevigata* kettő, vagy három, a *C. azarolus* öt, vagy ritkán négy termőlevéllel rendelkezik.

A drogpor sárgászöld színű. Mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldatban vizsgálva, benne egysejtű, általában vastag falú, tág üregű fedőszőröket láthatunk, melyek többé-kevésbé egyenesek, vagy gyengén görbültek, az alapjuknál gödörkésen vastagodott sejtfallal. A levélepidermisz töredékein hullámos falú vagy sokszögletes epidermiszsejtek, valamint nagyméretű, 4-7 melléksejttel rendelkező, anomocitikus típusú gázcserenyílások vizsgálhatók. A mezofillum parenchima sejtjeiben főleg 10-20 µm nagyságú kalcium-oxalát rozetták, a szállítónyaláboknál kisméretű, magányos piramis kristályok találhatók. A szíromlevelek töredékeinek epidermisz sejtjei sokszögletűek, lekerekítettek, felszínük papillás, faluk vastag, hullámosan csíkozott kutikulával borítottak. A portokok töredékeiben az endotécium boltozatos alakú, és szabályosan vastagodott falú sejtjei jellegzetesek. A szárrészek töredékeiben kollenchimasejtek, vermes gödörkés falú tracheák, és elfásodott, szűk lumenű szklerenchimarostok csoportjai láthatók. A számos gömbös-elliptikus, vagy háromszögletes, maximum 45 µm nagyságú pollenszem három csírákapuval és finoman szemcsézett exinével rendelkezik.

Ononidis radix, tövises iglice gyökér

Ononis spinosa (Fabaceae)

A drog a tövises iglice egész, vagy aprított, szárított gyökere. A gyökér barna színű, többé-kevésbé lapított, csavarodott és elágazó, mélyen barázdált és hosszában ráncos. A metszési felületen vékony kéreg és feltűnően sugaras szerkezetű fatest látható. A gyökér törése rövid és rostos.

A drogpor világosbarna, vagy barna színű. A drogport mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldatban vizsgálva, benne a paraszövet barna töredékei láthatók, melyek vékony falú, sokszögletű sejtekből épülnek fel; vastag falú, vékony rostok csoportjai is megfigyelhetők, melyeket gyakran kísérnek hasáb alakú kalcium-oxalát kristályokat tartalmazó parenchimasejtek; edénytöredékek vannak még jelen, melyek sejtfalát számos kicsiny vermes-gödörkés vastagodás jellemzi; magányos, hasáb alakú kalcium-oxalát kristályokat tartalmazó parenchimasejtek is láthatók. Mikroszkóp alatt, R glicerín és R víz egyenlő térfogatú keverékében vizsgálva a drogport, benne egyszerű, kerek, 5-10 µm átmérőjű keménytőszemeket észlelhetünk.

Aurantii amari epicarpium et mesocarpium, keserű narancs epikarpium és mezokarpium

Citrus aurantium ssp. *aurantium* (Rutaceae)

A drog a keserű narancs érett gyümölcsének fehér szivacsos szövetétől részben megfosztott, szárított epi(exo)karpiuma és mezokarpiuma. Szárított drogra vonatkoztatott illóolaj-tartalma legalább 20 ml/kg.

A drog aromás illatú, keserű ízű. A drog 5-8 cm hosszú, 3-5 cm széles és körülbelül 3 mm vastag darabokból áll, melyek alakja elliptikustól szabálytalanig változhat. A külső felszín feltűnően pontozott, színe sárgás-vörösesbarna, belső felszíne sárgás-barnásfehér lehet.

A drogpor színe világosbarna. Mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldatban vizsgálva, benne kicsiny, sokszögletű sejtek láthatók, melyek antiklinális fala enyhén vastagodott, és telve vannak narancsvörös kromoplasztokkal. Nagyon ritkán anomocitikus sztómaapparátusok is előfordulnak. A hipoderma darabjait kollenchimás vastagodás jellemzi; a parenchimarészletek minden sejtje kalcium-oxalát oszlopkristályt tartalmaz; lizigén eredetű illóolajtartók töredékei is jelen vannak. A parenchima heszperidin kristályokat tartalmaz, melyek R kálium-hidroxid 20 g/l töménységű oldatában sárga színnel feloldódnak.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Tiliae flos flavonoid aglikonjainak kimutatása vékonyrétegkromatográfiával
2. Sambuci flos, Hyperici herba flavonoidjainak vékonyrétegkromatográfiás vizsgálata
3. Crataegi folium cum flore, Crataegi fructus: procianidinek kimutatása (Bate-Smith-reakció)
4. Onokol kimutatása az Ononidis radixból
5. Heszperidin izolálása Aurantii amari epicarpium et mesocarpiumból
6. Szójakivonat izoflavontartalmának mennyiségi meghatározása HPLC módszerrel

1. Tiliae flos flavonoid aglikonjainak kimutatása vékonyrétegkromatográfiával

1 g hársfavirágzatra 20 ml metanolt öntünk, és 10 percig vízfürdőn melegítve kivonjuk. A kivonatot megszűrjük, és 1 ml-et kémcsőben a rétegkromatográfiás vizsgálat céljából félrerakjuk. A kivonat többi részéhez 10 ml 1 M kénsavat adunk, és vízfürdőn melegítve 30 percig hidrolizáljuk. Hűtést követően az elegyet választótölcsérbe öntjük, majd 2×10 ml etil-acetáttal kirázzuk. Az etil-acetátos fázist savmentesítés céljából 3×5 ml vízzel kirázzuk. A főzőpohárban vízmentes nátrium-szulfáton vízmentesített szerves fázist porcelántálba öntjük, és vízfürdőn bepároljuk. A beszáradt maradékot 1 ml metanolban oldjuk.

A rétegkromatográfiás vizsgálathoz állófázisként szilikagél réteglapot, kifejlesztő elegyként toluol – etil-acetát – hangyasav 5:4:1 arányú elegyét alkalmazzuk. A lemezeket UV-fényben 366 nm-en értékeljük.

Startpontok: Tiliae flos eredeti metanolos kivonata (40 µl), kvercetin (1 mg/ml; 20 µl), hidrolizátum etil-acetátos fázisa (20 µl).

2. Sambuci flos, Hyperici herba flavonoidjainak vékonyrétegkromatográfiás vizsgálata

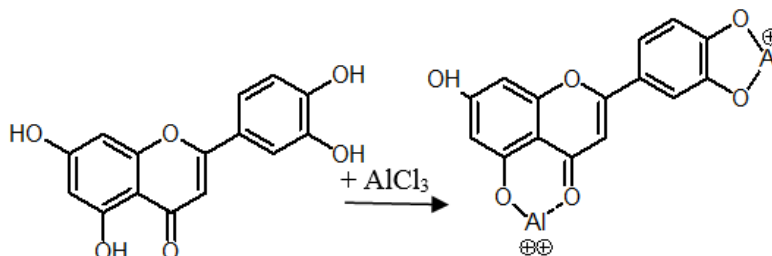
1 g fekete bodza virághoz 20 ml metanolt öntünk, majd vízfürdőn 5 percig melegítve kivonjuk. A kivonatot szűrjük, majd porcelántálban vízfürdőn szárazra pároljuk. A beszáradt maradékot 2 ml metanolban oldjuk.

1 g közönséges orbáncfű virágos hajtáshoz 20 ml metanolt öntünk, majd vízfürdőn 10 percig melegítve kivonjuk. A kivonatot szűrjük, majd porcelántálban vízfürdőn szárazra pároljuk. A beszáradt maradékot 2 ml metanolban oldjuk.

A rétegkromatográfiás vizsgálathoz állófázisként szilikagél réteglapot, kifejlesztő elegyként etil-acetát – hangyasav – víz 85:10:5 arányú elegyét alkalmazzuk. A lemezeket előbb UV-

fényben 366 nm-en, majd alumínium-klorid reagenssel bepermetezve UV-fényben 366 nm-en értékeljük.

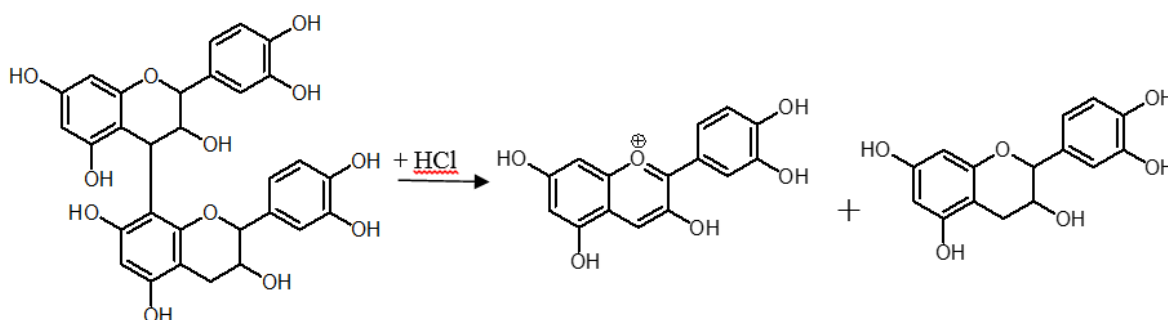
Startpontok: Sambuci flos kivonata (20 µl), rutin (1 mg/ml; 20 µl), Hyperici herba kivonata (20 µl), hiperozid (1 mg/ml; 20 µl).



51. ábra Flavonoidok reakciója alumínium-kloriddal

3. Crataegi folium cum flore, Crataegi fructus: procianidinek kimutatása (Bate-Smith-reakció)

0,5 g galagonya virágos hajtást 10 ml 2 M-os sósavval 30 percig vízfürdőn melegítve kivonunk. Hűtést követően a kivonatot választótölcsérbe szűrjük, és 5 ml butanollal kirázzuk.



52. ábra A Bate-Smith-reakció során történő vátozás

4. Onokol kimutatása Ononidis radixból

0,2 g porított tövises iglice gyökeret mikroszublimáló lapra helyezünk, és Bunsen-égő felett izzítjuk. A keletkezett szublimátumot tárgylemezen felfogjuk. A tárgylemezen lévő szublimátum tömény kénsavval megcseppentjük.

5. Heszperidin izolálása Aurantii amari epicarpium et mesocarpiumból

5 g porított keserű narancs epikarpium és mezokarpiumot Erlenmeyer-lombikba bemérünk, és 25 ml metanollal 15 percig vízfürdőn melegítve kivonjuk. A kivonatot redős szűrőpapíron

szűrjük. Rétegekromatográfiás ellenőrzéshez a kivonat 1 ml-es részletét kémcsőben félretesszük. A metanolos szűrletet gömblombikban rotációs vákuum bepárlóval szirup állagúra desztilláljuk, majd 20 ml 6%-os ecetsavat adunk hozzá. 15 perc múlva a kivált narancsvörös színű csapadékot szűrőpapíron szűrjük. A szűrőpapíron lévő csapadékot először kis részletekben adagolt 10 ml 6%-os ecetsavval, majd 10 ml desztillált vízzel, végül 10 ml izopropanollal mossuk. A csapadékot kémcsőbe kaparjuk, és 5 ml forró metanolban oldjuk.

Az izolált anyag rétegekromatográfiás vizsgálathoz állófázisként szilikagél réteglapot, kifejlesztő elegyként etil-acetát – hangyasav – ecetsav – víz 100:11:11:27 arányú elegyét alkalmazzuk. A lemezeket előbb UV-fényben 366 nm-en, majd alumínium-klorid reagenssel bepermetezve UV-fényben 366 nm-en értékeljük.

Startpontok: Aurantii amari epicarpium et mesocarpium kivonata (20 µl), heszperidin (1 mg/ml; 20 µl), izolált anyag metanolos oldata (20 µl).

6. Szójakivonat izoflavontartalmának mennyiségi meghatározása HPLC módszerrel

200 ml-es mérőlombikba 50 ml metanolos sósavoldatot (0 M; 0,5 M; 1 M; vagy 3 M) töltünk, 200,0 mg szójakivonatot mérünk, és további 50 ml metanolos sósav oldatot adunk hozzá. A kivonatot ultrahangos vízfürdőben 80 °C-on 60 percig hidrolizáljuk. A hidrolízis megkezdésekor, 30 perc, illetve 60 perc elteltével a hidrolizátumból 2 ml mintát kiveszünk, és fecskendőre szerelt membránszűrőn mintatartó üvegcsébe szűrjük. A vizsgálatok során a szűrt mintákból 20-20 µl-t injektálunk a HPLC készülékbe. A kromatogramokon a görbe alatti területek (AUC) nagyságát a HPLC készülékhez használt software segítségével határozzuk meg.

A HPLC mérés során a következő paramétereket alkalmazzuk. Oszlop: Phenomenex Gemini C-18, 5 µm. Eluens: metanol – víz – ecetsav 52:48:0,05. Áramlási sebesség: 1 ml/min. Hőmérséklet: 25 °C. Detektálás: UV 254 nm.

A kalibrációs egyeneseket az alábbi táblázat adatai alapján MS Office Excel programmal készítjük el.

	AUC	m (mg)
daidzein 1. oldat	995990	0,00172
daidzein 2. oldat	704227	0,001216
daidzein 3. oldat	435641	0,000752
daidzein 4. oldat	14369	0,00002432
glicitein 1. oldat	159963	0,00028
glicitein 2. oldat	103405	0,00018
glicitein 3. oldat	43453	0,000074
glicitein 4. oldat	3006	2,4864E-06
genisztein 1. oldat	2379578	0,004
genisztein 2. oldat	1190951	0,002
genisztein 3. oldat	198449	0,00033
genisztein 4. oldat	21938	0,000033

bemért minta tömege (mg):	alkalmazott sósavkoncentráció (M):
---------------------------	------------------------------------

	0 perc	30 perc	60 perc
daidzein AUC (Rt kb. 6,21 min):			
glicitein AUC (Rt kb. 6,82 min):			
genisztein AUC (Rt kb. 10,37 min):			

A kalibrációs egyenesek MS Office Excel programmal kapott egyenletéből és a mérési eredményekből számítjuk ki a szójakivonat hidrolizátumában lévő daidzein, glicitein és genisztein mennyiségét három különböző időpontban.

Eredmények:

	Izoflavontartalom (mg/g kivonat)			%
	daidzein	glicitein	genisztein	
0 perc				
30 perc				
60 perc				

Alkalmazott sósavkoncentráció (M):

Ellenőrző kérdések

- Mi történik a flavonoid-glikozidokkal savas közegben hosszabb ideig történő melegítés során?
- Miért szükséges vízzel is kirázást végezni a Tilae flos kivonat flavonoid-glikozidjainak hidrolízisét követően az aglikonok feldúsítása során?
- Milyen reagenst alkalmazunk a flavonoidok rétegkromatográfiás detektálása során?
- A kromatogramok alumínium-klorid reagenssel történő bepermetezését követően mit tapasztalt?
- Rendezze várható R_F -értékük szerint növekvő sorrendbe a következő vegyületeket: hiperozid, kempferol, kvercetin, rutin!
- Láthatók-e a kivonatok és a hidrolizátum kromatogramján a referenciaanyagként alkalmazott flavonoidok mellett más flavonoidok foltjai is?
- Hogyan mutatható ki egy drog procianidinjei?
- Milyen vegyületek kimutatására alkalmas a Bate-Smith-reakció?
- Savas közegben milyen színűek az antocianidinek?
- Hogyan mutatható ki az onokol a tövises iglice gyökérből?
- Milyen kémhatású közegben válik ki a heszperidin csapadékként?
- Milyen színű a kromatogramon a heszperidin foltja 366 nm-en alumínium-klorod reagenssel történő bepermetezés előtt és után?
- Tiszta-e a gyakorlaton alkalmazott módszerrel izolált heszperidin?
- Miért szükséges sósavas közegben melegíteni a szójakivonatot az izoflavonok mennyiségi meghatározása esetén?
- Hasonlítsa össze a négy különböző sósavkoncentráció alkalmazásával végzett hidrolízis eredményét a szójakivonat izoflavonjainak mennyiségi meghatározása esetén!

