


Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo


 Katedra za farmacevtsko kemijo

Kolonska kromatografija in kromatografija enantiomerov s stacionarno fazo s kiralnim selektorjem

21/10/2010 Vaje iz Farmacevtske kemije 3 1

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)



mobilna faza

adsorpcijska mesta

ADSORPCIJSKA KROMATOGRAFIJA

21/10/2010 Vaje iz Farmacevtske kemije 3 2

R_f zavisi od:

- ◆ izbire SF
 - silikagel, Al_2O_3 , reverznofazni silikagel
- ◆ kemizma spojnin
 - kisline potujejo v kisli MF
 - baze potujejo v alkalni MF
 - soli praviloma ostanejo na startu
 - nevtralne spojnine – vpliv funkcionalnih skupin
 $-H < -NO_2 < -C=O < -OH < -NH_2 < -COOH$
- ◆ mobilne faze (topilo za eluiranje, razvijalec)
 - razmerje mora biti vedno enako – z dobro nasičenostjo se temu približamo

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

3

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

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

4

Napake pri TPK

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

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

5

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



21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

6

Kolonska kromatografija

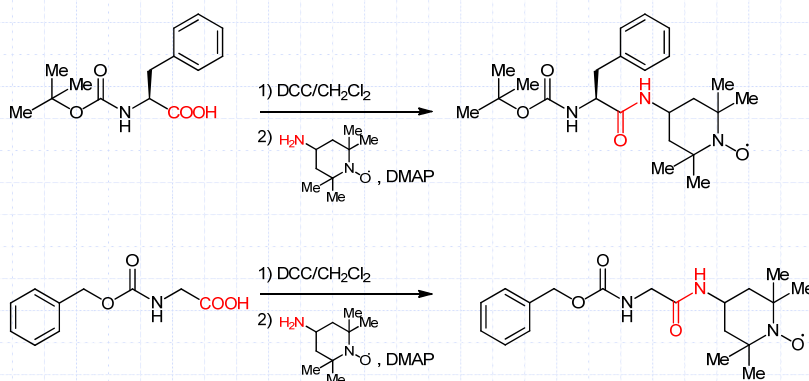
- ◆ trdno-tekoče
- ◆ adsorpcijska kromatografija
- ◆ SF v stolpcu
- ◆ uporabna v preparativne namene za ločevanje in čiščenje spojin iz zmesi
- ◆ vrste:
 - gravitacijska kolonska kromatografija
 - "flash" kolonska kromatografija

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

7

Reakcijska zmes za ločevanje s kolonsko kromatografijo



◆ nečistote: izhodne spojine, stranski produkti

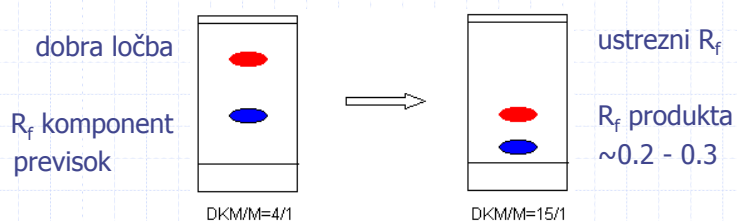
21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

8

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



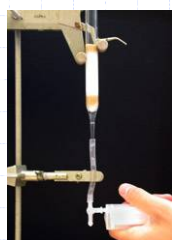
21/10/2010

Vaje iz Farmaceutvske kemije 3

9

Kolonska kromatografija

- 2) Kolono napolnimo najprej z MF (izženemo zrak). Napolnimo kolono 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).



21/10/2010



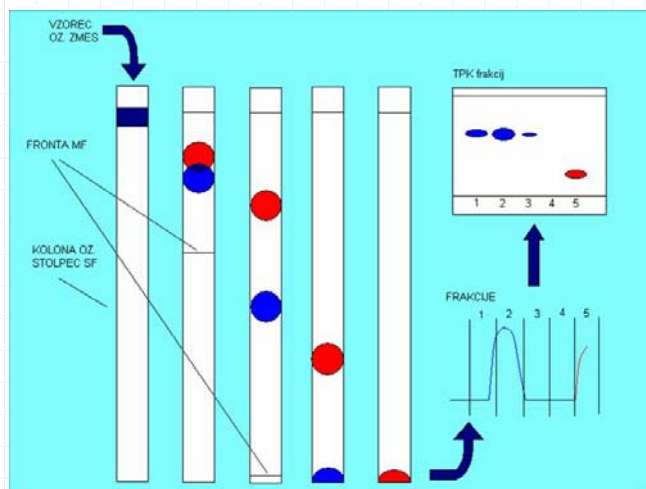
Vaje iz Farmaceutvske kemije 3



Zbiranje frakcij
Analiza frakcij

10

Princip kromatografske ločbe na koloni (stolpcu)



