



Katedra za farmacevtsko kemijo

# Kolonska kromatografija in kromatografija enantiomerov s stacionarno fazo s kiralnim selektorjem

# Tankoplastna kromatografija

- ◆ trdno-tekoče
- ◆ adsorpcijska kromatografija
- ◆ ponavadi ascendentna kromatografija
- ◆ SF vezana na ploščo (alu, steklo)
- ◆ uporabna večinoma za kvalitativno ločbo
  - sledenje poteka kemijskih reakcij
  - analiza homogenosti/heterogenosti vzorca
  - določanje prisotnosti neke spojine v vzorcu (uporaba standardov)



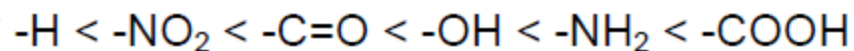
# $R_f$ zavisi od:

## ◆ izbire SF

- silikagel,  $Al_2O_3$ , reverznofazni silikagel

## ◆ kemizma spojin

- kisline potujejo v kisli MF
- baze potujejo v alkalni MF
- soli praviloma ostanejo na startu
- nevtralne spojine – vpliv funkcionalnih skupin



## ◆ mobilne faze (topilo za eluiranje, razvijalec)

- razmerje mora biti vedno enako – z dobro nasičenostjo se temu približamo

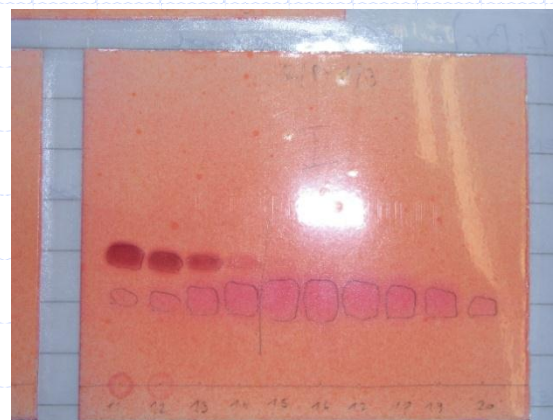
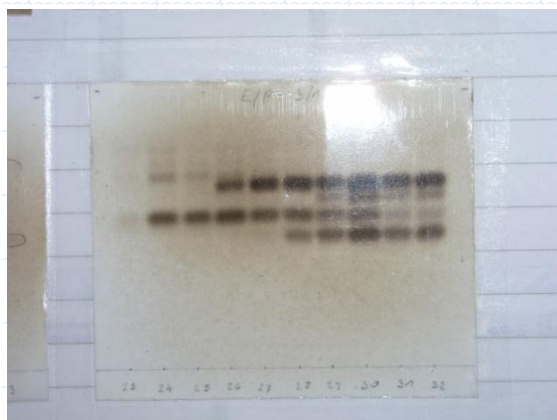
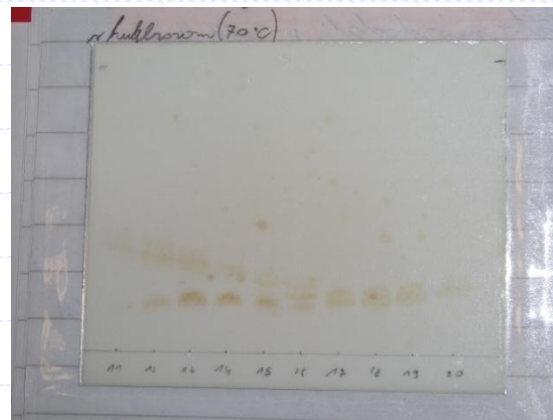
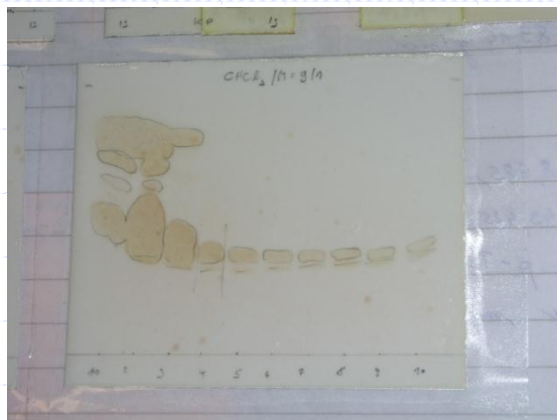
# $R_f$ zavisi od:

- ◆ kvalitete in količine adsorbenta
- ◆ stopnje aktiviranosti – stopnje posušenosti
- ◆ debeline premaza
  - razlike povzročijo deformacijo in razvlečenje lis
- ◆ množine snovi
  - prevelika množina snovi: lise so razvlečene in  $R_f$  netočen
- ◆ temperature/vlage

# Napake pri TPK

- ◆ robni efekt
- ◆ nastanek več lis
- ◆ deformacija lis
  - repi
  - brade
- ◆ lise na startu

# Primer robnega efekta in deformacije lis

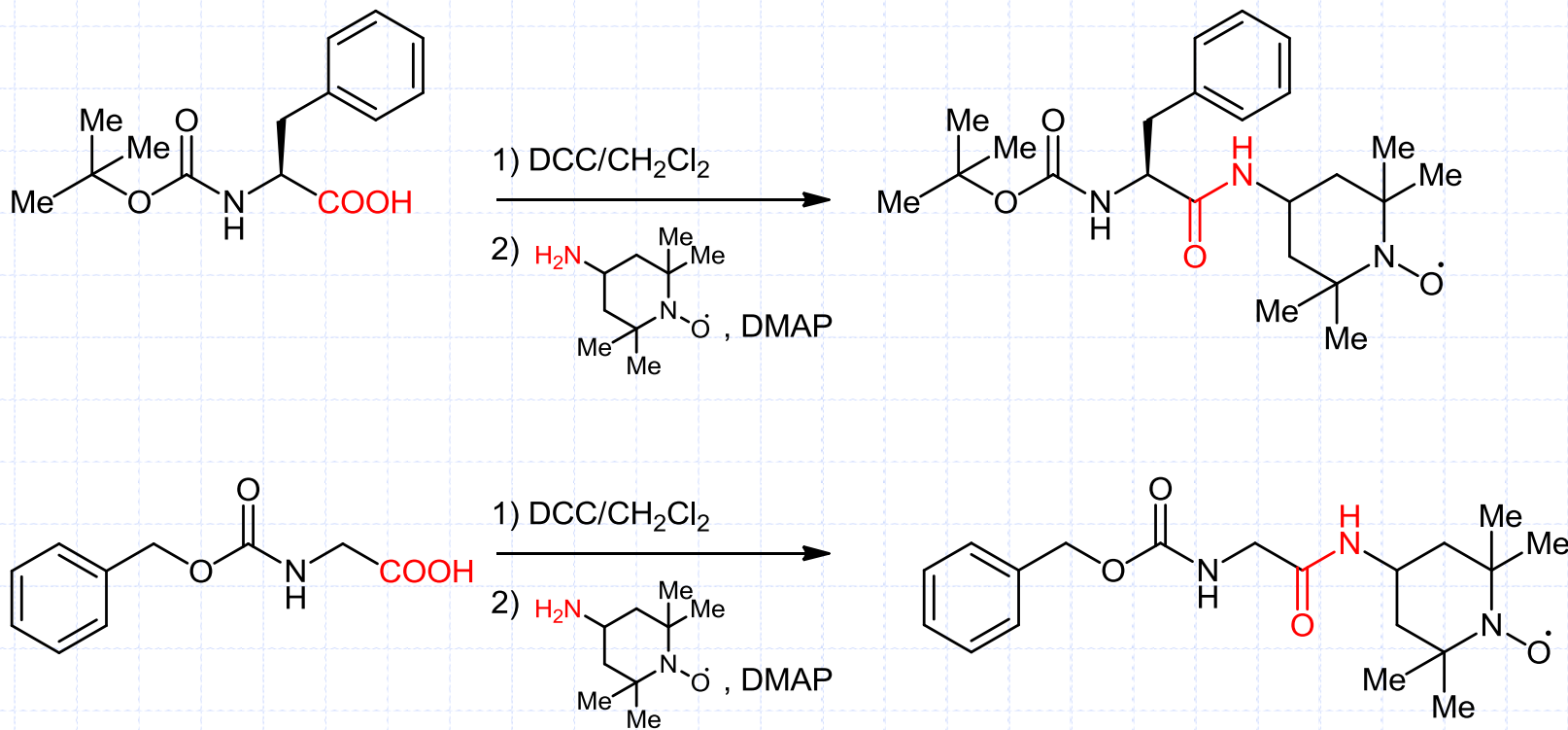


prvo in drugo TLC ploščico smo orosili z ninhidrinom, tretjo z žvepleno kislino v EtOH, zadnjo pa z rodaminom