3.12. Cserzőanyagtartalmú drogok vizsgálata

Ratanhiae radix, ratanhiagyökér

Krameria triandra (Krameriaceae)

A drog a perui ratanhia földbeni, szárított, általában aprított szerveiből áll. Szárított drogra vonatkoztatott, pirogallolban kifejezett cserzőanyagtartalma legalább 5%.

A vörösesbarna színű főgyökér vastag, csomós gyökérfejjel rendelkezik. Az oldalgyökök a főgyökérrel megegyező színűek, többé kevésbé egyenesek, vagy gyengén hullámosak. Az idősebb darabok kérge érdes-pikkelyes, a fiatalabbaké a fatestről könnyen leváló, sima felszínű, kiemelkedő keresztirányú repedésekkel. A kéreg rostos, a fatest szilánkos törésű. A keresztmetszetek lecsiszolt felszínén egy sötét barnászörös színű gyűrű látható, melynek szélessége a sugár mintegy egyharmadát teszi ki. A tömör, halvány vörösesbarna, finoman porózus fatestben számos bélsugár fut. A fatest középső része gyakran sötétebb színű.

A drogpor vörösesbarna színű. Mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldatban vizsgálva benne sötétbarna színű flobafént tartalmazó parasejtek; 12-30 µm átmérőjű, kissé vastagodott falú, nem fásodott falú rostok töredékei láthatók. A háncsparenchima sejtsorok kalcium-oxalát oszlopkristályokat és mikrokristályokat tartalmaznak. Az edénytöredékek általában 20-60 µm átmérőjűek, vermes gödörkés sejtfalvastagodással, a legfeljebb 20 µm átmérőjű tracheidák töredékei réses gödörkés sejtfalvastagodással rendelkeznek. A drogport mikroszkóp alatt, R glicerín 50%(V/V)-os oldatában vizsgálva, benne kerek, egyszerű, vagy 2–4 részszelemből álló összetett keményítőszemeket találunk. Az egyszerű keményítőszemek legfeljebb 30 µm átmérőjűek. Néhány közülük a bélsugár sejtjeiben és a parenchimasejtekben is megfigyelhető.

Galla, gubacs

Quercus infectoria (Fagaceae)

A gubacs gömbölyű vagy kissé körte alakú; alsó részén rövid, vastag nyelecskébe keskenyedik. Átmérője 1-2,5 cm, színe szürkészöld. Felső része apró, tompa dudoroktól egyenetlen, alul sima. A gubacs kemény és súlyos; a vízben alámerül. Keresztmetszetén látjuk a külső, tömöttebb részt. A közép felé majdnem szaruszerű, barnásan piszkossárga szövete központjában üreges; itt az álca maradványai is megtalálhatók. A gubacson olykor 2-3 mm átmérőjű, kerek lyuk látható. Az ilyen gubacs rendszerint világos, sárgásbarnás színű, könnyebb és a vízben úszik. A drog szagtalan; íze nagyon fanyar, összehúzó.

Mikroszkópos vizsgálat. Keresztmetszeten a gubacs külső részén edénynyalábokat, buzogányfej alakú és egyes kalcium-oxalát-kristályokat tartalmazó széles parenchimat látunk. Ettől befelé gödörkésen vastagodott falú, sárgás színű, kősejtekből álló gyűrű van. A kősejtgyűrűtől befelé keményítőt tartalmazó parenchimasejteket látunk.

Pora szürkéssárga. Mikroszkópos készítményében igen gyakoriak a csersavrögöket és kalcium-oxalát kristályokat tartalmazó parenchimatöredékek, a gödörkésen vastagodott falú kősejtek és edénynyaláb-részletek. Látunk még sejtfalburjánzás útján létrejött jellemző lignintesteket, kalcium-oxalát kristályokat, továbbá keményítőszemeket.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Cserzőanyagok kimutatása (*Galla*, *Ratanhiae radix*, *Quercus cortex*, *Agrimoniae herba*)
2. Drogok cserzőanyag-tartalmának meghatározása

Cserzőanyagok kimutatása

0,2-3 g drogot 70%-os etanollal átnedvesítünk, majd 100 ml vízzel 5 percig 100 °C-os vízfürdőn melegítjük. Hűtést követően a kivonatot szűrőpapíron szűrjük. A kivonat 5-5 ml-es részletét négy kémcsőbe öntjük és hozzáadjuk az a)–d) reagensek 1–2 cseppjét. A becseppentés pillanatában észlelt színreakció, illetve a keletkezett csapadék állaga jellemző a drogra.

- a) R-vas(III)-klorid oldat
- b) R-szeszes-ólomacetát oldat
- c) 1%-os vizes kinin-hidroklorid oldat
- d) 1%-os vizes zselatin oldat

Drogok cserzőanyag-tartalmának meghatározása

Minden kivonási és hígítási műveletet fénytől védett helyen végezzünk.

Az elporított drog előírt mennyiségét 250 ml-es gömblombikban 150 ml R vízzel 30 percig vízfürdőn melegítjük. Ezután a folyóvízzel lehűtött lombik tartalmát R vízzel kvantitatíve egy 250 ml-es mérőlombikba visszük át, és a mérőlombikot jelig töltjük. Miután a szilárd részek leülepedtek, a folyadékot egy 125 mm átmérőjű szűrőpapíron megszűrjük. A szüredék első 50 ml-ét elöntjük.

Összes polifenol. A szüredék 5,0 ml-ét R vízzel 25,0 ml-re hígítjuk. A hígított oldat 2,0 ml-ét 1,0 ml R foszfor-molibdén-volfrámsav reagenssel és 10,0 ml R vízzel elegyítjük, majd R nátrium-karbonát 290 g/l töménységű oldatával 25,0 ml-re hígítjuk. Az oldat abszorbanciáját (A_1) 30 perc elteltével 760 nm-en mérjük; kompenzáló folyadékként R vizet használunk.

Bőrporra nem adszorbeálódó polifenolok. A szüredék 10,0 ml-ét 0,10 g CRS bőrporrall 60 percen át erőteljesen rázatjuk, majd megszűrjük és e szüredék 5,0 ml-ét R vízzel 25,0 ml-re hígítjuk. A hígított oldat 2,0 ml-ét 1,0 ml R foszfor-molibdén-volfrámsav reagenssel és 10,0 ml R vízzel elegyítjük majd R nátrium-karbonát 290 g/l töménységű oldatával 25,0 ml-re hígítjuk. Az oldat abszorbanciáját (A_2) 30 perc elteltével 760 nm-en mérjük; kompenzáló folyadékként R vizet használunk.

Összehasonlító oldat. Közvetlenül felhasználás előtt 50,0 mg R pirogallolt R vízzel 100,0 ml-re oldunk és az oldat 5,0 ml-ét R vízzel 100,0 ml-re hígítjuk. A hígított oldat 2,0 ml-ét 1,0 ml R foszfor-molibdén-volfrámsav reagenssel és 10,0 ml R vízzel elegyítjük, majd R nátrium-karbonát 290 g/l töménységű oldatával 25,0 ml-re hígítjuk. Az oldat abszorbanciáját (A_3) 30 perc elteltével 760 nm-en mérjük; kompenzáló folyadékként R vizet használunk.

A százalékban kifejezett cserzőanyagtartalmat pirogallolban kifejezve adjuk meg az alábbi összefüggés alapján:

$$\frac{62,5(A_1 - A_2)m_2}{A_3 \cdot m_1}$$

ahol m_1 = a vizsgálandó minta tömege grammban, m_2 = a pirogallol tömege grammban.

Ellenőrző kérdések

- Mit tapasztalt, amikor a Quercus cortex kivonathoz R vas(III)-klorid oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a Ratanhiae radix kivonathoz R vas(III)-klorid oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor az Agrimoniae herba kivonathoz R vas(III)-klorid oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a Galla kivonathoz R vas(III)-klorid oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a Quercus cortex kivonathoz R szeszes-ólomacetát oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a Ratanhiae radix kivonathoz R szeszes-ólomacetát oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor az Agrimoniae herba kivonathoz R szeszes-ólomacetát oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a Galla kivonathoz R szeszes-ólomacetát oldatot cseppentett?

- Mit tapasztalt, amikor a *Quercus cortex* kivonathoz 1%-os vizes kinin-hidroklorid oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a *Ratanhiae radix* kivonathoz 1%-os vizes kinin-hidroklorid oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor az *Agrimoniae herba* kivonathoz 1%-os vizes kinin-hidroklorid oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a *Galla* kivonathoz 1%-os vizes kinin-hidroklorid oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a *Quercus cortex* kivonathoz 1%-os vizes zselatin oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a *Ratanhiae radix* kivonathoz 1%-os vizes zselatin oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor az *Agrimoniae herba* kivonathoz 1%-os vizes zselatin oldatot cseppentett?
- Mit tapasztalt, amikor a *Galla* kivonathoz 1%-os vizes zselatin oldatot cseppentett?
- Számítsa ki a drogok cserzőanyag-tartalmának meghatározása során alkalmazott drog összes polifenol tartalmát pirogallolban kifejezve!
- Számítsa ki a drogok cserzőanyag-tartalmának meghatározása során alkalmazott drogan lévő bőrporra nem adszorbeálódó polifenolok összes mennyiségét pirogallolban kifejezve!
- Megfelel-e VIII. Magyar Gyógyszerkönyv cikkelyének a mért drog cserzőanyag-tartalma?

3.13. Hidrokinontartalmú drogok vizsgálata

Uvae ursi folium, ovosi medveszőlő levél

Arctostaphylos uva-ursi (Ericaceae)

A drog az orvosi (piros) medveszőlő szárított egész, vagy aprított leveleiből áll. A száraz drog legalább 7,0% vízmentes arbutint tartalmazzon.

A 7-30 mm hosszú, 5-12 mm széles levelek felső oldala fényes, sötétzöld, alsó oldala világosabb színű. A sértetlen levél széle kissé begöngyölt, sima, rövid nyélbe keskenyedő. A levélcsúcs lekerekített, vagy tompán kihegyezett. A levélnyél vastag és bőrszerű. A levél mindkét oldalán jól látható erezet szárnyas. A besüllyedt erezet szemcsés kinézetet kölcsönöz a levél fényes színi oldalának. A fiatal levelek pillás élűek lehetnek, az idős levelek pedig törékenyek.

A drogpor zöld, zöldessárga vagy zöldesszürke színű. Mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldat alkalmazásával vizsgálva, benne a következő ismertetőjegyek láthatók: epidermisztöredékek, melyek vastag falú, szabálytalanul gödörkés, sokszögletű sejtekből állnak, és felülnézetben sima kutikulával borítottak; valamint 5-10 melléksejttel körülvett anomocitikus típusú gázcserenyílások. Ezek csak a levelek fonáki oldalán fordulnak elő. Szörképletek szintén csak a fonáki oldalon láthatók, melyek kúp alakúak és egysejtűek. Megfigyelhetők az oszlopos paliszád parenchima 3-4 rétegű darabjai; sejtjei különböző nagyságúak. Láthatók a szivacsos parenchima töredékei is; továbbá elfásodott rostok csoportjai kalcium-oxalát hasábkristályokat tartalmazó sejtrétegekkel.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

1. Katechinszármazékok kimutatása az orvosi medveszőlő levélből
2. Fenolos anyagok kimutatása az orvosi medveszőlő levélből
3. Uvae ursi folium vékonyrétegekromatográfiás vizsgálata

1. Katechinszármazékok kimutatása az orvosi medveszőlő levélből

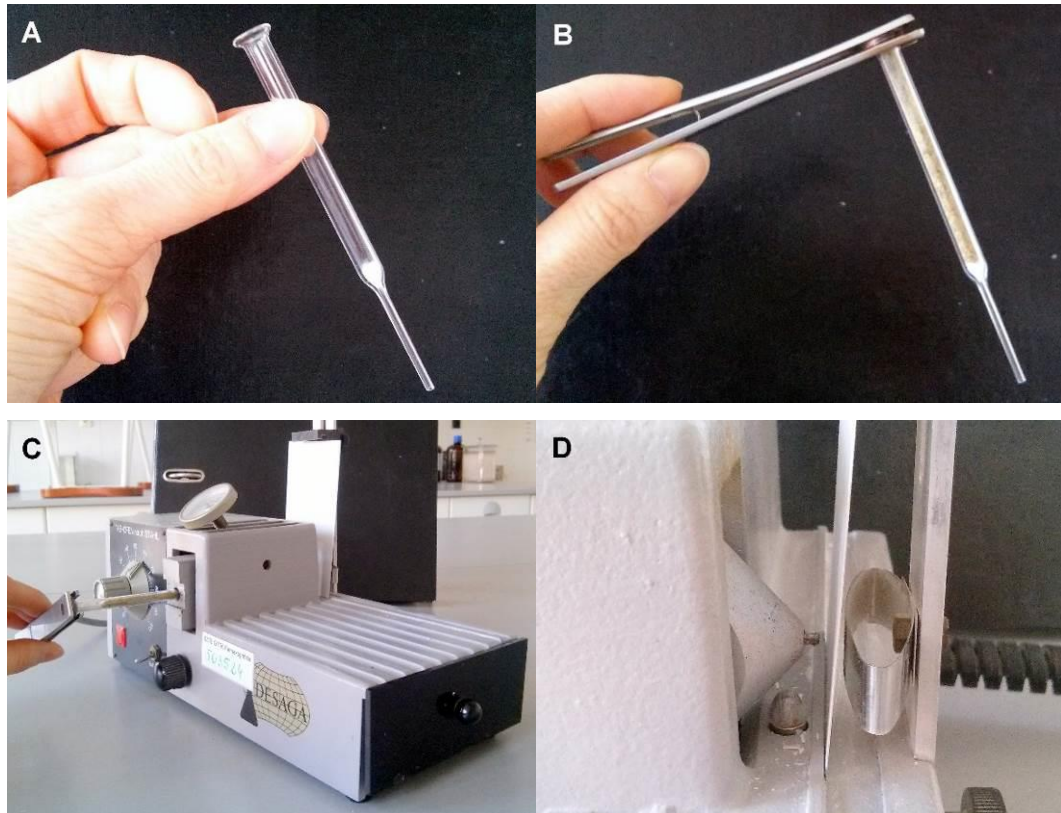
Orvosi medveszőlő levél darabkáit óraüvegre helyezünk, és sósavas vanillin oldattal megcseppentjük. 5 perc elteltével figyeljük meg a változást!

2. Fenolos anyagok kimutatása az orvosi medveszőlő levélből

0,5 g orvosi medveszőlő levelet Erlenmeyer-lombika mérünk, és 10 ml vízzel vízfürdőn melegítve kivonatot készítünk. A kivonatot kémcsőbe szűrjük, majd 1 csepp vas(III)-klorid oldatot adunk hozzá.

