



Katedra za farmacevtsko kemijo

Kvalitativno določanje učinkovin s tankoplastno kromatografijo

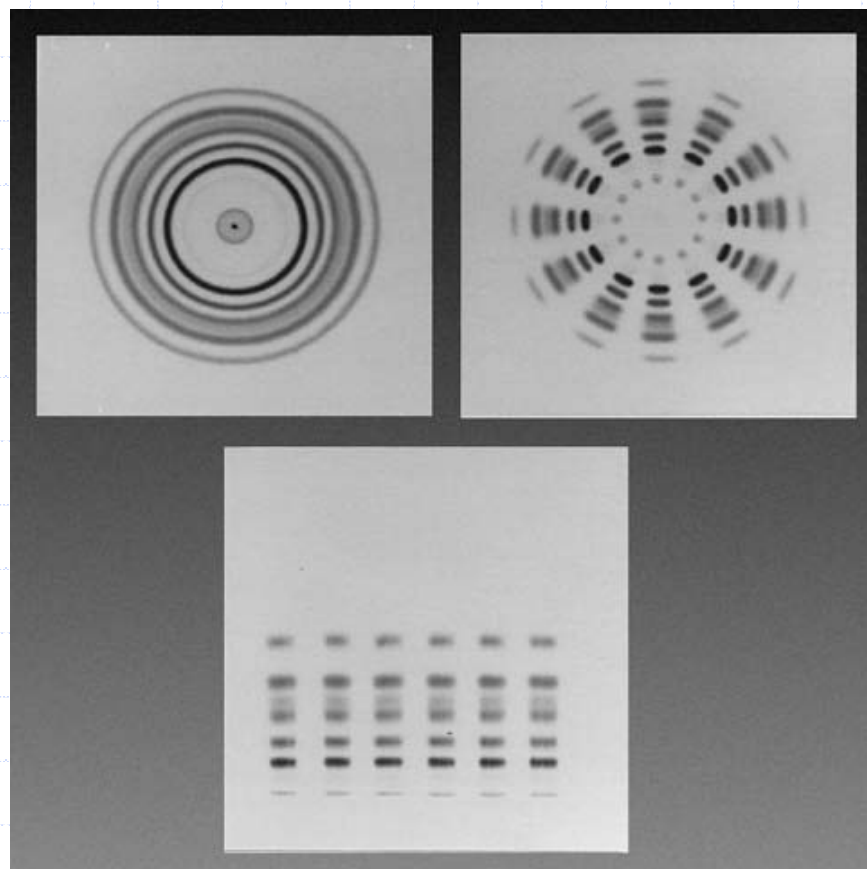
1. vaja

TPK – definicija

- ◆ Trdno-tekoče
- ◆ Adsorpcijska kromatografija
- ◆ “Potovanje” spojin po tanki plasti stacionarne faze (SF)
- ◆ Ponavadi ascendentna kromatografija
- ◆ Osnova za razlikovanje – H-vezi, polarnost

Ascendentna kromatografija?

Ni nujno...



R_f zavisi od:

- ◆ Izbire SF
- ◆ Kemizma spojin
- ◆ Mobilne faze (topilo za eluiranje, razvijalec)
 - ◆ Razmerje mora biti vedno enako – z dobro nasičenostjo se temu približamo
- ◆ 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

Vpliv stacionarne faze na Rf

- ◆ Silikagel
- ◆ Al_2O_3
- ◆ Reverznofazni silikagel

Vpliv kemizma na Rf

- ◆ Kisline potujejo v kisli MF (dodatek HCOOH ali CH_3COOH)
- ◆ Bazične spojine potujejo v alkalni MF (dodatek NH_3 ali NEt_3)
- ◆ Soli praviloma ostanejo na startu
- ◆ Nevtralne spojine – vpliv funkcionalnih skupin

Vpliv mobilne faze na Rf

◆ Zelo polarna topila

- ◆ Metanol > etanol > izopropanol

◆ Srednje polarna topila

- ◆ Acetonitril > etilacetat > kloroform > diklormetan > dietileter > toluen

◆ Napolarna topila

- ◆ Cikloheksan, petroleter, heksan, pentan

◆ Zmesi topil

Vpliv T in % vode na silikagelu

- ◆ Sušenje silikagela pod 150°C : desorpcija vode = "aktivacija"
- ◆ Sušenje silikagela nad 200°C : izguba strukturne vode in s tem sprememba kromatografskih lastnosti