# Kolonska kromatografija

- ◆ trdno-tekoče
- ◆ adsorpcijska kromatografija
- ◆ SF v stolpcu
- ◆ uporabna v preparativne namene za ločevanje in čiščenje spojin iz zmesi
- ◆ vrste:
  - gravitacijska kolonska kromatografija
  - "flash" kolonska kromatografija

# Reakcijska zmes za ločevanje s kolonsko kromatografijo



◆ nečistote: izhodne spojine, stranski produkti

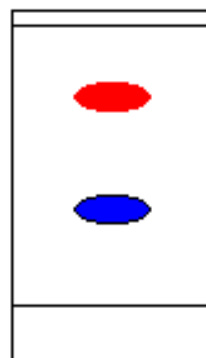


# Kolonska kromatografija

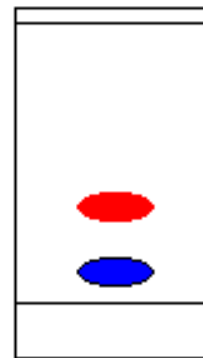
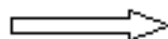
1) izbira optimalne MF s pomočjo TPK

- ločba v izbrani MF naj bo čim boljša
- ustrezen  $R_f$  dosežemo s spremembo bolj lipofilne komponente MF

dobra ločba  
 $R_f$  komponent  
previsok



DKM/M=4/1



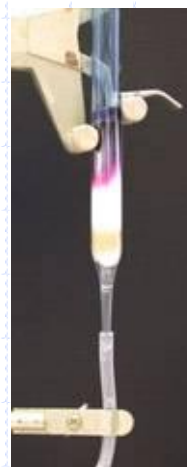
DKM/M=15/1

ustrezni  $R_f$

$R_f$  produkta  
 $\sim 0.2 - 0.3$

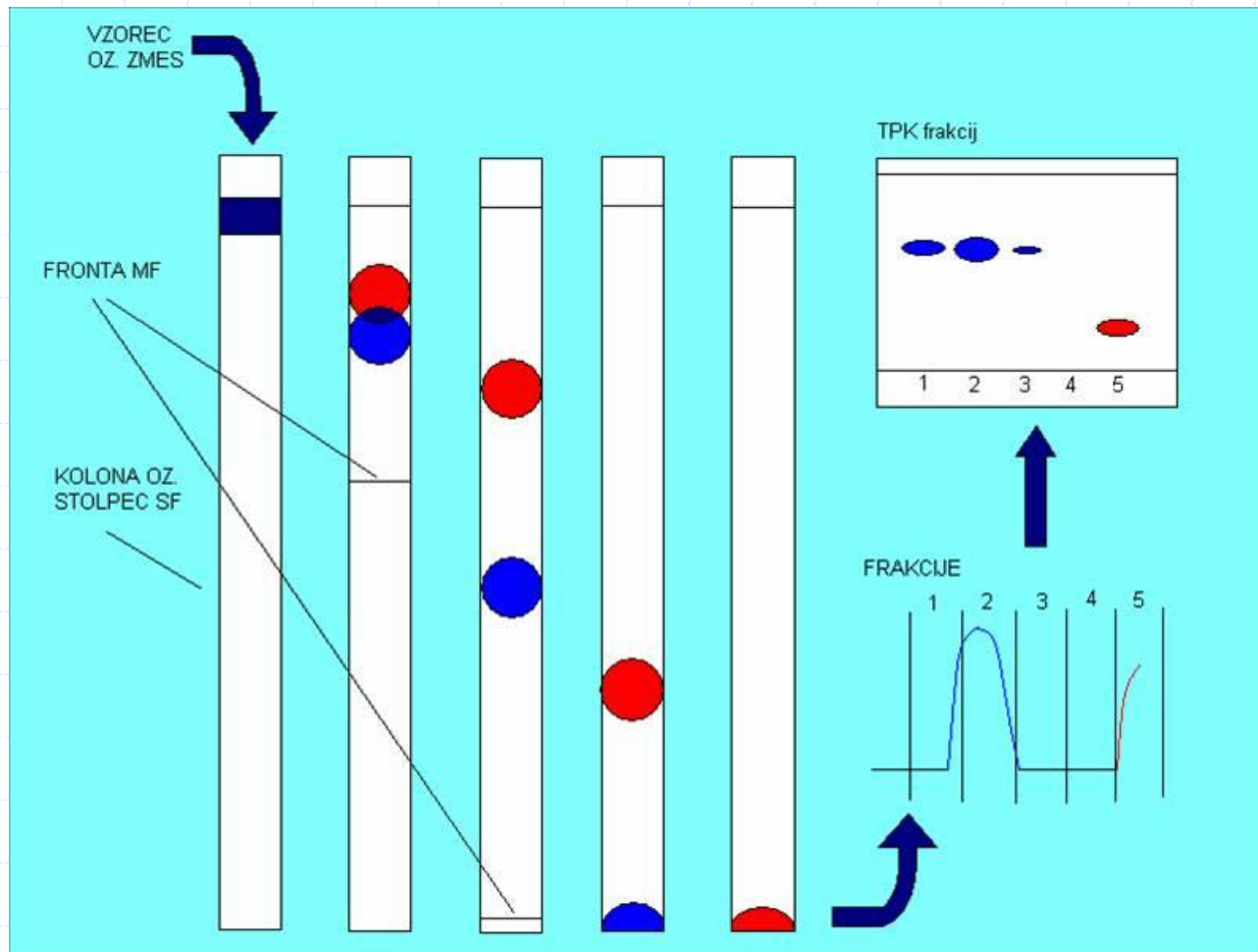
# Kolonska kromatografija

- 2) Kolono najprej napolnimo z MF (izženemo zrak) in nato s SF omočeno v izbrani MF.
- 3) Nanesemo vzorec raztopljen v MF. Dopolnimo z MF.
- 4) Začnemo z elucijo. Zbiramo frakcije. Frakcije analiziramo s TPK.
- 5) Frakcijam uparimo topilo in analiziramo (NMR, IR, MS, elementna analiza, določanje tališča).



Zbiranje frakcij  
Analiza frakcij