3. Uvae ursi folium vékonyrétegkromatográfiás vizsgálata

A Thermo-Micro Analytische System készülékhez (TAS-készülék) tartozó üvegcső szűkebb végébe apró vattapamagot helyezünk (A). A csövet kb. $\frac{3}{4}$ részéig porított orvosi medveszőlő levéllel lazán megtöltjük. Az üvegcső vastagabbik végét a záró csipesszel lezárjuk (B). A rétegkromatográfiás lemezt a TAS-készülék állványára rögzítjük úgy, hogy a szublimátumkivezető nyílás a lemez szélétől kb. 1 cm re legyen. Az üvegcsövet a csipesznél megfogva az előzetesen 190 °C-ra felfűtött TAS-készülékbe helyezzük (C). Ügyeljünk arra, hogy az üvegcső vége a szublimátumkivezető nyílásán túlnyúlva a kromatográfiás réteglaptól maximum 0,5 mm-re legyen (D). Az üvegcsövet addig a TAS-készülékben tartjuk, míg a kivezető nyílásnál a kromatogramon halványsárga folt jelenik meg (kb. 1 perc). Az így kapott folt a kromatográfiás lemez első startpontja lesz, a többi mintát ezzel azonos magasságba visszük fel.



53. ábra TAS-készülék használata

2 g orvosi medveszőlő levelet Erlenmeyer-lombika mérünk, és 10 ml metanollal 5 percig szobahőmérsékleten rázogatva kivonatot készítünk. A kivonatot porcelántálba szűrjük és vízfürdőn bepároljuk. A bepárolt kivonatot 2 ml metanol és 8 ml desztillált víz elegyében feloldjuk, választótölcsérbe öntjük és 2×5 ml etil-acetáttal kirázzuk. Az etil-acetátos fázist főzőpohárban vízmentes nátrium-szulfáton vízmentesítjük, porcelántálban bepároljuk, és 2 ml metanolban oldjuk.

0,2 g porított orvosi medveszőlő levelet mikroszublimáló lappra helyezünk, és Bunsen-égő felett izzítjuk. A keletkezett szublimátumot tárgylemezen felfogjuk. A szublimátumot 1 ml metanollal a tárgylemezről kémcsőbe mossuk.

Az orvosi medveszőlő levél szublimátumok és kivonat rétegekromatográfiás vizsgálathoz állófázisként szilikagél réteglapot, kifejlesztő elegyként *n*-hexán – aceton 1:1 arányú elegyét alkalmazzuk. A lemezeket frissen készített 1%-os vas(III)-klorid – 1%-os kálium-ferricianid 1:1 arányú elegyével bepermetezve értékeljük.

Startpontok: *Uvae ursi* folium TAS-készülékkel készült szublimátuma, hidrokinon (1 mg/ml; 10 µl), *Uvae ursi* folium metanolos kivonata (20 µl), *Uvae ursi* folium mikroszublimáló lappal készített szublimátumának metanolos oldata (20 µl).

Ellenőrző kérdések

- Hogyan mutathatók ki az orvosi medveszőlő levél katechinszármazékai?
- Hogyan mutathatók ki az orvosi medveszőlő levél fenolos anyagai?
- Milyen módszerekkel lehet egy drogból szublimátumot készíteni?
- Hogyan lehet egy drogból szublimált anyagot felvinni a rétegekromatográfiás lemezre?
- Milyen színű a hidrokinon foltja a rétegekromatográfiás lapon frissen készített 1 %-os vas(III)-klorid – 1%-os kálium-ferricianid 1:1 arányú elegyével bepermetezve?
- Mely vegyülettípusok reagálnak kék színnel az *Uvae ursi* folium metanolos kivonatának kromatogramján miután a lemezt frissen készített 1%-os vas(III)-klorid – 1 %-os kálium-ferricianid 1:1 arányú elegyével bepermetezzük?

3.14. Ginseng-szaponin tartalmú készítmények vizsgálata

Ginseng radix, ginzenggyökér

Panax ginseng (Araliaceae)

A drog az ázsiai ginzeng (erőgyökér) szárított, egész, vagy aprított gyökere. A drogban lévő ginsenozid Rg1 és ginsenozid Rb1 össz mennyisége legalább 0,40% szárított drogra vonatkoztatva.

A főgyökér orsó alakú, vagy hengeres, olykor elágazó, mintegy 20 cm hosszú és 2,5 cm vastag; gyakran hajlott, vagy erősen görbült. Felszíne világossárga, vagy krémszínű, hosszában sávozott; a gyökér feji részén hajtásrügyek találhatók; törése tömör. Keresztmetszetén egy széles külső zóna található, melyben elszórtan narancsvörös váladéktartók láthatók, belső része pedig finoman sugaras szerkezetű. A főgyökér alsó részén számos vékony oldalgyökér ered.

A drogot elporítjuk. Mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldat alkalmazásával vizsgálva, benne nagy számban láthatunk vékony falú parenchimasejt-töredékeket, továbbá a nagyméretű váladéktartók töredékeit, melyekben sárgásbarna gyantaszerű kiválás található. A vizsgálandó mintában alkalmanként láthatunk nem fásodott tracheidákat, továbbá részlegesen fásodott falú edényeket is, melyek magányosan, vagy kisebb csoportokban fordulnak elő. Elszórtan kalcium-oxalát rozetták is láthatók. A por vizsgálatát R-glicerín és R-víz egyenlő arányú keverékében végezve, a mintában sok keményítőszemcse is megfigyelhető, melyek magányosak, vagy kettesével, illetve hármasával állnak és 1-10 µm átmérőjűek.

Eleutherococci radix, tajgagyökér

Eleutherococcus senticosus (Araliaceae)

A drog a tajgagyökér (szibériai ginzeng) szárított, egész vagy aprított földbeni részeiből áll. Tartalom: legalább 0,08% eleutheozid B és eleutheozid E.

A gyökértörzs szabálytalanul hengeres, göcsörtös felületű, 1,5-4,0 cm átmérőjű; felszíne durva, hosszant barázdált, szürkésbarna, vagy feketésbarna színű. A fatestet mintegy 2 mm vastagságú kéreg veszi körül. A fatest középső része (geszt) világosbarna, külső, nedvességet tartalmazó része (szijács) halványsárga. A drog törése a kéregrészben rövid, vékony rostos; a fatest belső részén durván rostos. A gyökértörzs alsó részéről számos gyökér ered. A gyökerek hengeresek, göcsörtösek, 3,5-15 cm hosszúak, átmérőjük 0,3-1,5 cm közötti. Felszínük sima, szürkésbarna, vagy feketésbarna színű. A mintegy 0,5 mm vastagságú gyökérkéreg szorosan kapcsolódik a

világossárga fatesthez. A gyökerek törése gyengén rostos. A gyökér színe, ahol a rizodemiszt levált róla, sárgásbarna.

A drogpor sárgásbarna színű. Mikroszkóp alatt, R klorál-hidrát-oldatban vizsgálva, benne megfigyelhetők: vastag falú, fásodott rostok csoportjai; tág üregű, hálózatosan és vermes-gödörkésen vastagodott falú edények töredékei; barna tartalommal rendelkező kiválasztó járatok csoportjai, melyek átmérője 20 µm; 10-50 µm nagyságú kalcium-oxalát rozettákat tartalmazó parenchimasejtek. Olyan alapszöveti parenchimasejtek is láthatók, amelyek 10-50 µm-es kalcium-oxalát rozettakristályokat tartalmaznak. A drogport R glicerinn és R víz egyenlő arányú keverékében vizsgálva, benne apró, lekerekített vagy kissé szögletes, magányos, kettes vagy hármas csoportokban álló keményítőszemeket figyelhetünk meg.

Gyakorlaton elvégzendő feladatok

Ginzenggyökér- és tajgagyökér-készítmények rétegekromatográfiás vizsgálata

Kivonatkészítés ginzenggyökér-tartalmú teakeverékből [pl.: Dr. Chen Ginseng-zöld teakeverék (zöld tea levél, ginzenggyökér); Dr. Chen Ginseng-Ginkgo zöld teakeverék (páfrányfenyőlevél, ginzenggyökér, zöld tea levél) vagy Herbária Memória teakeverék (páfrányfenyőlevél, ginzenggyökér, matélevél)]: Egy teafiltert felvágunk, tartalmát Erlenmeyer-lombikba szórjuk és 2 × 20 ml metanollal vízfürdőn melegítve 2 × 10 percig kivonjuk. Az egyesített kivonatokat szűrőpapíron még melegen porcelántálba szűrjük és bepároljuk. A száraz maradékot 5 ml metanolban oldjuk. 10 ml acetont adunk hozzá, és a csapadékos oldatot szűrőpapíron szűrjük. Kivonatkészítés ginzenggyökér-kivonat (pl.: Interherb Ginseng Extraktum kapszula) és tajgagyökérkivonat-tartalmú (pl.: Eleutheroginseng kapszula vagy Béres Szibériai Ginseng kapszula) étrend-kiegészítőkből: egy darab kapszulát felnyitunk, tartalmát Erlenmeyer-lombikba szórjuk, és 20 ml metanollal vízfürdőn 10 percig melegítve kivonjuk. A kivonatot szűrőpapíron lehűtés nélkül porcelántálba szűrjük, bepároljuk, és a száraz maradékot 2 ml metanolban oldjuk.

A ginzenggyökér- és tajgagyökértartalmú termékek rétegekromatográfiás vizsgálathoz állófázisként szilikagél réteglapot, kifejlesztő elegyként diklórmétán – metanol – víz 70:50:10 arányú elegyét alkalmazzuk. A lemezeket vanillin-foszforsav reagenssel történő bepermetezés után 1-2 percig 120 °C-os szárítószekrényben való hevítést követően értékeljük.

Startpontok: Ginseng radix tartalmú teakeverék kivonata (10 µl), Ginseng radix kivonatát tartalmazó kapszula kivonata (10 µl), Eleutherococci radix kivonatát tartalmazó kapszula kivonata (10 µl).

Ellenőrző kérdések

- A vizsgált kivonatok közül melyik tartalmaz nagy mennyiségben ginzénózidokat?
- Miért nem (vagy csak halványan) látszanak a teakeverék kivonatában a ginzénózidok a rétegekromatogramon?
- Mi utal arra, hogy a tea páfrányfenyőlevelet és/vagy zöld teát tartalmaz?
- Tartalmaz-e a tajgagyökér ginzénózidokat?
- Hogyan módosítaná az alkalmazott eluens összetételét, hogy alkalmas legyen az Eleutherococci radix kivonat komponenseinek vizsgálatára?

Köszönetnyilvánítás

Szerzők ezúton mondanak köszönetet **prof. dr. Báthori Máriának** az Alapvető növénykémiái ismeretek, elválasztástechnikai műveletek című fejezet megírásához nyújtott segítségéért.

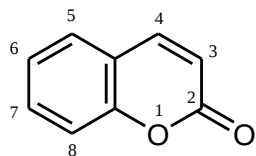
Továbbá köszönetüket fejezik ki **dr. Tóth Lászlónak** a növényfotók elkészítéséért.

4. Irodalomjegyzék

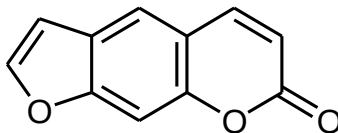
- Kremmer T, Torkos K. (eds.) *Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata*. Akadémiai Kiadó, Budapest. 2010.
- Balla J. (ed.) *A gázkromatográfia analitikai alkalmazásai*. ISBN 9630479001; 1997.
- Fekete J. (ed.) *Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata*. Edison House Kft, Budapest. 2006.
- Kremmer T, Boross L. (eds.) *Gel Chromatography. Theory, Metodology, Applications*. Akadémiai Kiadó, J. Wiley and Sons, Budapest, Chichster, New York, Brisbane-Torino, 1979.
- Kalász H, Lengyel J. (eds.) *A gyógyszerek szerkezetbeni sorsa és vizsgáló módszerei*. Semmelweis Egyetem, Doktori Iskola, Gyógyszertudományok, Budapest. 2004.
- Nyiredy Sz. (ed.) *Planar Chromatography – A Retrospective View for the Third Milleneum*, Springer Verlag, Budapest. 2001.
- Tyihák E. (ed.) *A rétegekromatográfia zsebkönyve*. Műszaki Könyvkiadó, Budapest. 1979.
- Zlatkis A, Kaiser RE. (eds.) *High Performance Thin-Layer Chromatography*. Elsevier, Amsterdam, 1977.
- Kalász H, Liktör-Busa E, Báthori M. Role of Preparative Rotation Planar Chromatography in the Isolation of Ecdysteroids, *J. Liquid Chromatogr.* 29, 2095, 2006.
- Kremmer T, Boross L. (eds) *Gélkromatográfia*. Műszaki Könyvkiadó, Budapest. 1974.
- Tyihák E, Mincsovcics E, Kalász H. New planar LC technique: Overpressured TLC. *J. Chromatogr.* 174, 75, 1979.
- Szepesi G. (ed.) *Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia és gyógyszeranalitikai alkalmazásai, Gyógyszerészeti tudomány aktuális kérdései, 1. kötet*, Magyar Gyógyszerészeti Társaság, Budapest, 1987.
- Szőke É, Kéry Á. (eds.), *Farmakognózia. Növényi drogok farmakobotanikai és fitokémiai vizsgálata I-II*. Semmelweis Egyetem, Folpress, Budapest, 2003.
- Valkó K. (ed.) *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*. Kalász H, Báthori M. Basis and pharmaceutical application of thin-layer chromatography, Elsevier, Amsterdam, 439. 2000.
- Stahl E. (ed.) *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*, 2nd English Edition, Spriger, New York. 1969.
- Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás*, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2004
- Magyar Gyógyszerkönyv VII. kiadás*, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1986
- Halmai J, Novák I. *Farmakognózia*, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1963.