Razpadnost komponent v vzorcu na adsorbentu

- ◆ Spojine, občutljive na kislino, lahko razpadejo na šibko kislem silikagelu
- ◆ Rešitev:
 - ◆ Namesto silikagela uporabimo aluminijev premaz (Al_2O_3)
 - ◆ Dodatek NH_3 ali NEt_3 v MF (kislilne silanolne $-\text{OH}$ skupine se nevtralizirajo)

Napake pri tankoplastni kromatografiji

- ◆ Robni efekt
- ◆ Nastanek več lis
- ◆ Deformacija lis
 - ◆ Repi
 - ◆ Brade
- ◆ Lise na startu

Robni efekt

- ◆ Neenakomernost nasičenja s parami topila v komori
 - ◆ Topila ob robovih izhlapevajo hitreje , ker predstavlja plošča pregrado v komori
 - ◆ EtOAc/heksan: EtOAc kot bolj polarno topilo bo počasneje izhlapevalo kot heksan
- ◆ Različna debelina premaza na TLC ploščici
- ◆ Zaradi tega nikoli ne nanašamo vzorce tik ob robu!

Nastanek več lis

- ◆ Več komponent vzorca
- ◆ Če so v ustreznem kromatografskem sistemu prisotne različno stabilne oblike ene in iste spojine
- ◆ Razpad vzorca

Nastanek več lis

Ugotavljanje razpada spojin na adsorbentu/mobilni fazi – 2D TLC

- ◆ Razvijemo kromatogram v dveh dimenzijah:
 1. V spodnji levi kot TLC ploščice naneseemo vzorec in razvijemo kromatogram
 2. Posušimo, TLC ploščico obrnemo za 90° in ponovno razvijemo
- ◆ Če se na kromatogramu pojavi več lis, ki ne ležijo na premici – verjeten razpad spojine

Deformacija lis

◆ Repi

◆ Brade

Repi

◆ Pri kislih ali bazičnih spojinah

- ◆ Disociacija v vodi
- ◆ Poiščemo primeren pH, pri katerem je spojina v nedisociirani obliki ali pa je popolnoma disociirana in potuje kot ion.

◆ Slaba topnost v mobilni fazi

- ◆ Preko starta mora preteči veliko topila, da raztopi startno liso. Snov se razširi po večjem delu kromatograma.

◆ Premočna adsorpcija na adsorbent

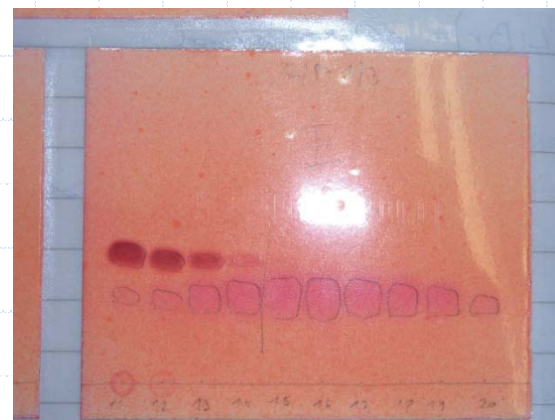
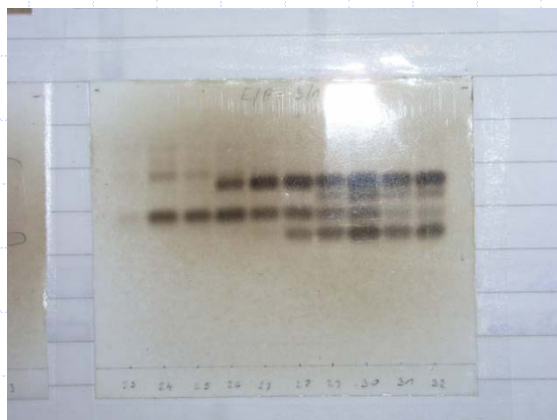
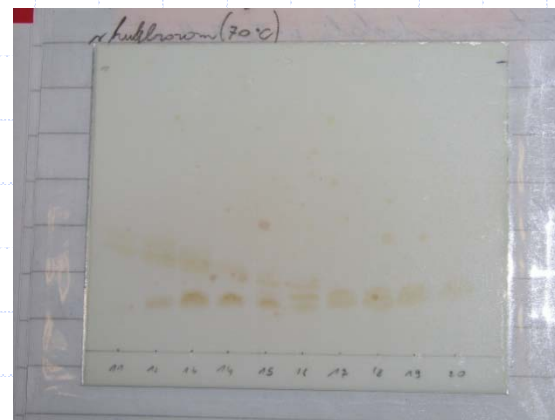
Brade