# Princip kromatografske ločbe na koloni (stolpcu)



# Procesi, ki potekajo med ločbo na koloni

- ◆ elucija
- ◆ retencija
- ◆ separacija
- ◆ disperzija

# Elucija

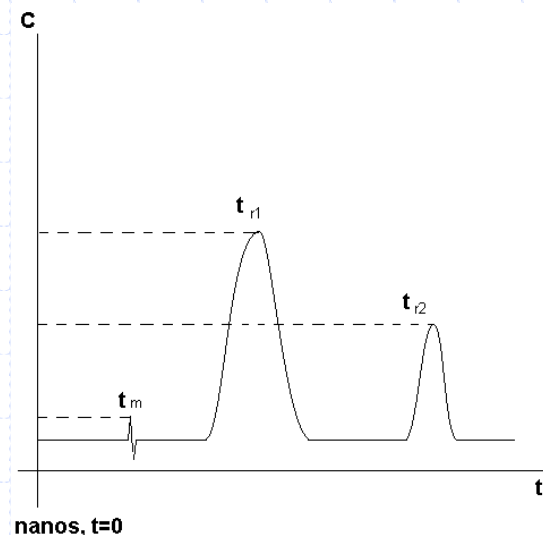
- ◆ izokratska – vseskozi enaka sestava MF
- ◆ frakcionalna – ko eluiramo eno komponento, spremenimo MF
- ◆ gradientna – MF spreminjamo med eluiranjem

# Retencija – zadrževanje na koloni

- ◆ merilo adsorpcije, opišemo z adsorpcijskim koeficientom  $Q$  (velja za dano spojino v danem kromatografskem sistemu):
  - $Q = C(\text{adsorbent}) / C(\text{MF})$
  - $Q \sim 0$ ; spojina se ne adsorbira,  $Q \sim \infty$ ; spojina ne potuje
- ◆  $t_r$  – retencijski čas; lastnost spojine v danem kromatografskem sistemu, uporaben parameter za identifikacijo spojin

# Separacija oz. ločitev

- ◆ povečuje se z razliko med maksimumoma dveh sosednjih komponent:  $t_{r_2} - t_{r_1}$  ( $t_m$ ...ret. čas MF)
- ◆  $t_{r_2} - t_{r_1} = (k_2 - k_1) \cdot l / u$ 
  - u...hitrost migracije mobilne faze,
  - $k_x$ ...kapacitivni faktor posamezne komponente,
  - l...dolžina kolone
  - $k_x$ ...vrednost od 0- $\infty$ , 0...komponenta se ne adsorbira,  $\infty$ ...komponenta ne potuje
- ◆ separacija narašča z dolžino poti (kolone) in razliko med kapacitivnima faktorjema spojin pri dani hitrosti elucije



# Disperzija

- ◆ nasproten proces separaciji, gre za širjenje con med potovanjem vzorca (topljenca) skozi kolono
- ◆ spojina se eluira v večjem volumnu in manjši koncentraciji, kot je bila nanjo nanešena
- ◆ koncentracija vzorca v eluatu se porazdeljuje po Gaussovi krivulji; širina bazne linije te krivulje je merilo za disperzijo
- ◆ odvisna od dolžine kolone

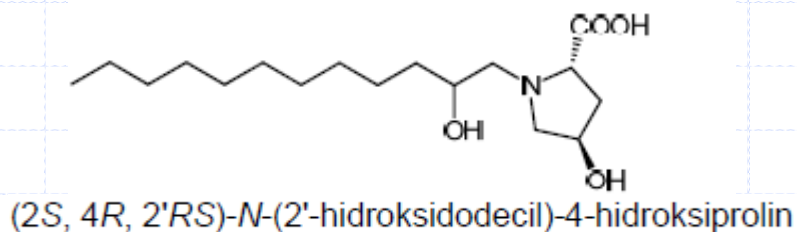
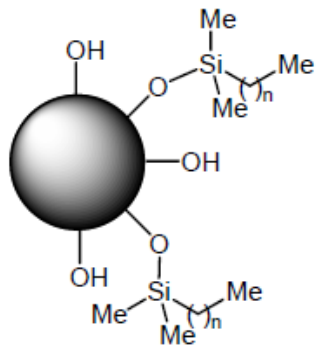


# Disperzija

- ◆ efekt množice poti: pot skozi kolono ni ravna, čimmanjši delci, čimbolj enakomerne oblike in velikosti – boljša enakomernost poti, manjša disperzija
- ◆ naključna molekularna difuzija v aksialni smeri kolone – efekt je pomemben pri počasnejših pretokih
- ◆ upor proti difuziji molekul iz ene v drugo fazo – za prehod je potrebna določena energija

# Kromatografija enantiomerov s stacionarno fazo s kiralnim selektorjem

1) Sušenje plošč CHIRALPLATE - 15 min v sušilniku (zakaj?). Plošče so reverznofazne, s kiralnim selektorjem.



2) Nanos: L-Ala, D-Ala, zmes obeh;

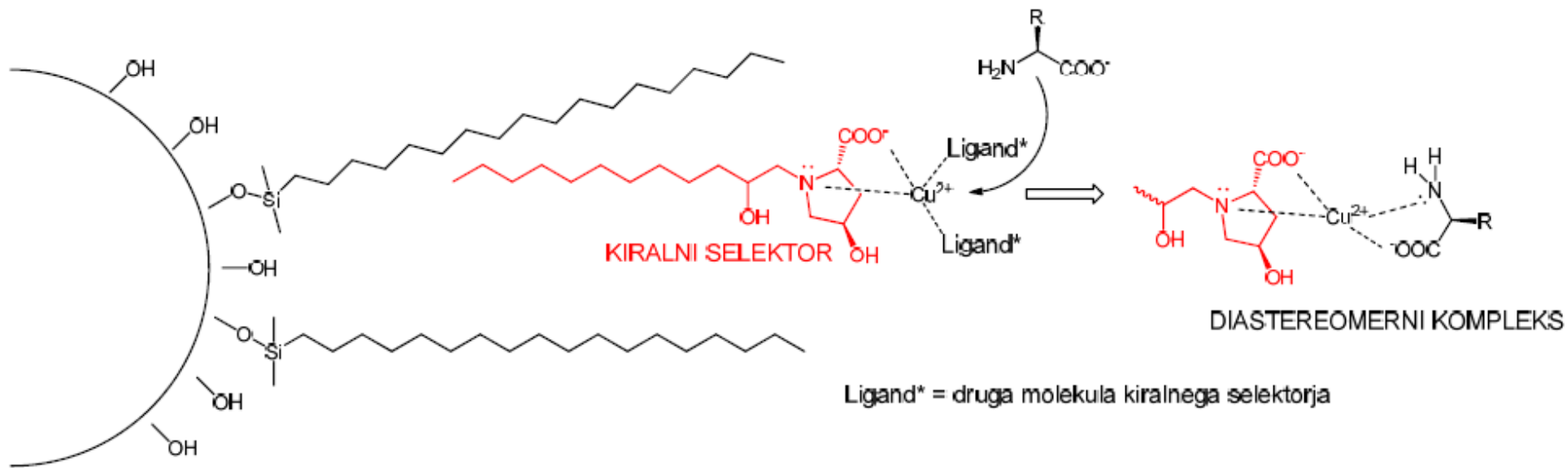
$\gamma$ -Bn-L-Glu,  $\gamma$ -Bn-D-Glu, zmes obeh