5. Melléklet

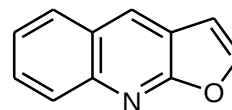
A tanult vegyületek alapvázai



kumarinváz

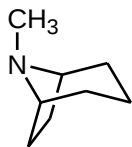


furokumarinváz

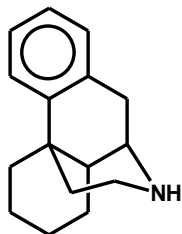


furokinolinváz

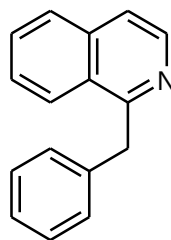
54. ábra Rutae herba vegyületeinek alapvázai



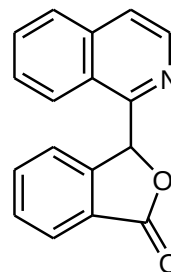
tropánváz



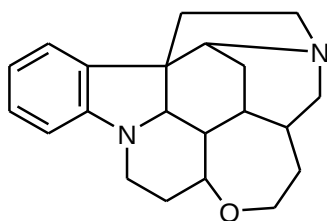
morfinánváz



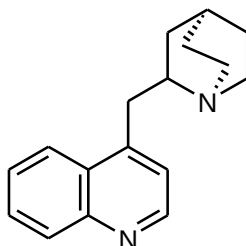
benzil-izokinolinváz



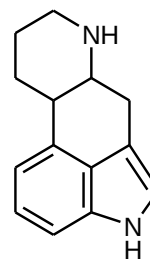
ftalid-izokinolinváz



sztrichnánváz

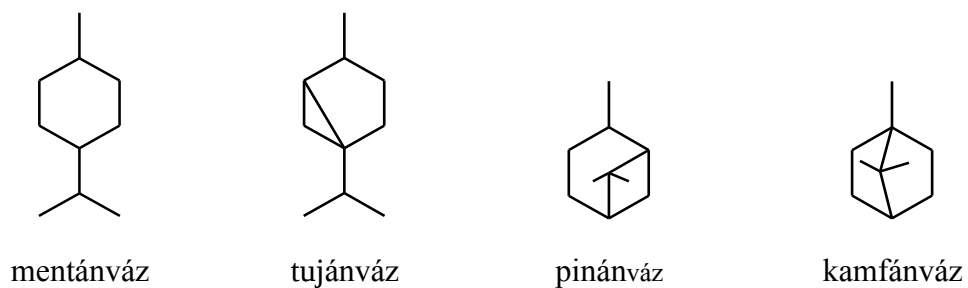


rubánváz

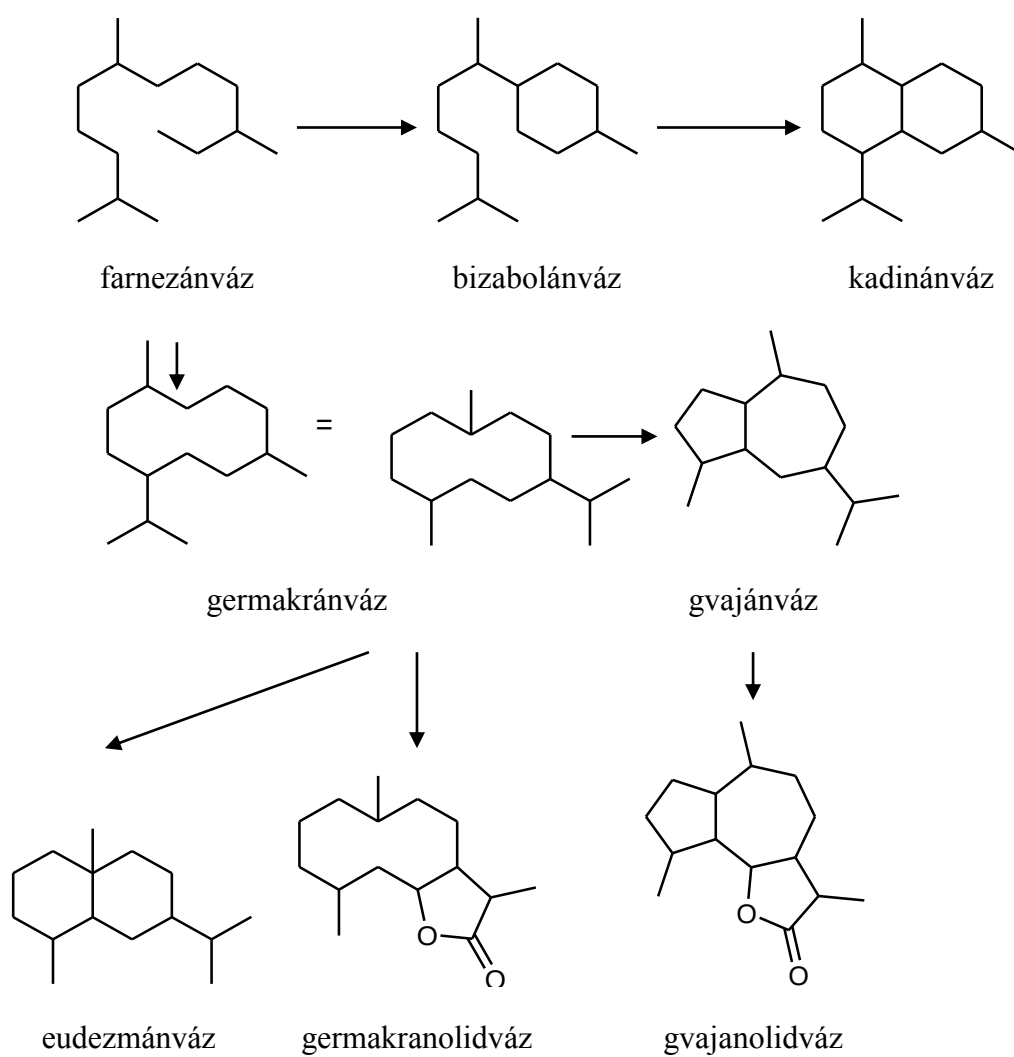


ergolinváz

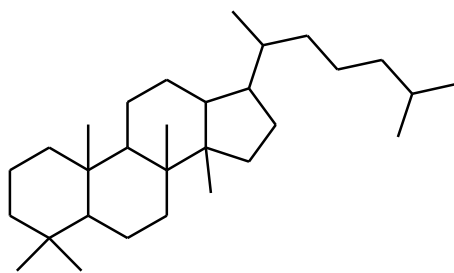
55. ábra Alkaloid típusú vegyületek alapvázai



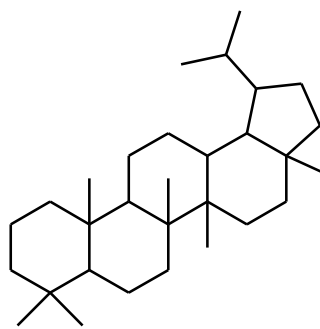
56. ábra Monoterpén típusú vegyületek alapvázai



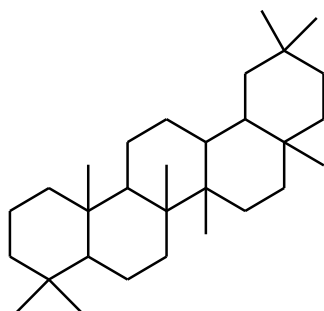
57. ábra Szeszkviterpén típusú vegyületek alapvázai



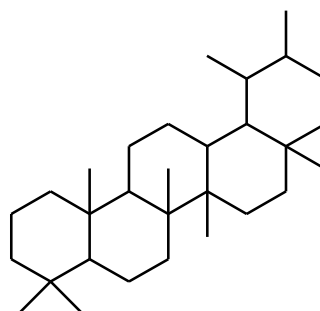
dammaránváz



lupánváz

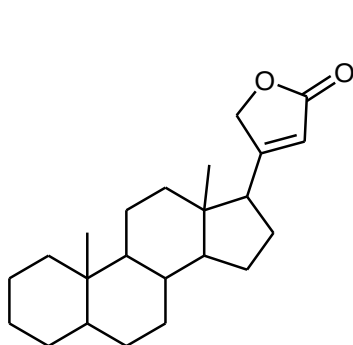


oleanánváz

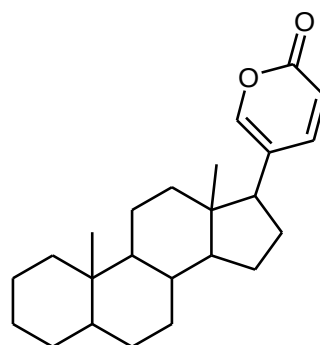


urzánváz

58. ábra Triterpén típusú vegyületek alapvázai

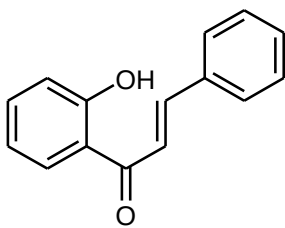


kardenolidváz

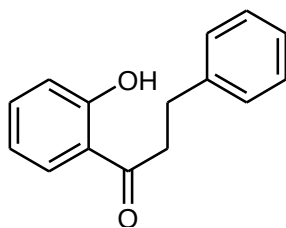


bufadienolidváz

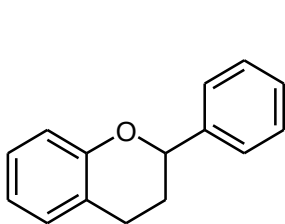
59. ábra Szívreható glikozidok alapvázai



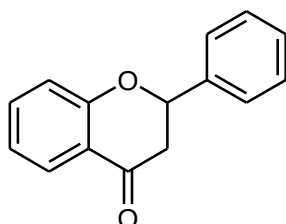
kalkonváz



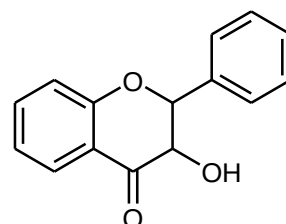
dihidrokalkonváz



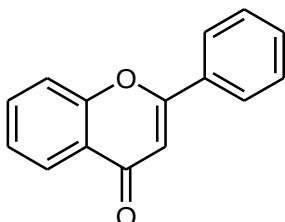
flavánváz



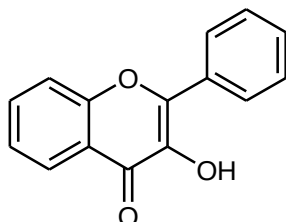
flavánonváz



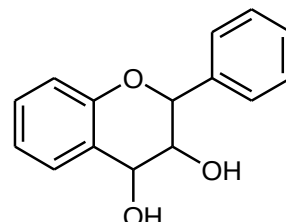
flavánonolváz



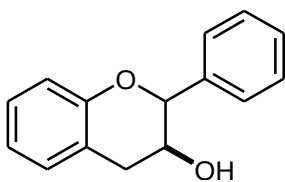
flavonváz



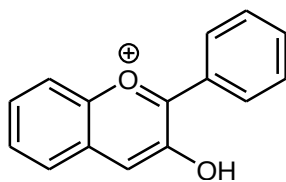
flavonolváz



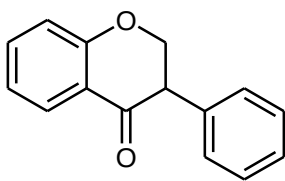
leukocianidinváz



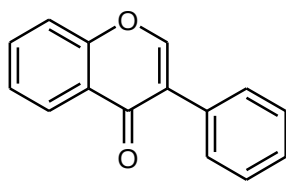
katechinváz



antocianidinváz

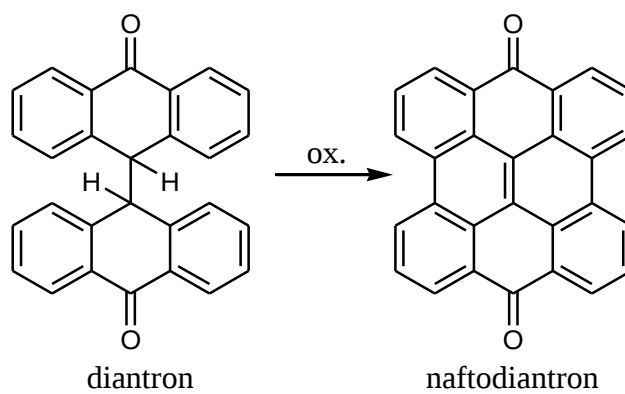
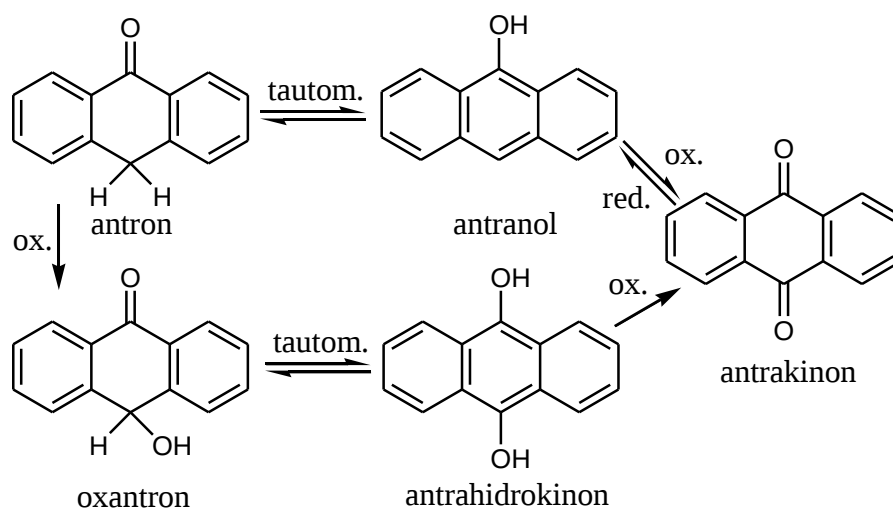


izoflavánon



izoflavon

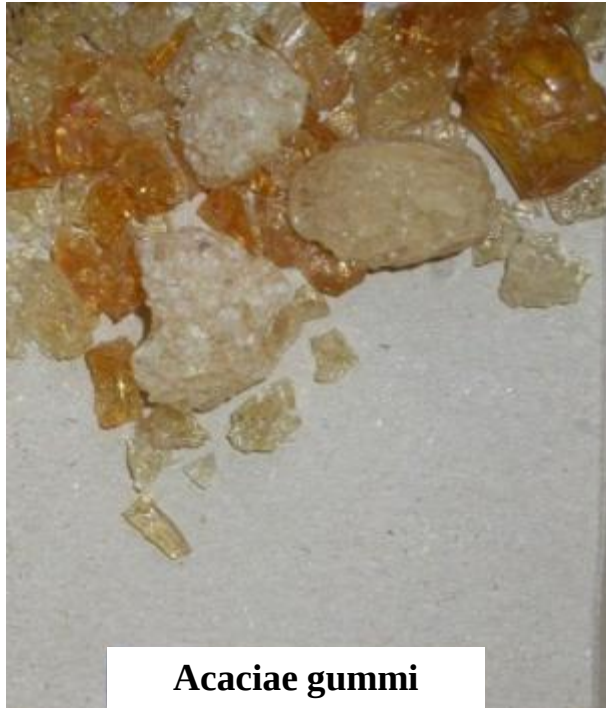
60. ábra Flavonoid típusú vegyületek alapvázai