- ◆ Pred prvo spojino v zmesi ali tik ob fronti mobilne faze poteka senca:
 - Prevelik nanos spojine, ki jo mobilna faza ne raztopi hkrati
 - Vzrok so lahko primesi iz papirja oz. silikagela (adsorbenta)

Lise na startu

- ◆ Zelo polarne spojine
- ◆ Primesi, ki niso topne v mobilni fazi
- ◆ Pri nanašanju poškodovan adsorbent, ki veže snov ireverzibilno
- ◆ Snov nanešena v močno polarnem topilu
 - ◆ Snov je prodrla globoko v silikagel, od koder jo manj polarna faza težko eluira.

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

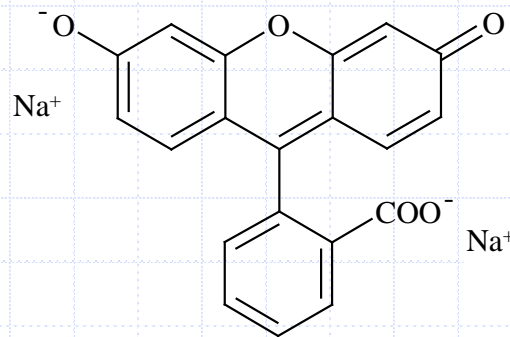


Detekcija na TLC ploščah

- ◆ Kemijska: orositveni reagenti (skripta)
- ◆ Fizikalne metode:
 - UV detekcija: fluorescein je v običajnih topilih zelo slabo topen
 - Denzitometrija: uporabni za kvantitativno vrednotenje TLC- kromatogramov. Temeljijo na merjenju transmitance ali fluorescence
 - Radiokemijska detekcija

UV detekcija

- ◆ Silikagelu na TLC ploščah je dodan fluorescentni indikator **fluorescein** (oznaka F_{254}). Spojine, ki absorbirajo UV-svetlobo, gasijo fluorescenco in se pojavijo kot temne lise na zeleni podlagi.



fluorescein (dinatrijeva sol)

Fenoli

- ◆ OH- skupina vezana na c atom benzenskega obroča: hidroksibenzen ali fenol
- ◆ Različni od alkoholov
- ◆ Praviloma tekočine z visokim vreliščem ali trdne snovi z značilnim vonjem
- ◆ Fenol - dezinfekcijsko sredstvo (karbolna kislina)

FI/KE lastnosti fenolov

◆ Vodotopnost

- ◆ Poznamo lahko topne fenole in take, ki praktično niso topni

◆ Kislost

- ◆ Tisti z elektronprivlačnimi skupinami so zmerno kisli (NO_2^-), z elektrondonorskimi pa bistveno manj kisli ($-\text{NH}_2$)
- ◆ $\text{pK}_a(\text{fenol})=10.00$, $\text{pK}_a(p\text{-krezol})=10.26$, $\text{pK}_a(p\text{-nitrofenol})=7.15$, $\text{pK}_a(\text{pikrinska kislina})=0.25$ (M. Tišler, Organska kemija, DZS, Ljubljana 1991, str. 105)

◆ Dipolni moment

- ◆ Največjega imajo o-substituirani

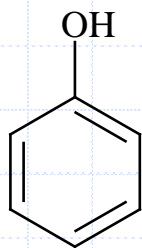
◆ Vodikove vezi

- ◆ So močne pri o-substituiranih (intramolekularne)

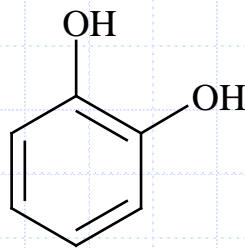
◆ Oksidacija

- ◆ Če je v vzorcu oksidiran produkt, potem ostane na startu.
- ◆ Če oksidacija teče med razvijanjem, potuje oksidiran produkt za fenolno liso kot **sivkastočrn rep**.