21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

11

Procesi, ki potekajo med ločbo na koloni

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

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

12

Elucija

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

21/10/2010

Vaje iz Farmaceutvske kemije 3

13

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

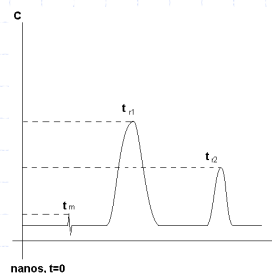
21/10/2010

Vaje iz Farmaceutvske kemije 3

14

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, ∞ ...komponenta ne potuje
- ◆ separacija narašča z dolžino poti (kolone) in razliko med kapacitivnima faktorjema spojin pri dani hitrosti elucije



21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

15

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

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

16

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

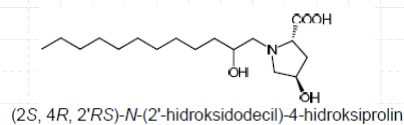
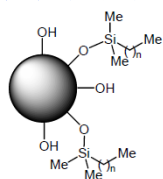
21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

17

Kromatografija enantiomerov s stacionarno fazo s kiralnim selektorjem

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



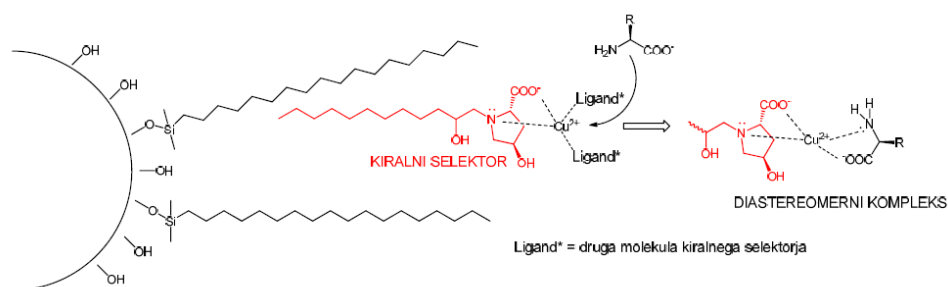
- 2) Nanos: L-Ala, D-Ala, zmes obeh;
 γ -Bn-L-Glu, γ -Bn-D-Glu, zmes obeh
- 3) Razvijanje v nasičeni kadički z MF MeOH/voda/acetoneitril=1/1/5. Kaj bi se zgodilo s povečanjem ali zmanjšanjem deleža acetoneitrila?
- 4) Vizualizacija z oroševanjem. Ali bi videli katero od spojin pod UV lučko?

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

18

Princip ločbe na SF s kiralnim selektorjem



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

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

19

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

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

20

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)

21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

21

Pomen kiralnosti

◆ v naravi prevladujejo:

- L-aminokislina
- D-sladkorji

◆ receptorji v našem telesu so 3D strukture – sposobni so kiralne diskriminacije; različno močno vežejo enantiomere zdravilnih učinkovin

◆ EUTOMER – bolj učinkovit enantiomer

◆ DISTOMER – manj učinkovit enantiomer

◆ eudizmično razmerje= aktivnost eutomera/aktivnost distomera

◆ enantiomera imata lahko tudi popolnoma različne učinke, tudi visoko toksične (npr. talidomid, R-sedativ, S-teratogen)

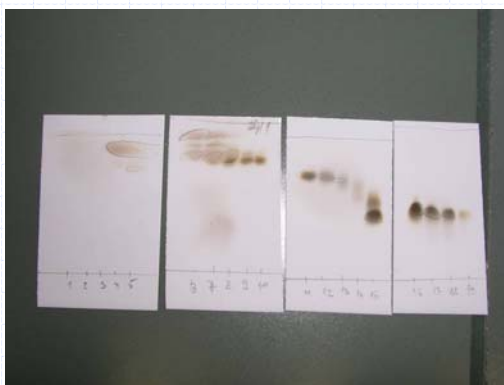
21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

22

Evolucija kromatografije

◆ TPK



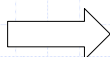
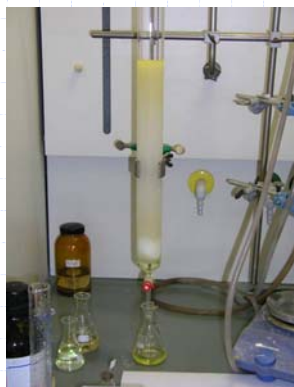
21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

23

Evolucija kromatografije

◆ Kolonska kromatografija



21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

24

Evolucija kromatografije

◆ Kolonska kromatografija v industriji



21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

25

Evolucija kromatografije

◆ Avtomatiziran sistem za "flash" kolonsko kromatografijo



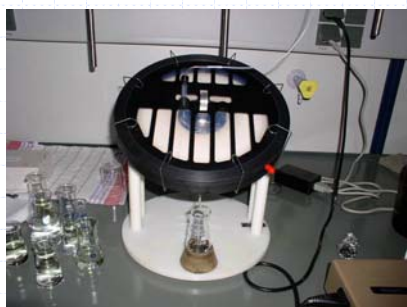
21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

26

Evolucija kromatografije

◆ Radialna kromatografija



21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

27

Evolucija kromatografije

◆ HPLC, LC-MS



21/10/2010

Vaje iz Farmacevtske kemije 3

28