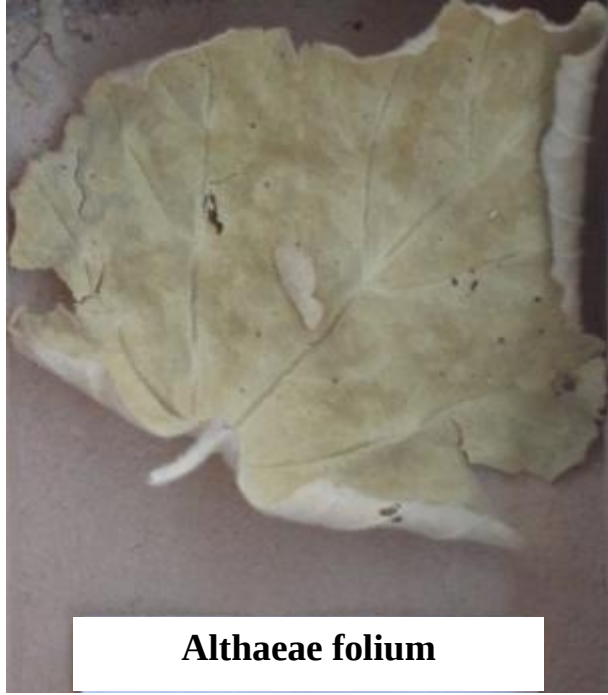


61. ábra Antranoid típusú vegyületek alapvázai

Plantae medicinales in toto

I. félév





Althaeae folium



Althaeae radix



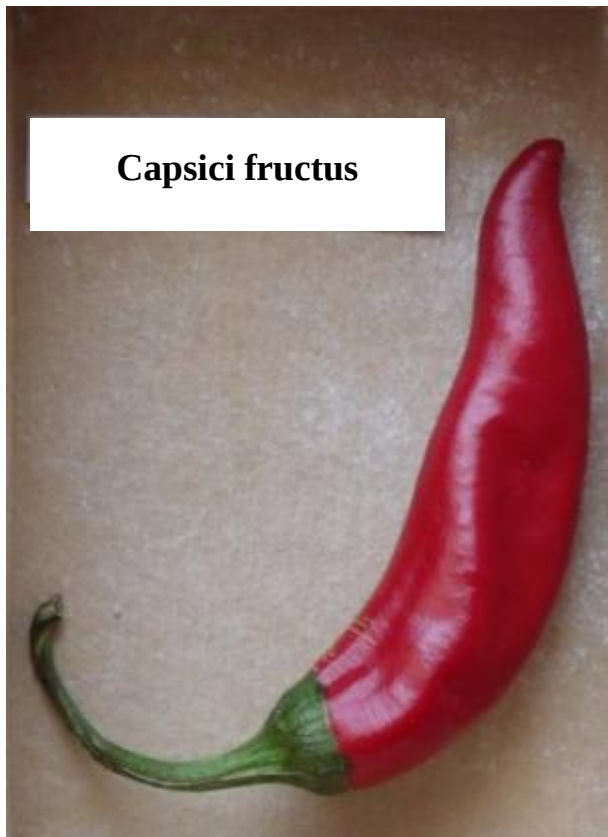
Belladonnae folium



Belladonnae radix



Cacao semen



Capsici fructus



Cinchonae cortex



Coffeae semen



Colae semen



Conii fructus

Cucurbitae semen



Echinaceae purpureae radix





Equiseti herba



Lanugo gossypii absorbens



Graminis rhizoma



Hyoscyami folium



Ipecacuanhae radix



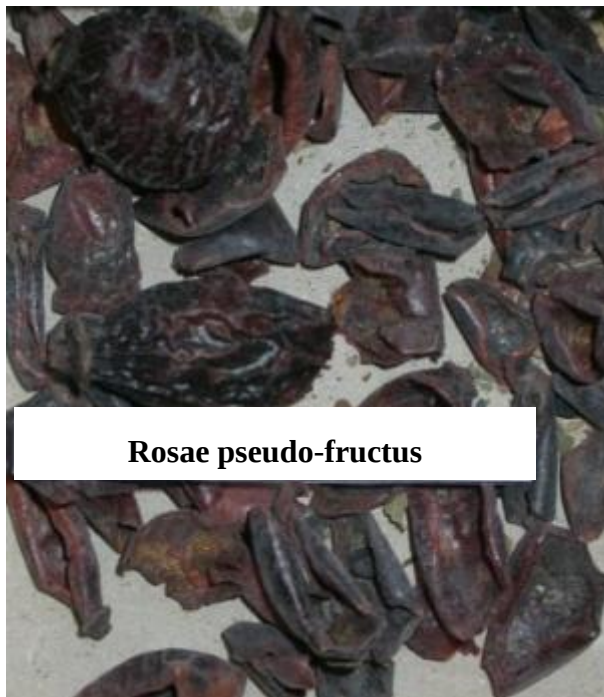
Lini semen

Malvae sylvestris flos



Plantaginis lanceolatae folium







Rutae herba



Secale cornutum



Stramonii folium



Strychni semen



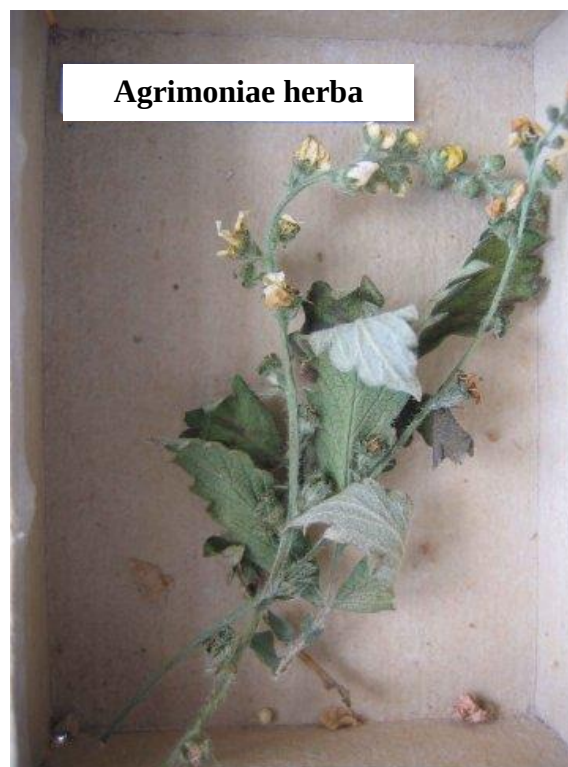
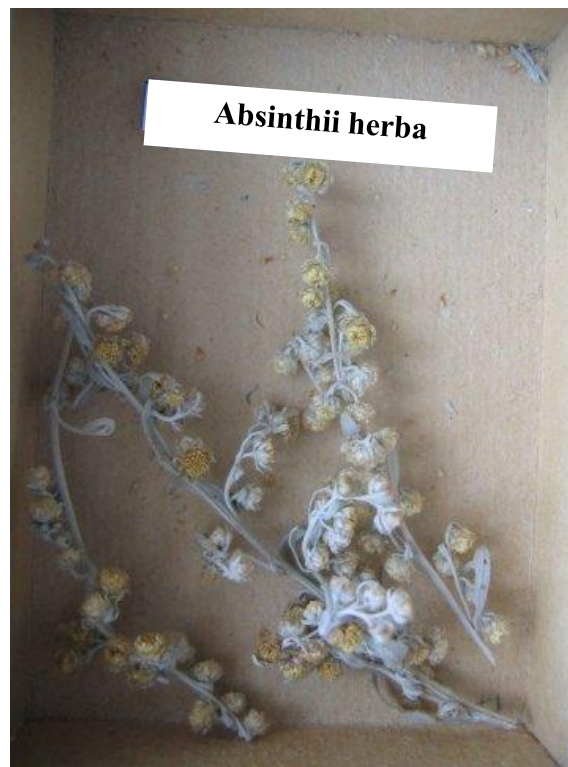
Theae folium

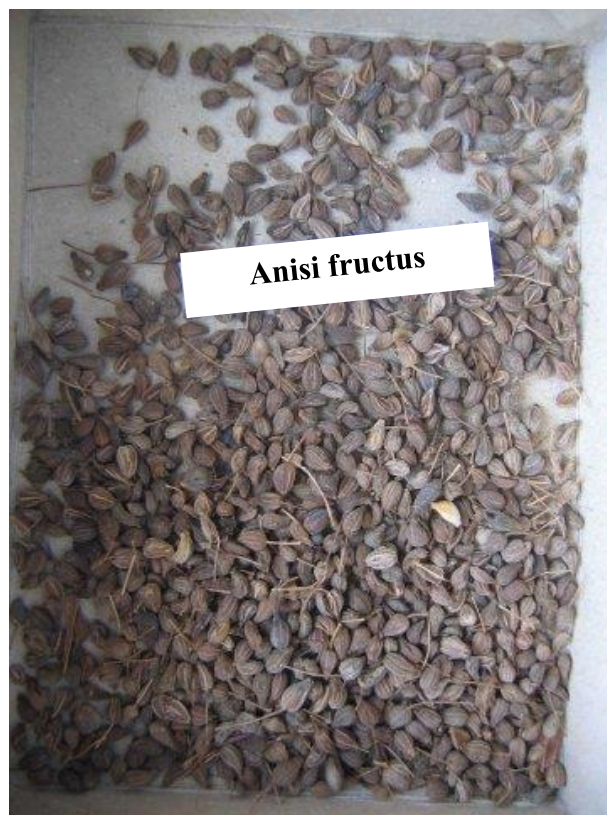
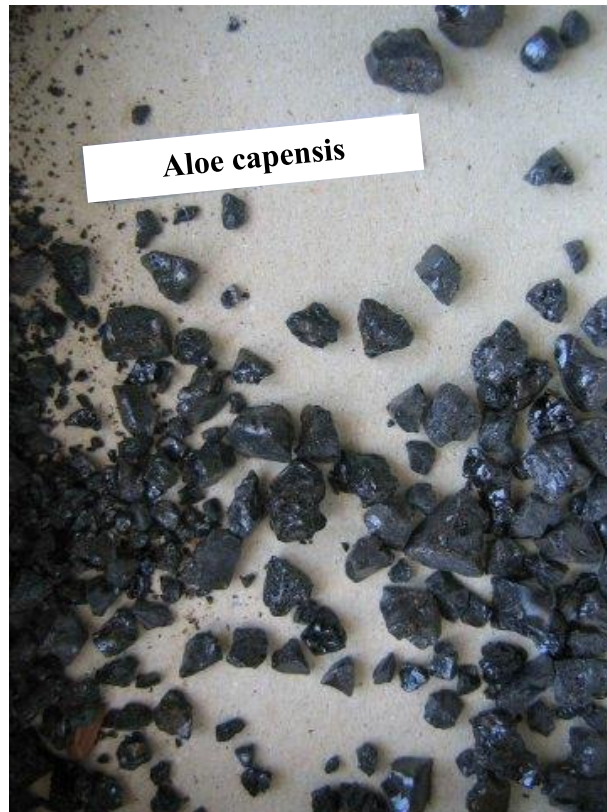


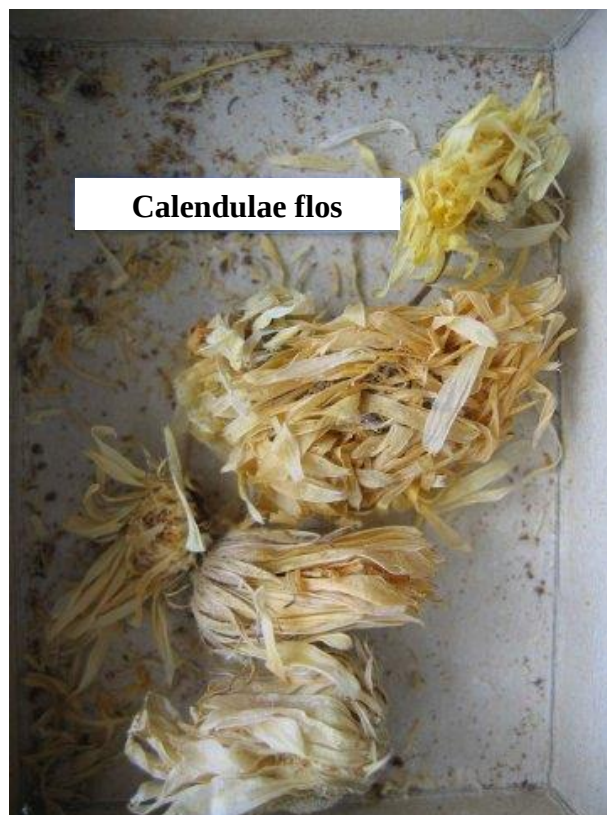
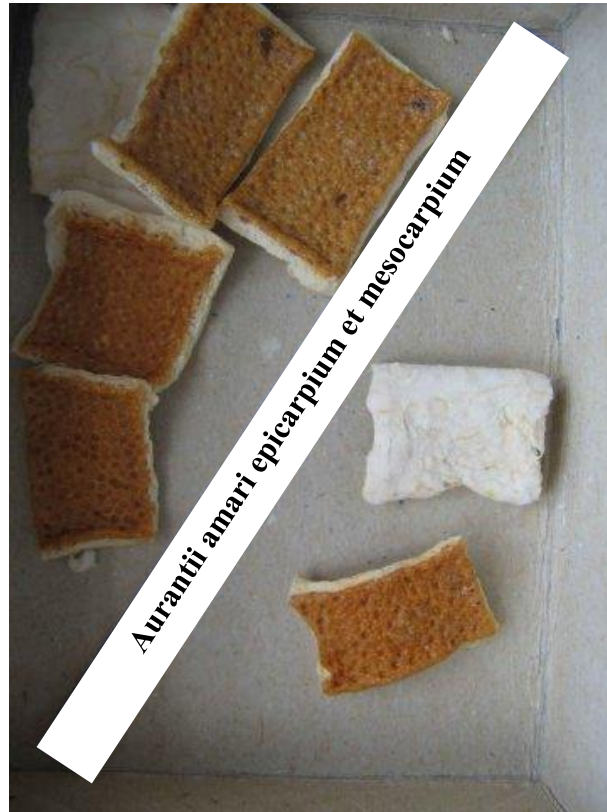
Tragacantha