3) Razvijanje v nasičeni kadički z MF MeOH/voda/acetonitril=1/1/5.

Kaj bi se zgodilo s povečanjem ali zmanjšanjem deleža acetonitrila?

4) Vizualizacija z oroševanjem. Ali bi videli katero od spojin pod UV lučko?

# Princip ločbe na SF s kiralnim selektorjem



- ločitev na osnovi tvorbe diastereomernih kompleksov
- bolj je kompleks stabilen, počasneje potuje spojina

# Kiralnost

- ◆ lastnost, da kiralna spojina ni enaka svoji zrcalni sliki
- ◆ vzroki za kiralnost:
  - **stereogeni center** - najpogosteje C atom (redkeje Si, N, P, S –prosti el. par kot substituent!) s štirimi različnimi substituenti. Spojina s stereogenim centrom ni nujno kiralna (npr. mezo spojine).
  - **stereogena os** – omejena vrtljivost (npr. različni o-substituirani difenili, kumuleni s sodim št. dvojnih vezi)
  - **stereogena ravnina** - nenasičene spojine

# Kiralnost

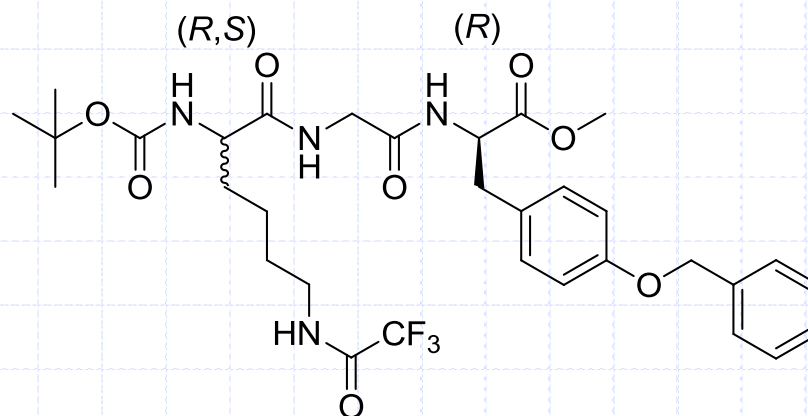
## ◆ ENANTIOMERA

- molekuli sta si med seboj zrcalni sliki, vse razdalje med atomi so enake, ne razlikujejo se po fiz.-kem. lastnostih razen v smeri zasuka linearno polarizirane svetlobe
- ni možna ločitev v nekiralnem okolju

## ◆ DIASTEREO(IZO)MERI

- več stereogenih centrov, razdalje med atomi so različne, zato razlike v fiz.-kem. lastnostih
- možna ločba: razlika v topnosti (selektivna kristalizacija), razlike v interakcijah (kromatografija), razlike v vrelišču (destilacija)

# Dopolnite reakcijsko shemo in odgovorite na vprašanja!



$K_2CO_3$ ,  
MeOH

**A**

$CF_3COOH$   
sobna T

**B**

$H_2$ , Pd/C

**C**

- a) S katerim orositvenim reagentom lahko spremljamo nastanek produkta C?
- b) Skicirajte TLC kromatogram izhodne spojine in produkta **B** v mobilni fazi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9/1$  na normalnofaznem silikagelu?
- c) Kaj bi se zgodilo z retencijskim faktorjem izhodne spojine, če v mobilni fazi povečamo odstotek  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ?
- d) Koliko lis pričakujete po razvijanju TLC kromatograma izhodne spojine v mobilni fazi  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 5/1/1$  na reverznofaznem silikagelu z dodanim kiralnim selektorjem?