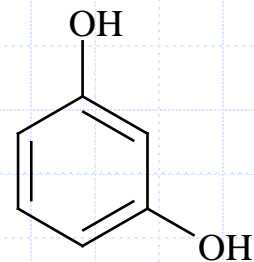
Fenoli – nekatera trivialna imena



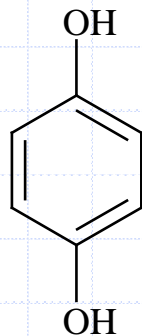
FENOL



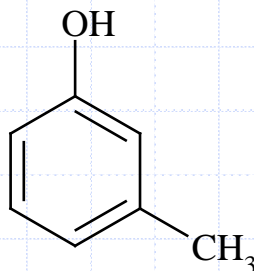
KATEHOL



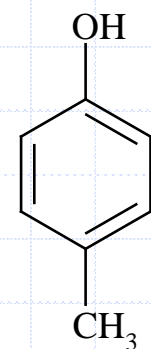
REZORCINOL



HIDROKINON



m-KREZOL



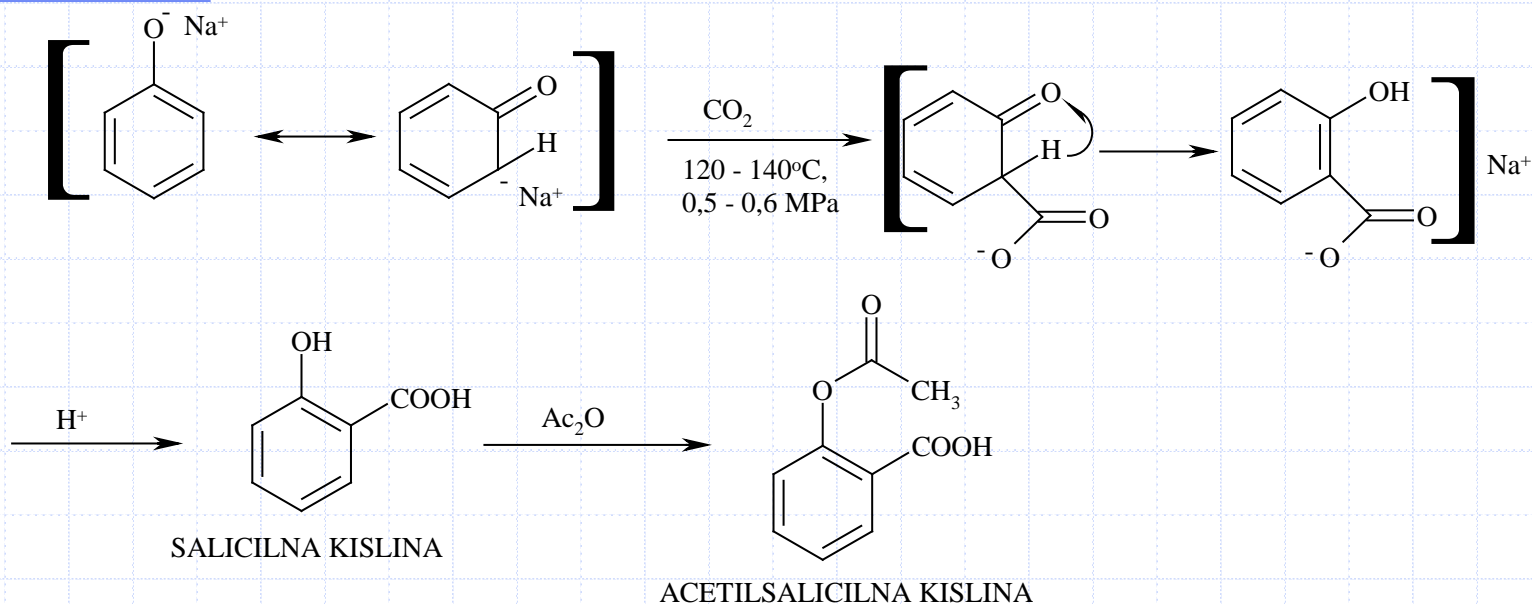
p-KREZOL

Sinteza fenolov:

1. Nukleofilna aromatska substitucija:

2. Preko NO_2 NH_2 N_2^+ OH sintezne poti , primer: sinteza o- krezola iz toluena:

KOLBE – SCHMITT-ova sinteza salicilne kisline



Sinteza poteka preko karboksiliranja mezomernega fenolatnega aniona (elektrofilna substitucija).