II. félév



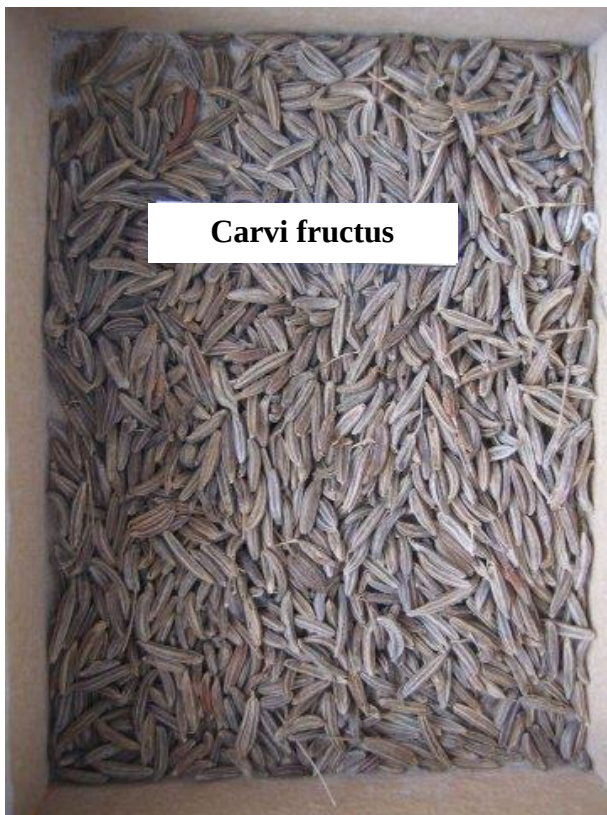




Cannabis sativae herba



Carvi fructus

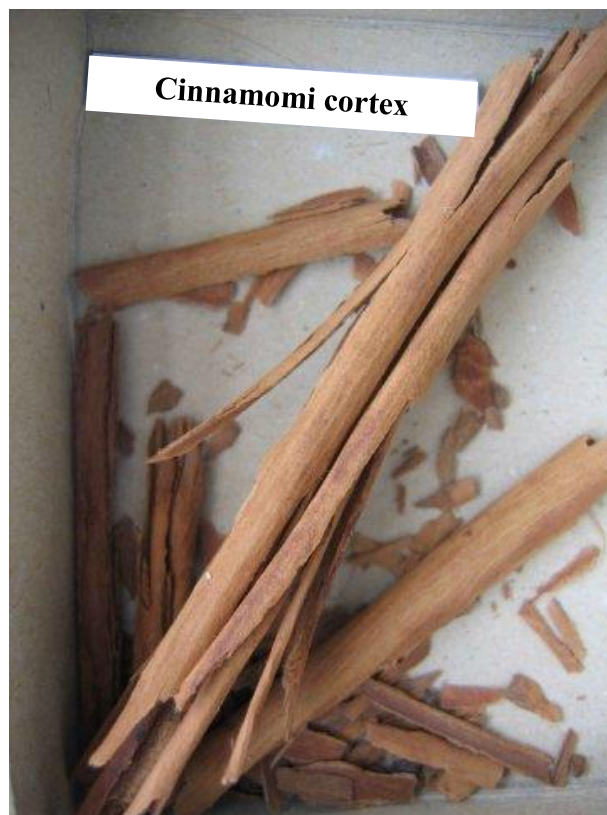




Caryophylli flos



Chamomillae romanae flos





Cnici benedicti herba



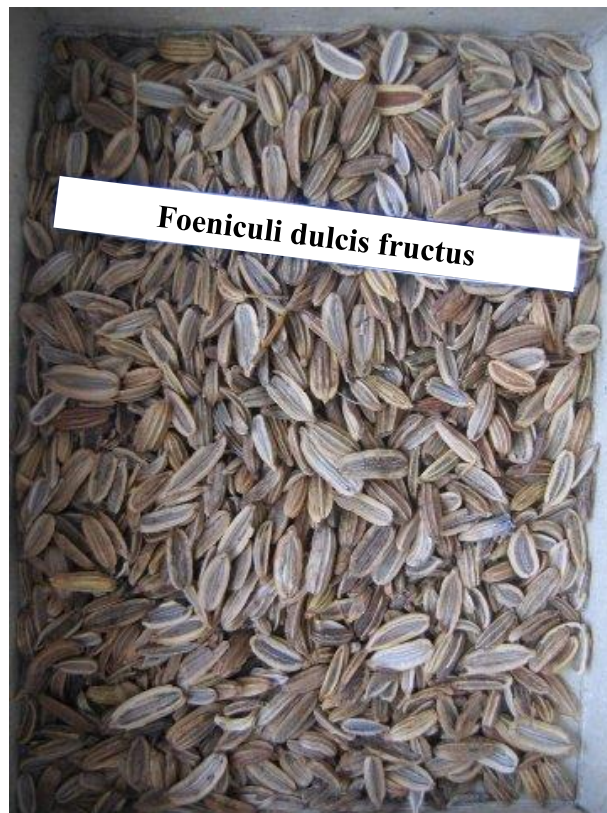
Coriandri fructus

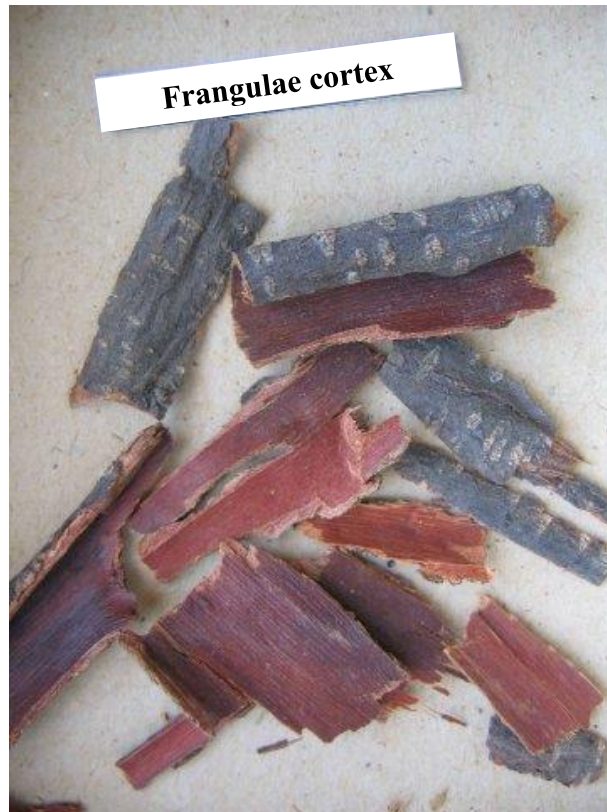
Crataegi folium cum flore

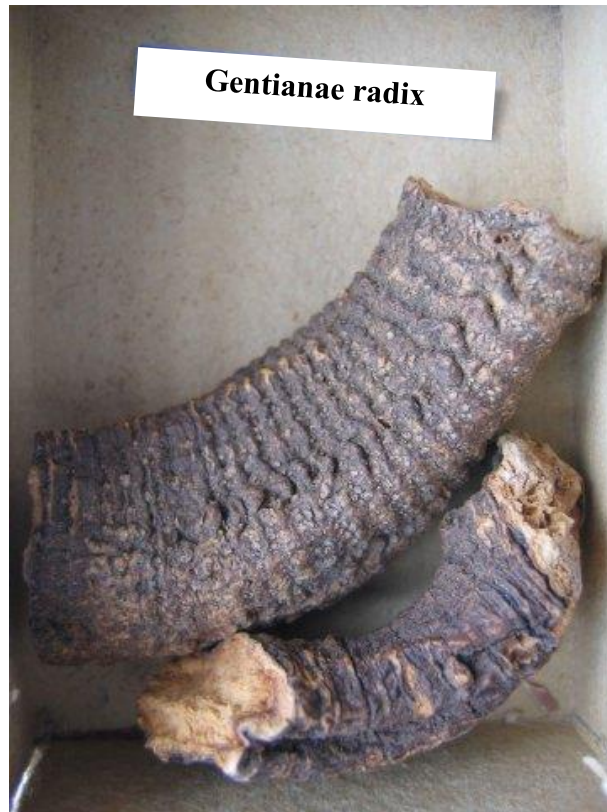


Digitalis purpureae folium







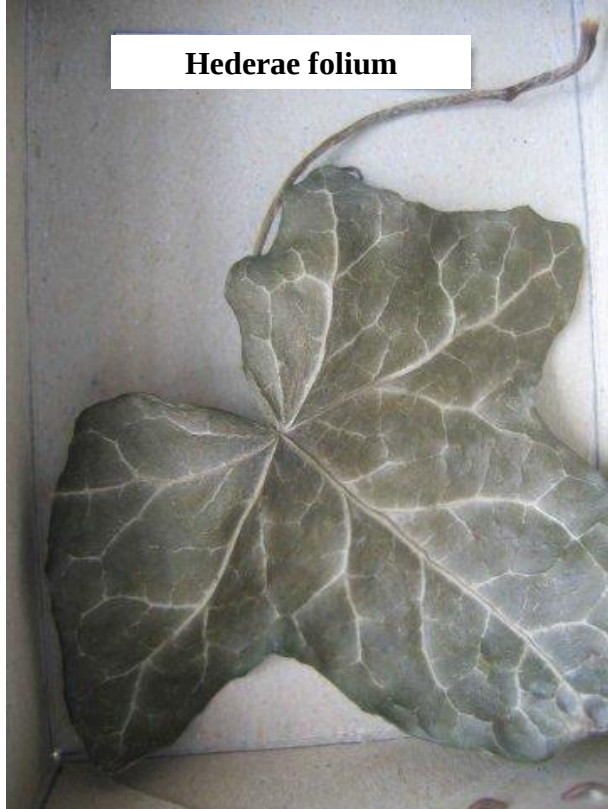


Gentianae radix

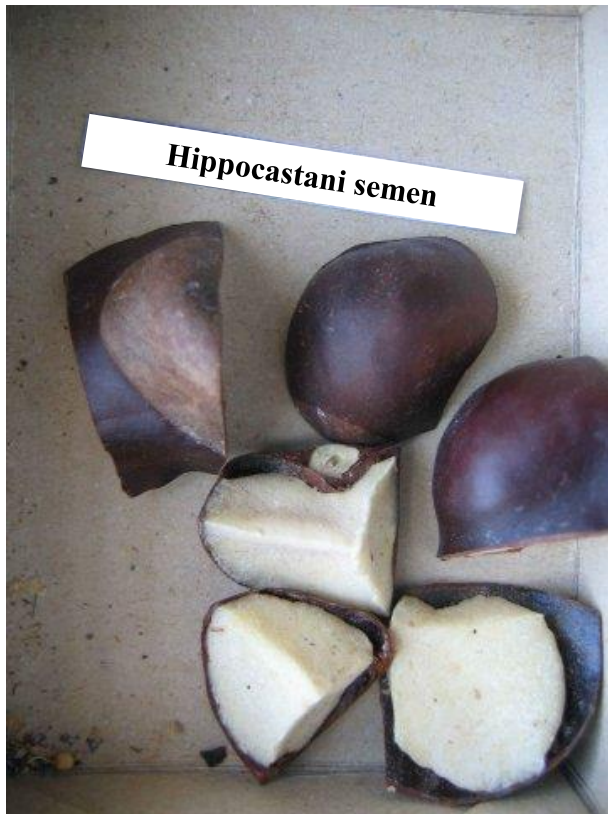


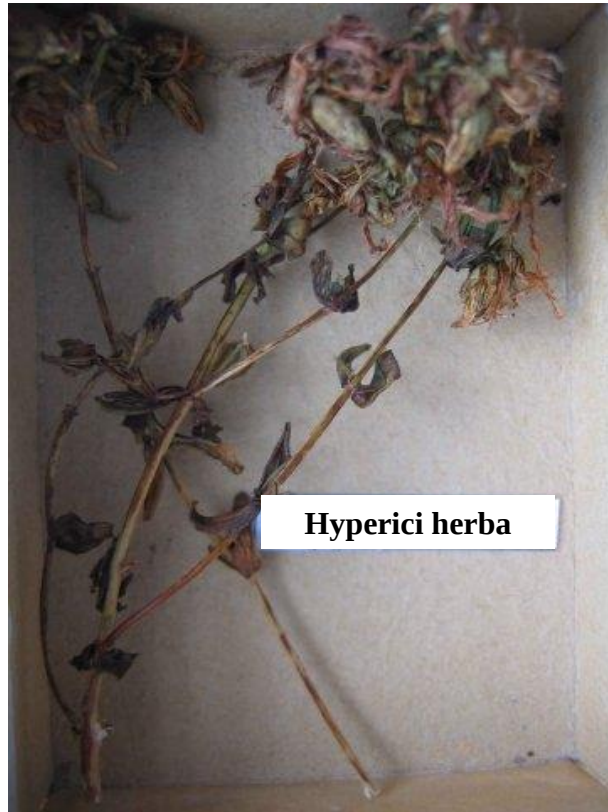
Ginkgonis folium

Hederae folium



Hippocastani semen





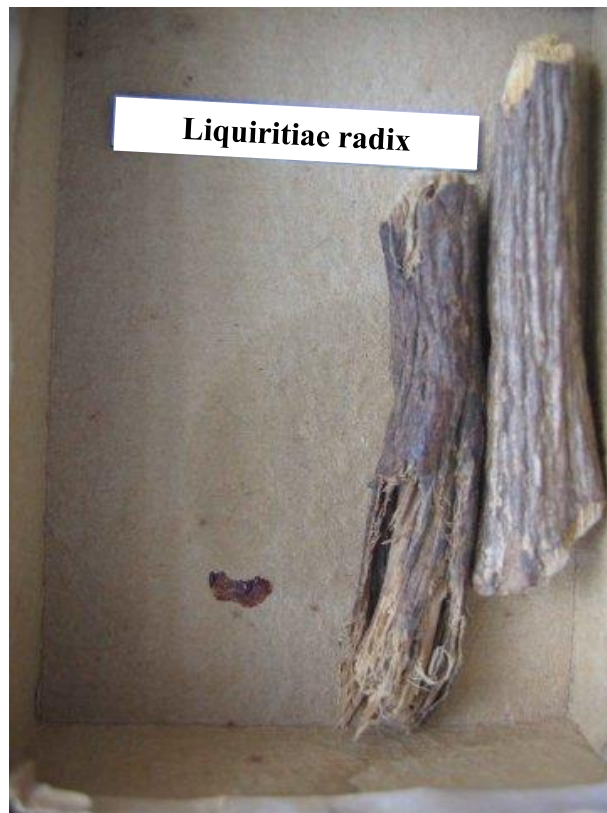
Hyperici herba



Juniperi galbulus



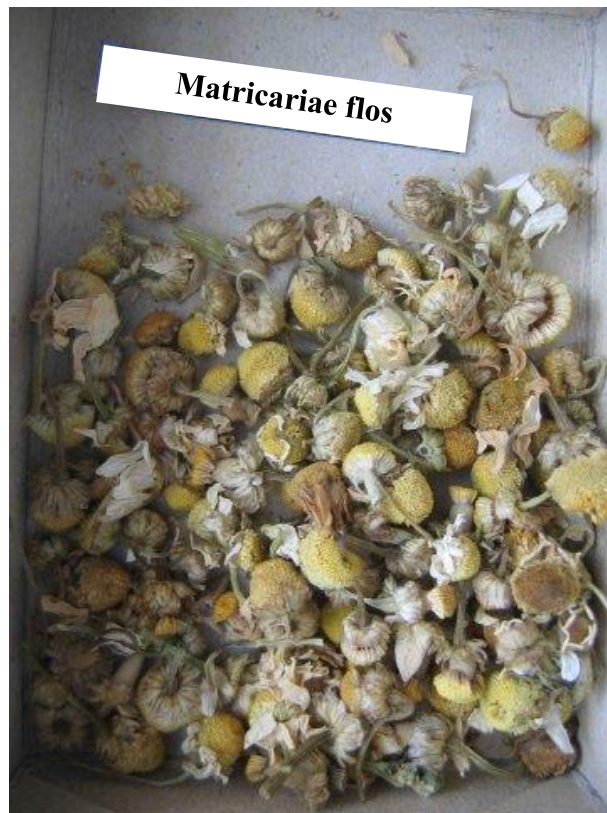
Lavandulae flos



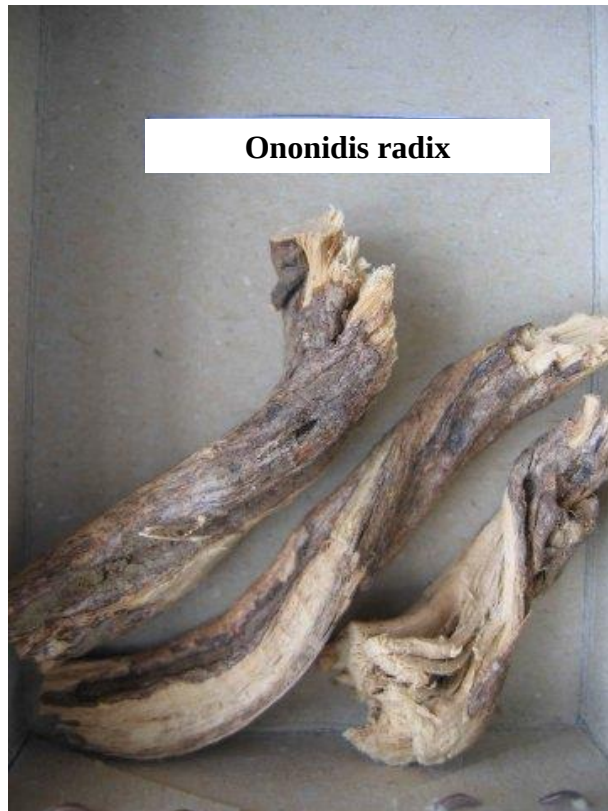
Liquiritiae radix

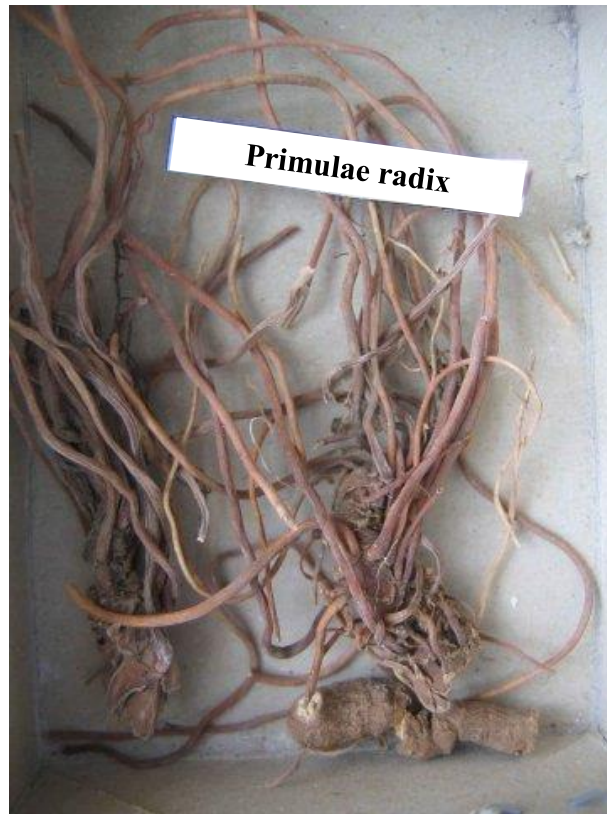


Marubii herba

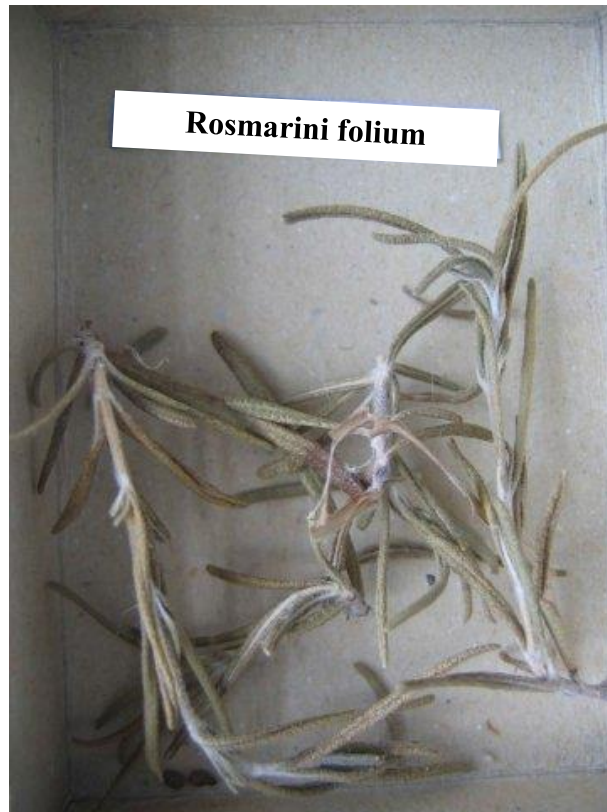


Matricariae flos



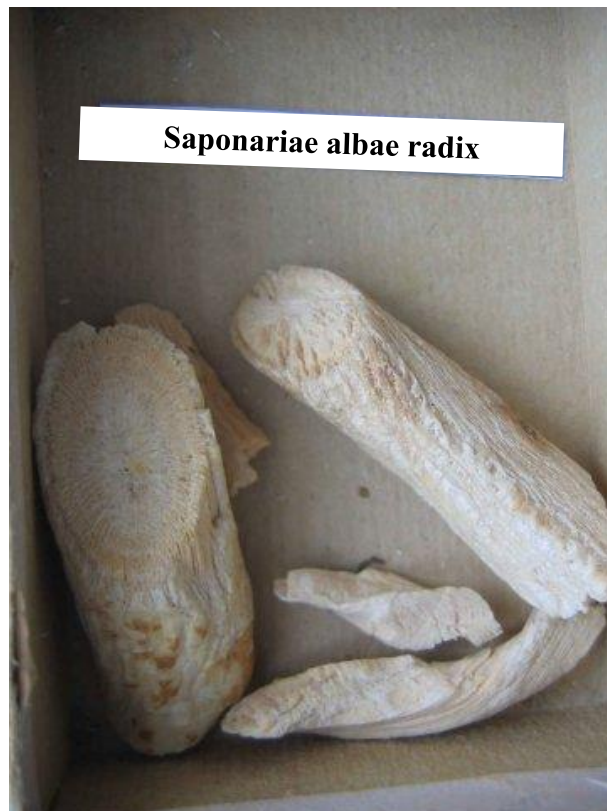




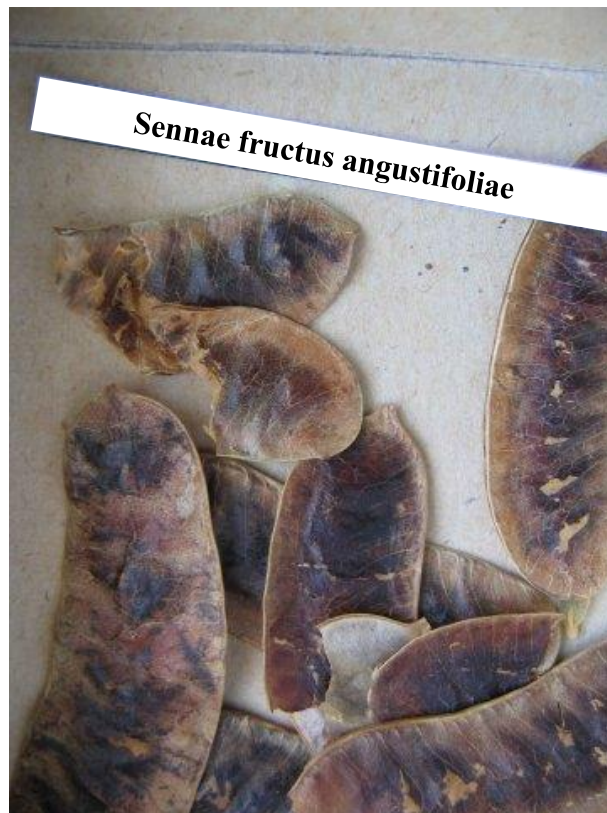




Sambuci flos

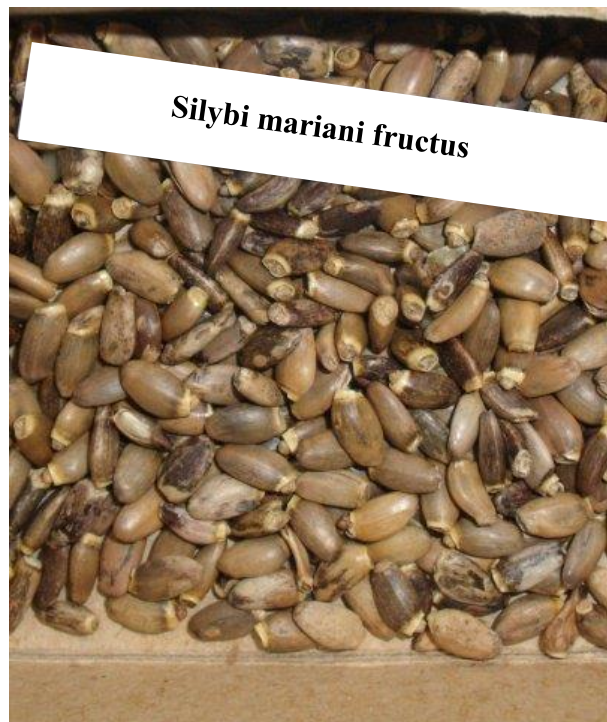


Saponariae albae radix



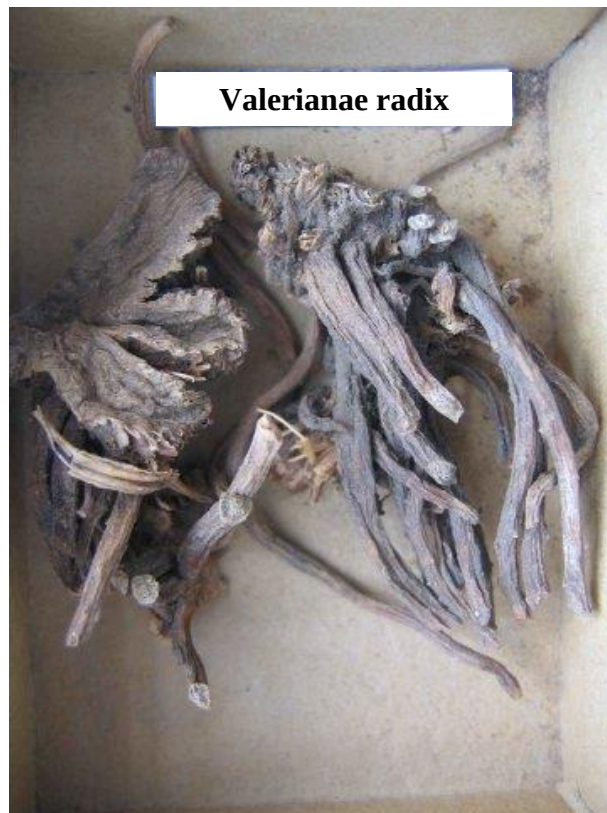


Serpylli herba



Silybi mariani fructus





NÖVÉNY ÁBRÁK

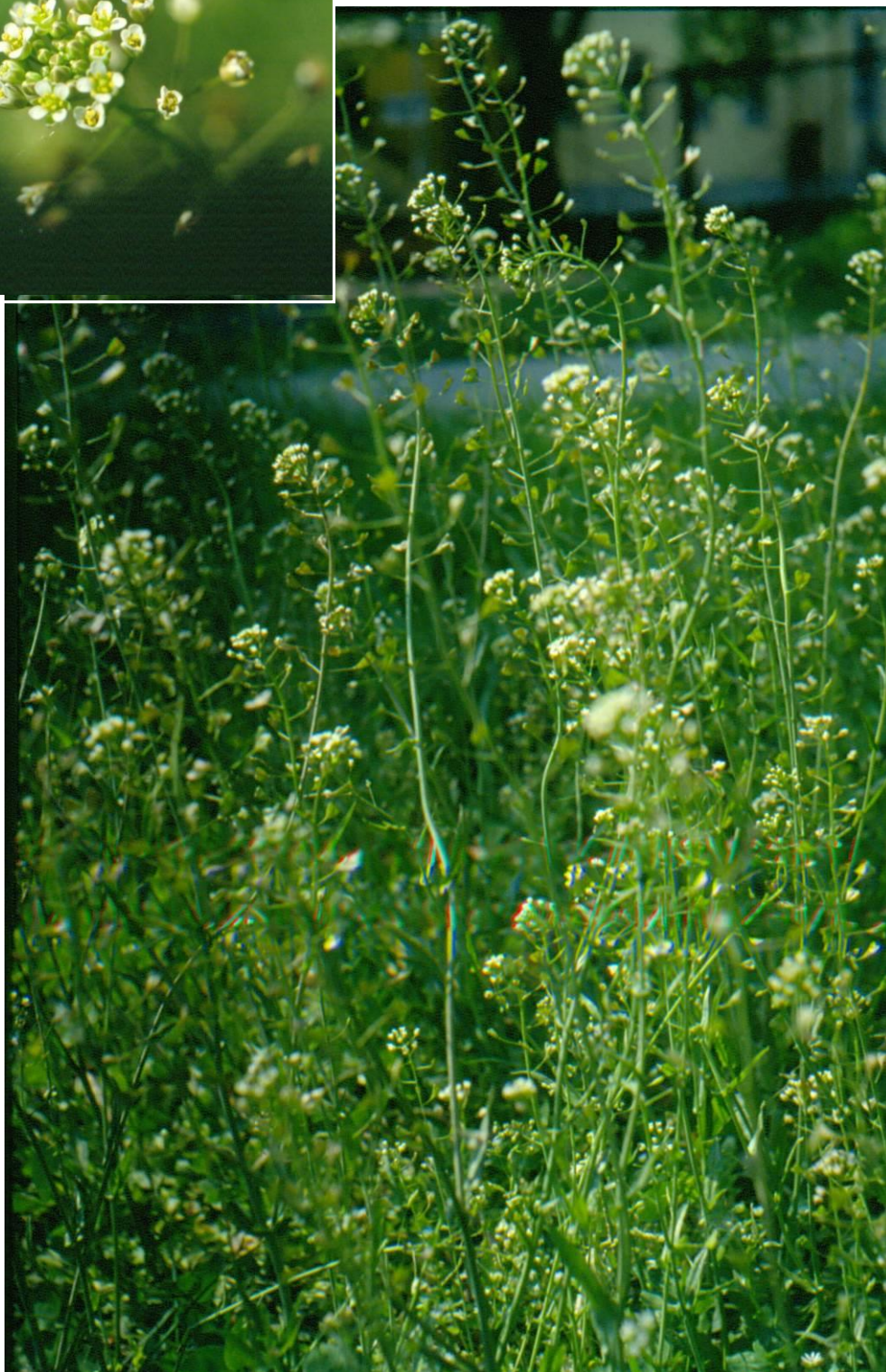
I. félév



Berberis vulgaris, sóska

Berberidaceae

Berberidis radices cortex, borbolya gyökérkéreg



Capsella bursa-pastoris, pásztortáska

Brassicaceae

Bursae pastoris herba, pásztortáska virágos hajtás



Capsicum annuum, paprika

Solanaceae

Capsici fructus, paprikatermés



Chelidonium majus, vérehulló fecskefű

Papaveraceae

Chelidonii herba, vérehulló fecskefű virágos hajtás



Colchicum autumnale, őszi kikerics

Liliaceae

Colchici semen, őszi kikerics mag,
Colchici tuber, őszi kikerics hagymagumó



Conium maculatum, foltos bürök

Apiaceae

Conii fructus, foltos bürök termés



Datura stramonium, csattanó maszlag

Solanaceae

Stramonii folium, csattanó maszlag levél



Equisetum arvense, mezei zsurló

Equisetaceae

Equiseti herba, mezei zsurló meddő hajtás



Fumaria officinalis, orvosi füstike

Fumariaceae

Fumariae herba, orvosi füstike virágos hajtás



Hyoscyamus niger, beléndek

Solanaceae

Hyoscyami folium, beléndeklevél



Linum usitatissimum, házi len

Linaceae

Lini semen, házi lenmag

Lini oleum virginale, natív lenolaj



Ricinus communis, ricinus

Euphorbiaceae

Ricini semen, ricinusmag

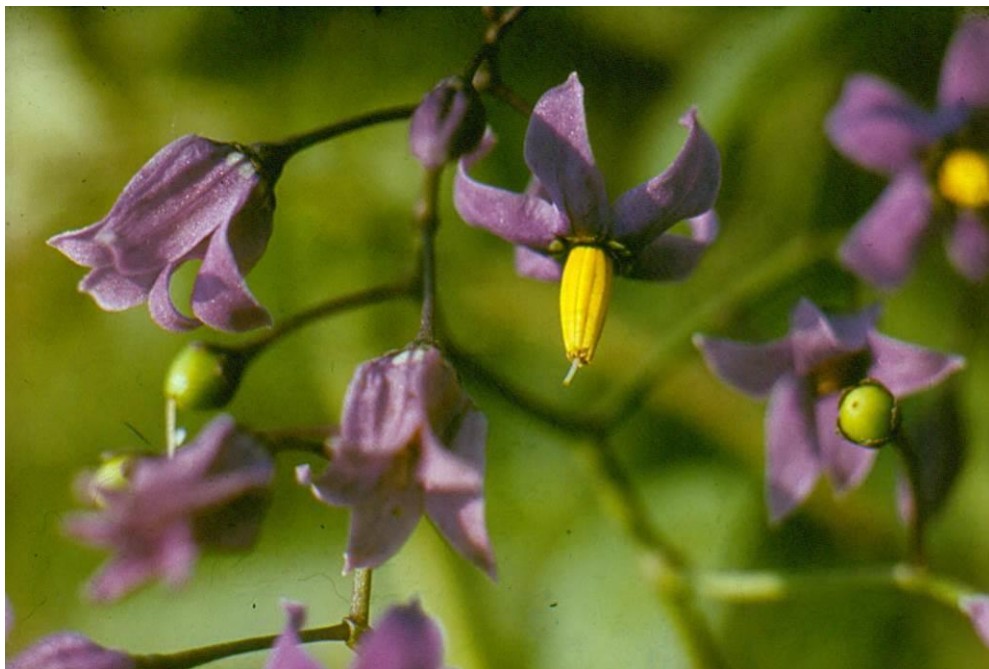
Ricini oleum virginale, natív ricinusolaj



Rosa canina, gyepűrózsa, vadrózsa

Rosaceae

Rosae pseudo-fructus, csipkerózsa átermés



Solanum dulcamara, keserű csucsor

Solanaceae

Dulcamarae stipes, keserű csucsor szár



Tussilago farfara, martilapu
Asteraceae
Farfarae flos, martilapu virágzat



Tussilago farfara, martilapu

Asteraceae

Farfarae folium, martilapu levél



Veratrum album, fehér zászpa

Liliaceae

Veratri rhizoma et radix, fehér zászpa gyökértörzs és gyökér



Viscum album, fehér fagyöngy

Loranthaceae

Visci stipes, fehér fagyöngy leveles hajtás

Növények

II. félév



Achillea millefolium, közönséges cickafark

Asteraceae

Millefolii herba, közönséges cickafark virágos hajtás



Adonis vernalis, tavaszi hérics

Ranunculaceae

Adonidis herba, tavaszi hérics virágos hajtás



Aesculus hippocastanum, vadgesztenye

Hippocastanaceae

Hippocastani semen, vadgesztenye mag



Angelica archangelica, orvosi angyalgyökér

Apiaceae

Angelicae radix, orvosi angyalgyökér



Arctium lappa, közönséges bojtorján

Asteraceae

Bardanae radix, közönséges bojtorján gyökér



Arnica montana, hegyi árnika

Asteraceae

Arnicae flos, hegyi árnika virágzat



Artemisia absinthium, fehér üröm

Asteraceae

Absinthii herba, fehér üröm leveles vagy virágos hajtás



Artemisia vulgaris, fekete üröm

Asteraceae

Artemisia vulgaris herba, fekete üröm virágos hajtás



Asarum europaeum, kapotnyak

Aristolochiaceae

Asari rhizoma kapotnyak, gyökértörzs



Asperula odorata, szagos müge

Rubiaceae

Asperulae herba, szagos müge virágos hajtás



Calendula officinalis, körömvirág

Asteraceae

Calendulae flos, körömvirág



Cannabis sativa, kender

Cannabaceae

Cannabis herba, kender virágos hajtás



Carum carvi, fűszerkömény

Apiaceae

Carvi fructus, köménytermés



Centaurium erythraea, kis ezerjófű

Gentianaceae

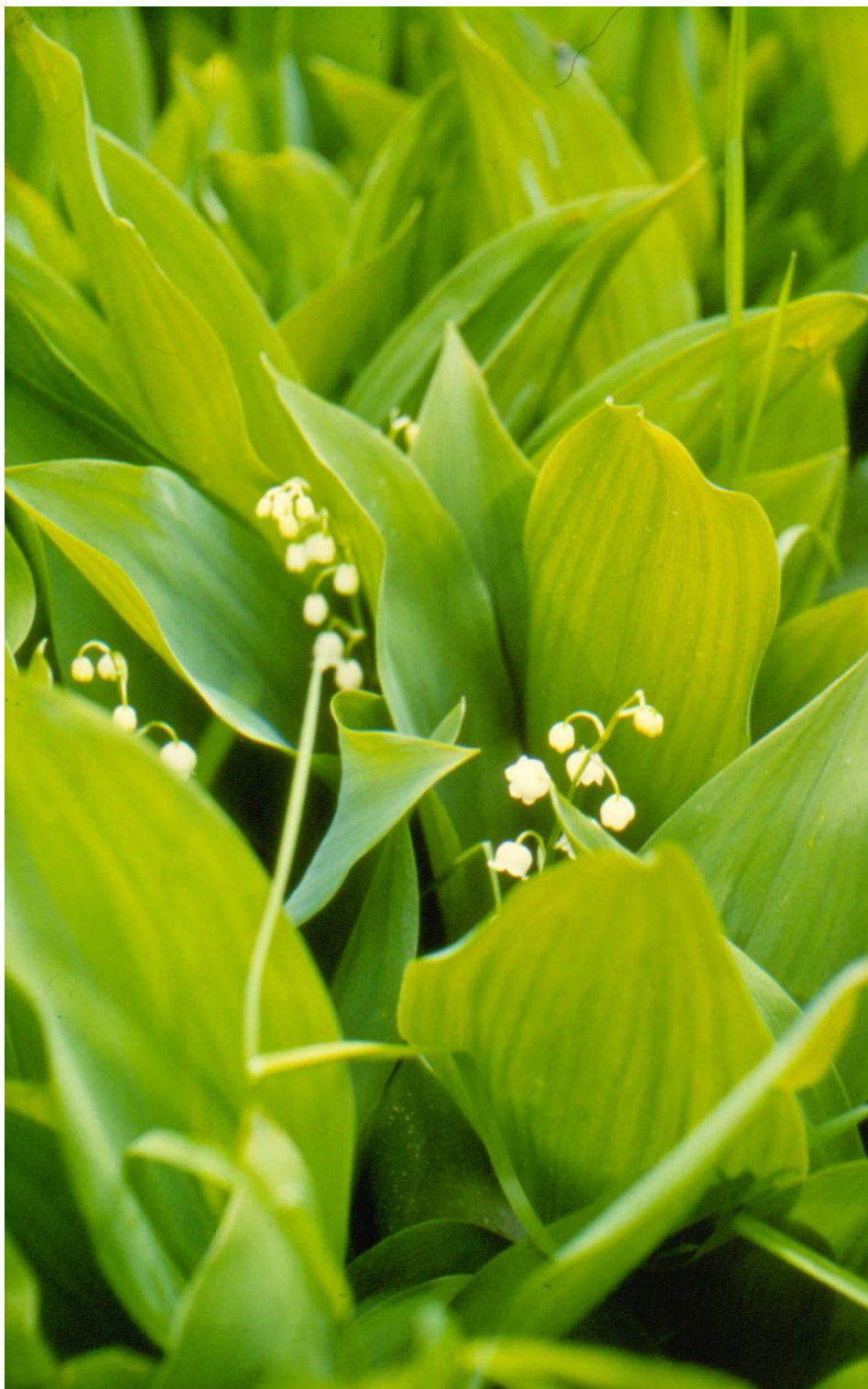
Centaurii herba, ezerjófű virágos hajtás



Cichorium intybus, mezei katáng

Asteraceae

Cichorii intibi radix, mezei katáng gyökér



Convallaria majalis, májusi gyöngyvirág

Liliaceae

Convallariae herba, májusi gyöngyvirág virágos hajtás



Crataegus laevigata, cseregalagonya

Rosaceae

Crataegi folium cum flore, galagonya virágos hajtásvég

Crataegi fructus, galagonyatermés



Digitalis lanata, gyapjas gyűszűvirág

Scrophulariaceae

Digitalis lanatae folium, gyapjas gyűszűvirág levél



Digitalis purpurea, piros gyűszűvirág

Scrophulariaceae

Digitalis folium, piros gyűszűvirág levél



Euphrasia rostkoviana, orvosi szemvidító

Scrophulariaceae

Euphrasiae herba, szemvidítófű virágos hajtás



Gypsophila paniculata, fátyolvirág

Caryophyllaceae

Saponariae albae radix, fátyolvirág gyökér



Humulus lupulus, komló

Cannabaceae

Lupuli flos, komlótoboz



Hypericum perforatum, közönséges orbáncfű

Hypericaceae

Hyperici herba, közönséges orbáncfű virágos hajtás



Hyssopus officinalis, izzóp

Lamiaceae

Hyssopi herba, izzóp virágos hajtás



Inula helenium, örvénygyökér

Asteraceae

Inulae radix, örvénygyökér



Juglans regia, közönséges diófa

Juglandaceae

Juglandis folium, diófalevél



Juniperus communis, közönséges boróka

Cupressaceae

Juniperi galbulus, boróka tobozbogyó



Lamium album, fehér árvacsalán

Lamiaceae

Lamii albi herba, fehér árvacsalán virágos hajtás



Lavandula angustifolia, valódi levendula

Lamiaceae

Lavandulae flos, valódi levendula virág



Levisticum officinalis, lestyán

Apiaceae

Levistici radix, lestyángyökér



Malva neglecta, papsajtmályva

Malvaceae

Malvae neglectae folium, papsajtmályva levél



Malva sylvestris, erdei mályva

Malvaceae

Malvae sylvestris flos, erdei mályvavirág

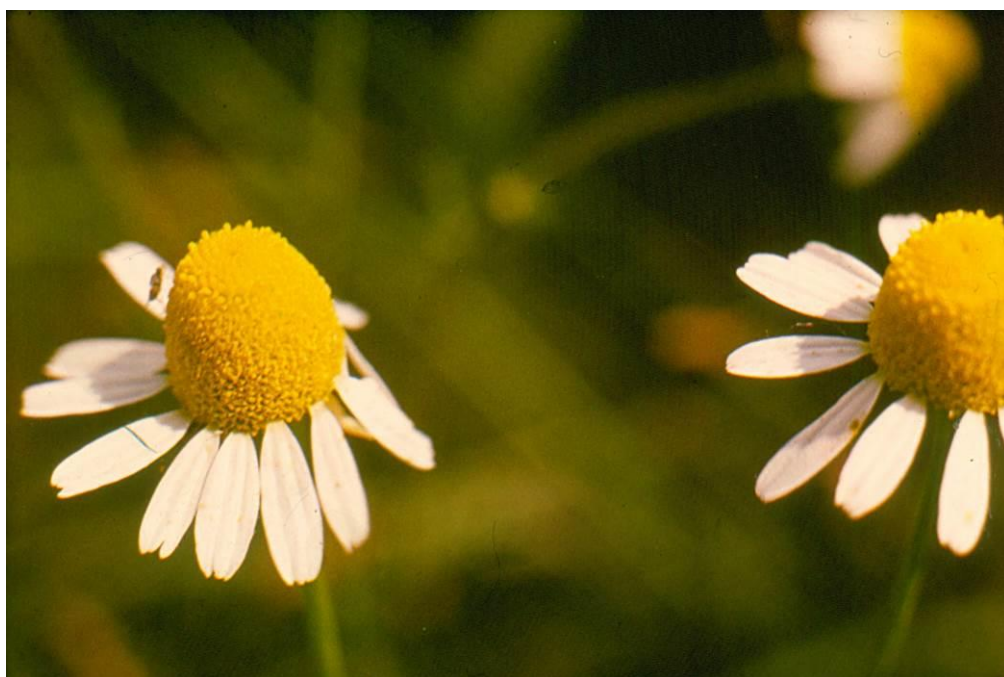
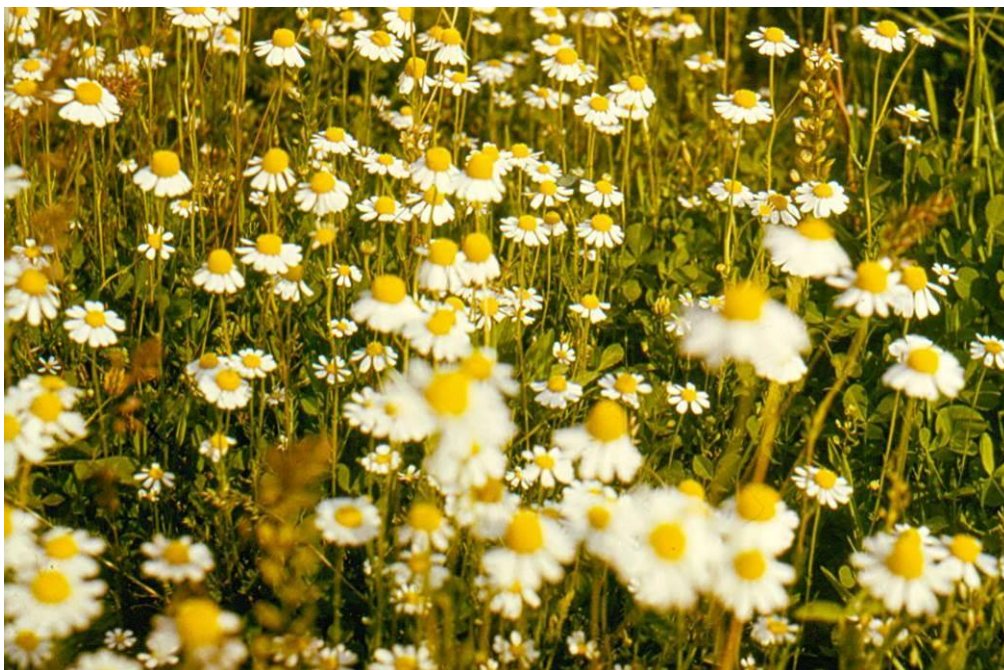
Malvae folium, erdei mályva levél



Marrubium vulgare, orvosi pemetefű

Lamiaceae

Marrubii herba, pemetefű virágos hajtás



Matricaria recutita, orvosi székfű, kamilla

Asteraceae

Matricariae flos, kamillavirágzat



Melilotus officinalis, orvosi somkóró

Fabaceae

Meliloti herba, somkóró virágos hajtás



Melissa officinalis, orvosi citromfű

Lamiaceae

Melissae folium, orvosi citromfű levél



Mentha x piperita, borsosmenta

Lamiaceae

Menthae piperitae folium, borsosmentalevél



Ononis spinosa, tövises iglice

Fabaceae

Ononidis radix, tövises iglice gyökér



Origanum vulgare, közönséges szurokfű

Lamiaceae

Origanum herba, szurokfű levél és virág



Papaver somniferum, kerti mák

Papaveraceae

Papaveris fructus, kerti mák termés

Opium crudum, nyers ópium



Petasites hybridus, vörös acesalapu

Asteraceae

Petasitidis folium, vörös acesalapu levél



Plantago lanceolata, lándzsás útifű

Plantaginaceae

Plantaginis lanceolatae folium, lándzsás útifű levél



Potentilla anserina, libapimpó

Rosaceae

Anserinae radix, libapimpó gyökér



Primula veris, tavaszi kankalin

Primulaceae

Primulae radix et rhizoma, kankalingyökér



Primula vulgaris, szártalan kankalin

Primulaceae

Primulae radix et rhizoma, kankalingyökér



Prunus spinosa, kökény

Rosaceae

Pruni spinosae flos, kökény virág



Rhamnus frangula, kutyabenge

Rhamnaceae

Frangulae cortex, kutyabengekéreg



Rubus caesius, hamvas szeder

Rosaceae

Rubi caesii folium, hamvas szeder levél



Rubus idaeus, málna

Rosaceae

Rubi idaei folium, málna levél

Rubi idaei fructus, málna termés



Ruta graveolens, kerti ruta

Rutaceae

Rutae herba, kerti ruta virágos hajtás



Sambucus nigra, fekete bodza

Caprifoliaceae

Sambuci flos, fekete bodza virág



Saponaria officinalis, szappanfű

Caryophyllaceae

Saponariae rubrae radix, szappanfűgyökér



Taraxacum officinale, pongyola pitypang

Asteraceae

Taraxaci radix, gyermekláncfű gyökér

Taraxaci herba, gyermekláncfű virágos hajtás



Thymus vulgaris, kerti kakukkfű

Lamiaceae

Thymi herba, keri kakukkfű levél és virág



Tilia cordata, kislevelű hárs

Tiliaceae

Tiliae flos, hársfavirágzat



Urtica dioica, nagy csalán

Urticaceae

Urticae folium, csalánlevél

Urticae radix, csalángyökér



Verbascum phlomoides, szőszös ökőrfarkkóró

Scrophulariaceae

Verbasci flos, ökőrfarkkóró virágpárta

A tananyag semmilyen formában nem árusítható!

SZÉCHENYI 2020



MAGYARORSZÁG

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐRE