

Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας Ι

Δρ. Νικόλας Φωκιαλάκης

Επίκουρος Καθηγητής

Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Μέθοδοι διαχωρισμού των συστατικών ενός μείγματος με βάση την διαφορετική τους κατανομή μεταξύ δύο φάσεων, μιας σταθερής (stationary phase) και μιας κινητής (mobile phase)

Κατηγορίες χρωματογραφίας: κριτήριο η φύση των φάσεων

1. Αέριου – υγρού (GC, GLC)
2. Υγρού - υγρού (LLC)
3. Υγρού – στερεού (LC)
4. Αέριου – στερεού
5. Υπερκρίσιμου-στερεού

Κατηγορίες χρωματογραφίας: κριτήριο ο μηχανισμός διαχωρισμού

1. Προσρόφησης (Si gel , Al_2O_3) (κανονική & αντίστροφη)
2. Κατανομής (κανονική & αντίστροφη)
3. Ιοντοανταλλαγής
4. Μοριακού αποκλεισμού
5. Συγγένειας

Κατηγορίες χρωματογραφίας: κριτήριο η στατική φάση

1. Χρωματογραφία σε χαρτί (PC)
2. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)
3. Χρωματογραφία στήλης (CC)

**Κατηγορίες
χρωματογραφίας:
κριτήριο η στατική
φάση**

1. Ανιούσα
2. Κατιούσα
3. Οριζόντια

**Κατηγορίες
χρωματογραφίας:
κριτήριο ο σκοπός του
διαχωρισμού**

1. Αναλυτική
χρωματογραφία
2. Παρασκευαστική
χρωματογραφία

Χρωματογραφία επί χάρτου

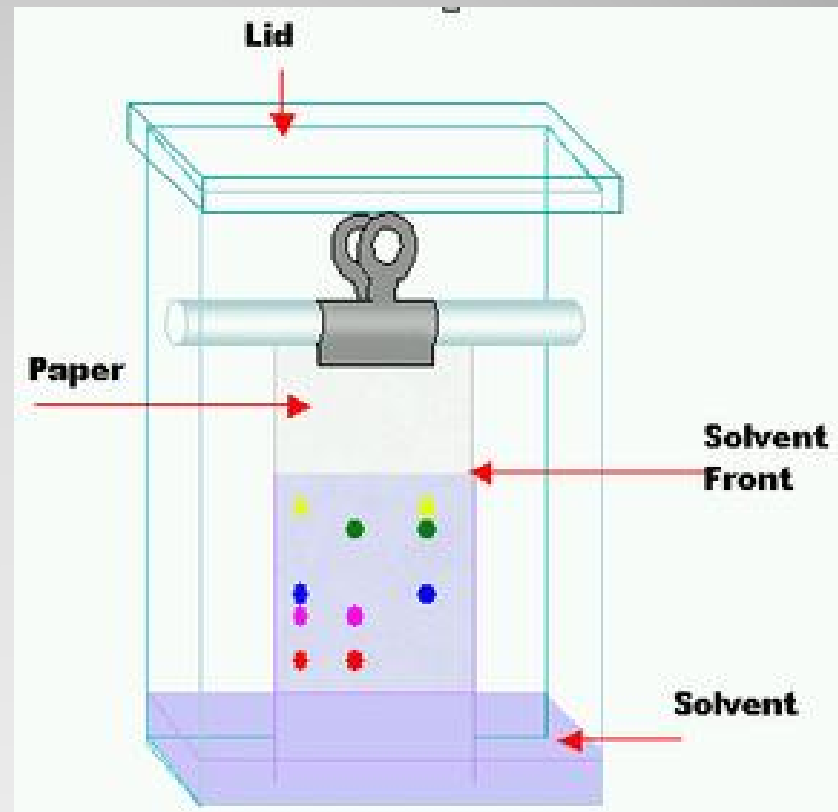
Στατική φάση : H₂O + κυτταρίνη

Μηχανισμός : κατανομή μεταξύ δύο υγρών φάσεων

R_f = Συντελεστής συγκράτησης ή επιβράδυνσης

απόσταση που διάνυσε η ουσία

$$R_f = \frac{\text{απόσταση που διάνυσε η ουσία}}{\text{Απόσταση που διάνυσε το μέτωπο του διαλύτη}}$$



Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC

Μηχανισμός: Προσρόφηση + κατανομή

Αντιδραστήρια εμφάνισης : Αντιδραστήριο Dragendorff (αλκαλοειδή)
Vanillin + H₂SO₄ (γενικό)

ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΦΑΣΗ

Στερεή φάση : διοξείδιο του πυριτίου (silica gel)
οξείδιο του αλουμινίου (alumina -pH)

Κινητή φάση : οργανικοί διαλύτες

ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΦΑΣΗ

Στερεή φάση : C18 διοξείδιο του πυριτίου (C18 silica gel)
Κινητή φάση : H₂O + οργανικοί διαλύτες (MeOH, ACN)

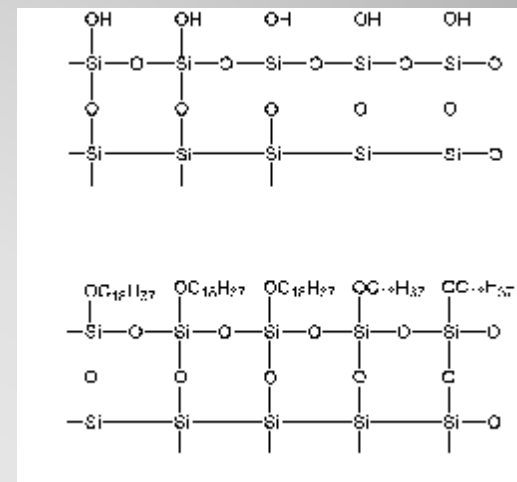


Table 3
Ten Simple Spray Reagents for Natural Product TLC Visualization

Detection spray	Recipe	Treatment	Notes
(1) <i>Vanillin/Sulfuric acid</i>	Dissolve vanillin (1 g) in concentrated H ₂ SO ₄	Spray onto plate and heat at 100°C until coloration appears	A universal spray. Many terpenes give red and blue colors. Natural products with little functionality may give poor coloration—try spray (2). Spray and heat in a fume cupboard
(2) <i>Phosphomolybdic acid (PMA)</i>	Dissolve PMA in ethanol to make a 5% w/v solution	Spray onto plate and heat at 100°C until coloration appears	Useful to detect many terpenes as blue spots on a yellow background. Spray and heat in a fume cupboard
(3) <i>Ammonium molybdate(VI)</i>	Dissolve ammonium molybdate(VI) (10 g) in concentrated H ₂ SO ₄ (100 mL)	Spray onto plate and heat at 100°C until coloration appears	A universal spray. Many diterpenes give a blue color. Spray and heat in a fume cupboard
(4) <i>Antimony(III) chloride</i>	Dissolve antimony(III) chloride in a mixture of glacial acetic acid (20 mL) and chloroform (60 mL)	Spray onto plate and heat at 100°C for 2–5 min or until coloration appears	Di- and triterpenes give a red to blue coloration. Care should be taken when handling this spray as antimony compounds are highly poisonous. Spray and heat in a fume cupboard
(5) <i>Tin(IV) chloride</i>	Add tin(IV) chloride (10 mL) to a mixture of chloroform (80 mL) and glacial acetic acid (80 mL).	Spray onto plate and heat for 5 min at 100°C or until coloration appears	Useful for the detection of flavanoids and terpenes. Tin(IV) chloride is poisonous and a lachrymator. Spray and heat in a fume cupboard

(6) <i>Dragendorff's reagent</i>	Add 10 mL of a 40% aqueous solution of KI to 10 mL of a solution of 0.85 g of basic bismuth subnitrate in acetic acid (10 mL) and distilled water (50 mL). Dilute the resulting solution with acetic acid and water in the ratio 1:2:10	Generally, no heat is required—but if reaction is not spontaneous, heat until coloration appears	This is the traditional method for alkaloid detection, although care should be taken as some nonalkaloids such as iridoids and some flavonoids give a positive reaction. Alkaloids give a dark orange to red coloration
(7) <i>2,4 Dinitro-phenylhydrazine</i>	Dissolve 2,4-dinitro-phenylhydrazine (0.2 g) in 2-N HCl (50 mL)	Generally, no heat is required — but if reaction is not spontaneous, heat until coloration appears	Detects aldehydes and ketones with a yellow to red coloration
(8) <i>Perchloric acid</i>	A 20% (w/v) aqueous perchloric acid solution	Heat at 100°C until coloration	A universal spray but is useful for steroids and triterpenes
(9) <i>Borntrager reagent</i>	A 10% (w/v) ethanolic solution of KOH	Heat until color detection	For the detection of coumarins and anthraquinones
(10) <i>Ninhydrin</i>	Add ninhydrin (0.3 g) to a mixture of butanol (100 mL) and acetic acid (3 mL)	Heat at 100°C until coloration	Especially useful for amino acids, amines, and as a general alkaloid spray. Alkaloids appear as a red coloration

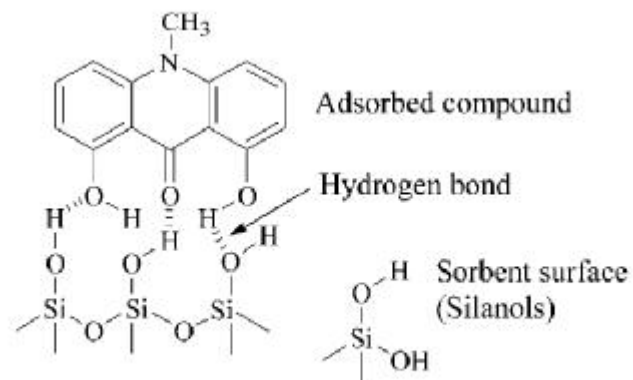


Fig. 3. Adsorption and hydrogen bonding between compound and sorbent

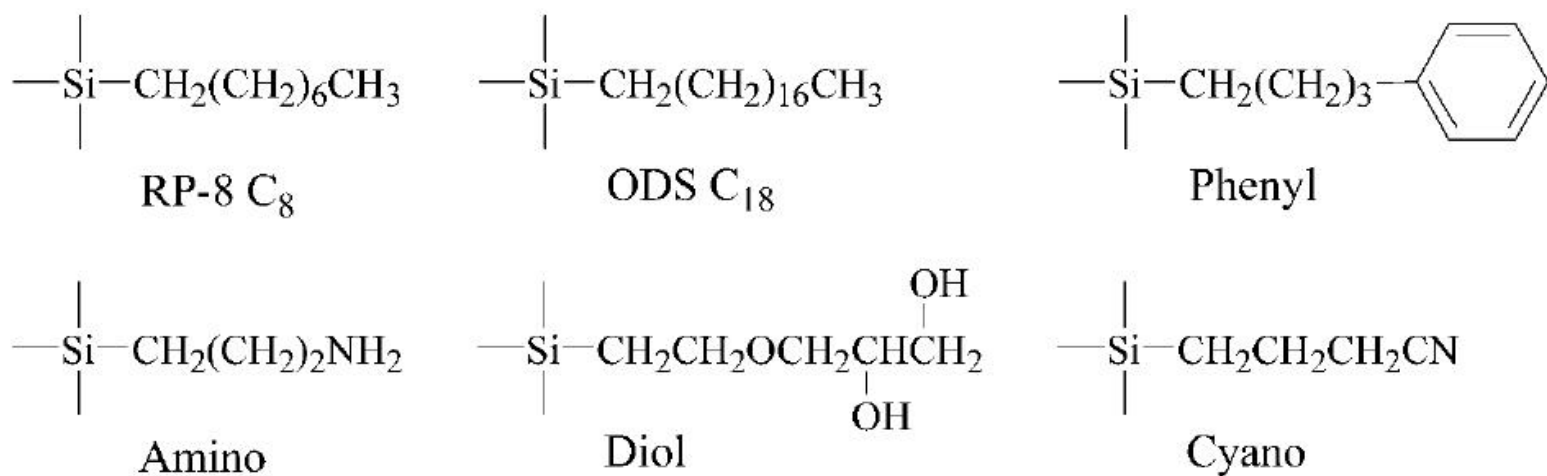
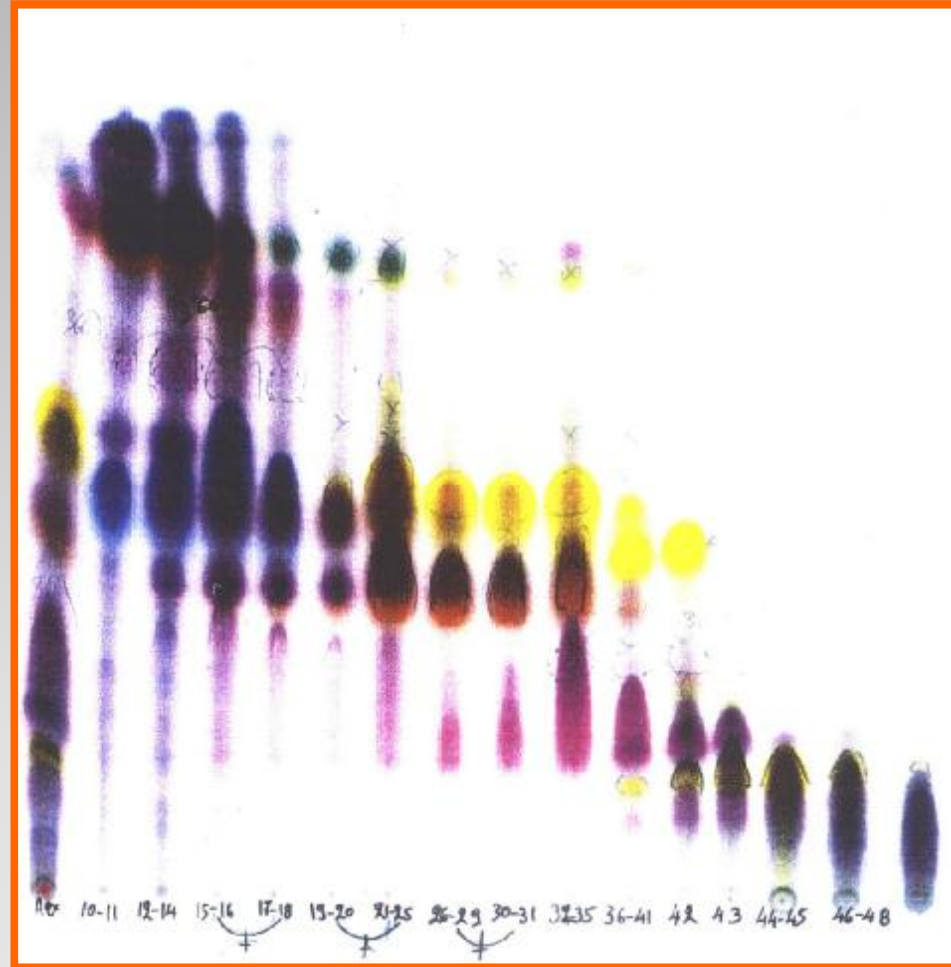
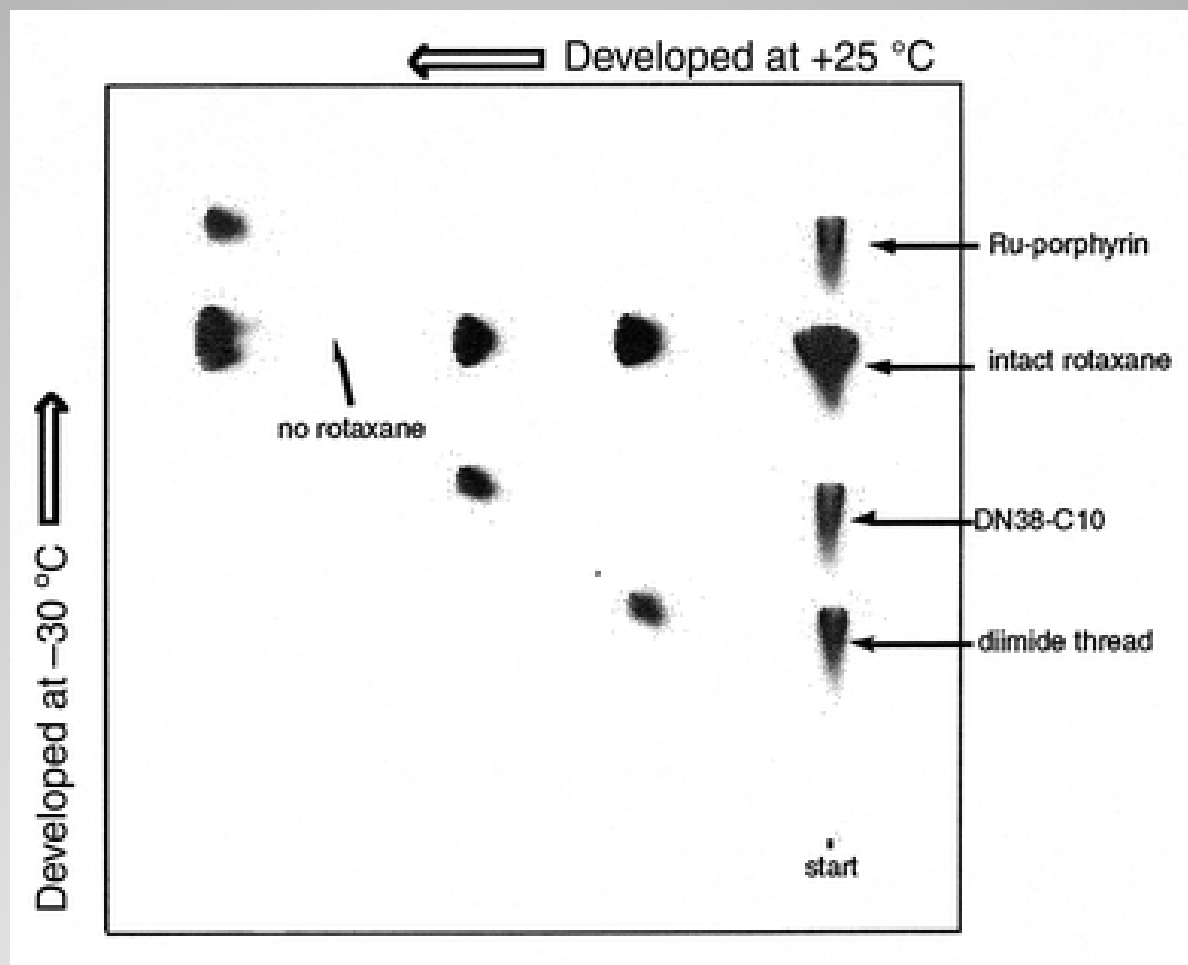


Fig. 4. Common reverse phases for partition chromatography.

TLC



TLC 2D



Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC

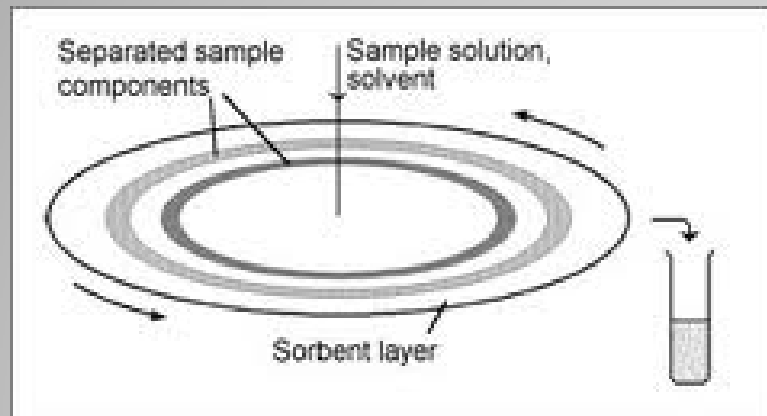
Πλεονεκτήματα

- Πολύ ευαίσθητη
- Εύκολη παραλαβή των ουσιών
- Δυνατότητα ποσοτικής ανάλυσης
- Γρήγορη
- Μπορεί να ψεκαστεί
- Κατάλληλη για λιπόφιλες και λιπόφοβες ενώσεις
- Χαμηλού κόστους

Παρασκευαστική χρωματογραφία

- scale up μεθόδου
- προθέρμανση της TLC
- διάλυση μίγματος σε μικρό όγκο διαλύτη
- σωστή τοποθέτηση δείγματος
- δυνατότητα πολλαπλής ανάπτυξης
- ψεκασμός μόνο στην άκρη
- απόξυση προϊόντος
- εκχύλιση προϊόντος

Centrifugal Preparative Thin Layer chromatography (CPTLC)



Πλεονεκτήματα

- Δυνατότητα αλλαγής διαλύτη
- Μεγαλύτερες ποσότητες (1-2 g)
- Γρήγορη

HPTLC



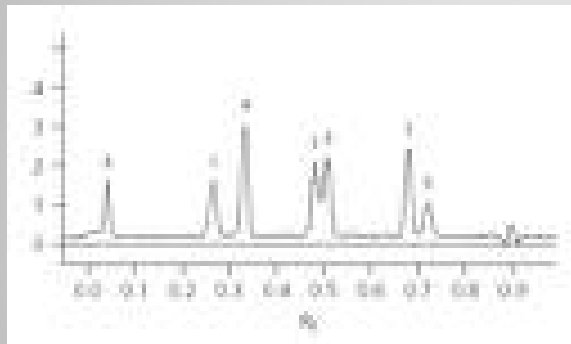
	HPTLC	TLC
<i>Layer of Sorbent</i>	•100µm	•250µm
<i>Efficiency</i>	•High due to smaller particle size generated	•Less
<i>Separations</i>	•3 - 5 cm	•10 - 15 cm
<i>Analysis Time</i>	•Shorter migration distance and the analysis time is greatly reduced	•Slower
<i>Solid support</i>	•Wide choice of stationary phases like silica gel for normal phase and C8 , C18 for reversed phase modes	•Silica gel , Alumina & Kiesulguhr
<i>Development chamber</i>	•New type that require less amount of mobile phase	•More amount
<i>Sample spotting</i>	•Auto sampler	•Manual spotting
<i>Scanning</i>	•Use of UV/ Visible/ Fluorescence scanner scans the entire chromatogram qualitatively and quantitatively and the scanner is an advanced type of densitometer	•Not possible

Overpressured layer chromatography (OPLC)

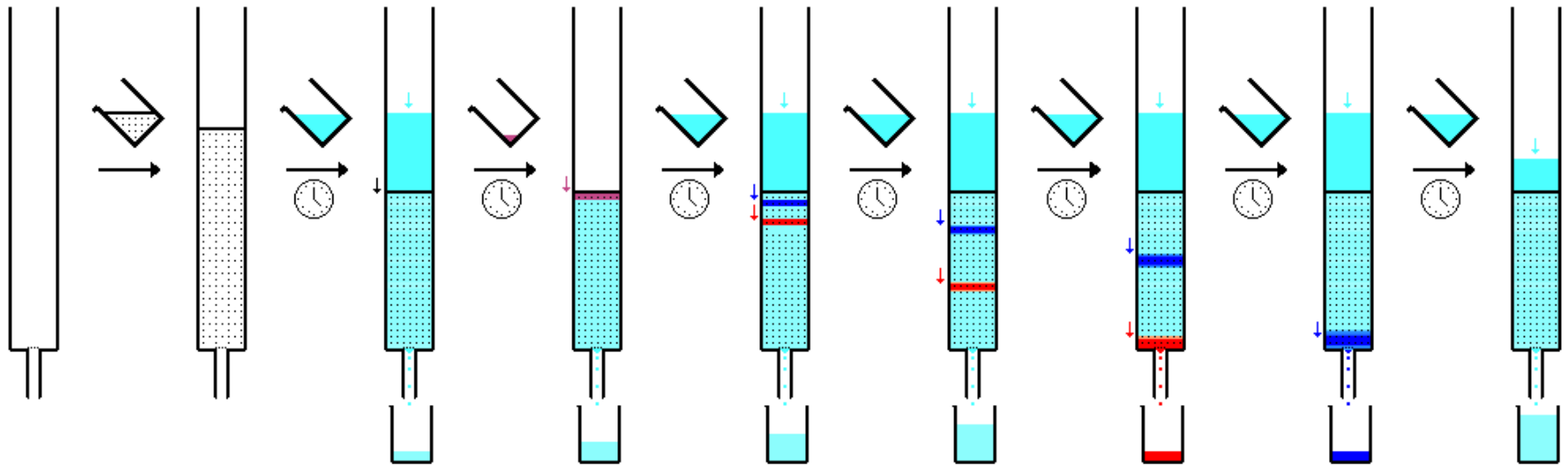
Δυνατότητα έκλουσης των προϊόντων

Flow rate: 10 mL/min

Pressure : max 40 bar



Χρωματογραφία έκλουσης



Συντελεστής κατανομής $K = C_s / C_m$

Προσρόφηση

Δυνάμεις που ενεργούν

Ιονικές (Ηλεκτροστατικές δυνάμεις)

Διπόλου – διπόλου

Διπόλου - επαγόμενου διπόλου

Δυνάμεις London

Συνδυασμός όλων αυτών

Υλικά πλήρωσης

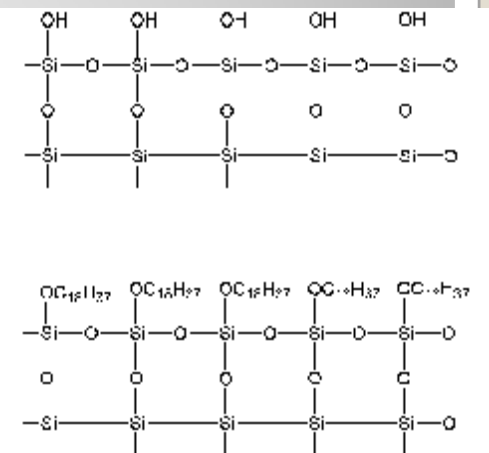
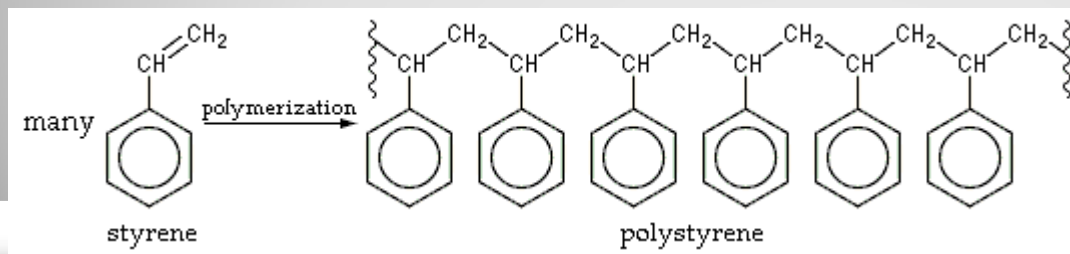
ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΦΑΣΗ

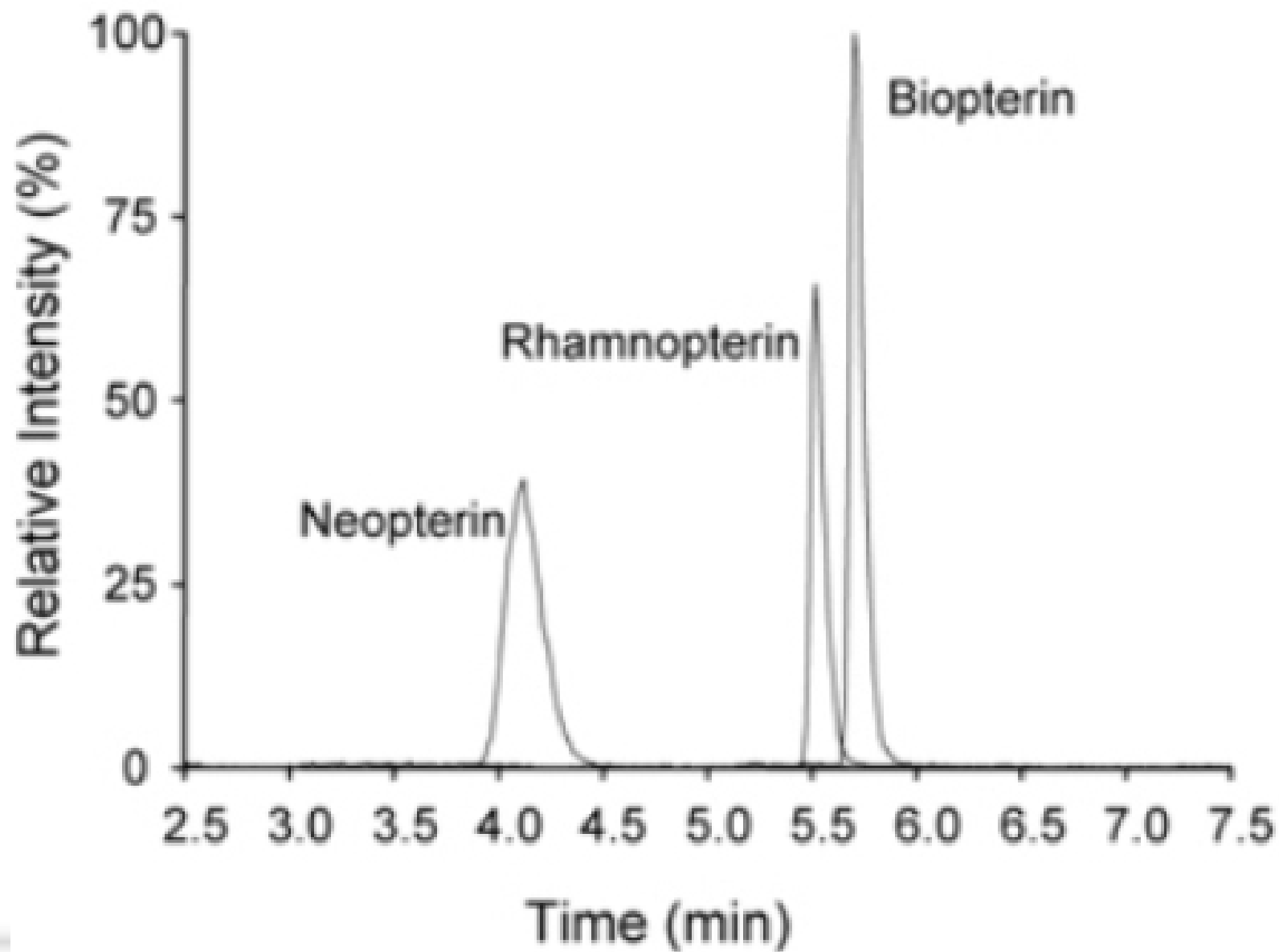
Στερεή φάση : διοξείδιο του πυριτίου (silica gel)
οξείδιο του αλουμινίου (alumina -pH)
πολυστυρένιο

Κινητή φάση : οργανικοί διαλύτες

ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΦΑΣΗ

Στερεή φάση : C18 διοξείδιο του πυριτίου (C18 silica gel)
Κινητή φάση : H₂O + οργανικοί διαλύτες (MeOH, ACN)



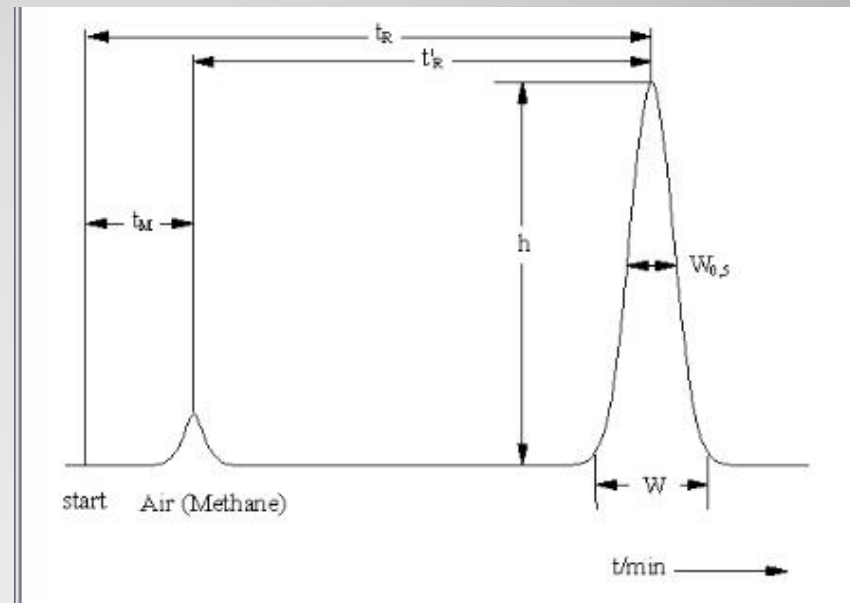


Χρόνος κατακράτησης – Retention time

Ο χρόνος που χρειάζεται για να διατρέξει ένα συστατικό το μήκος της στήλης t_R

Προσαρμοσμένος χρόνος
κατακράτησης
 t_R'

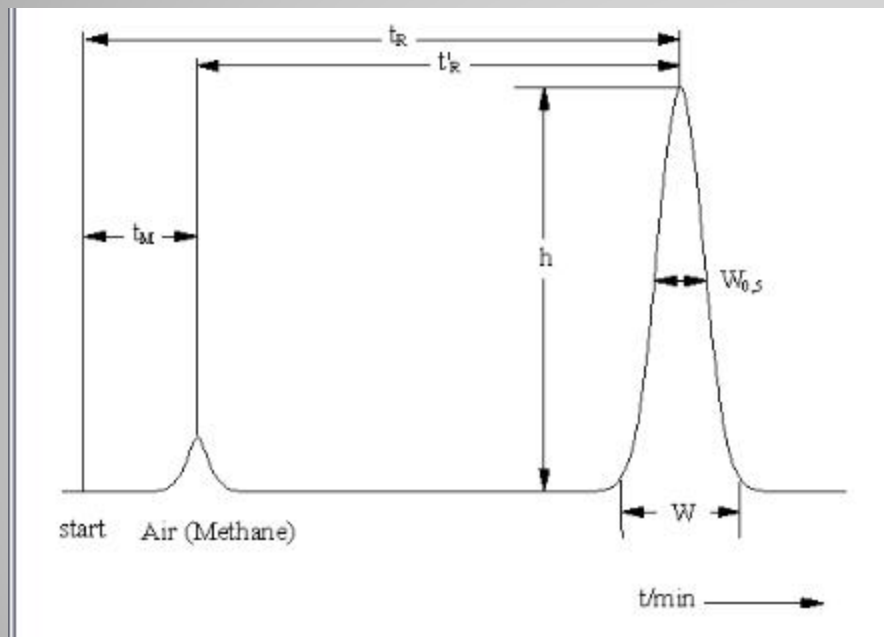
W : εύρος κορυφής



Θεωρία πλακών

Martin & Synge (1940)

Nobel prize 1952



$$n = 16 (t_R / W)^2$$

$$n = L / H$$

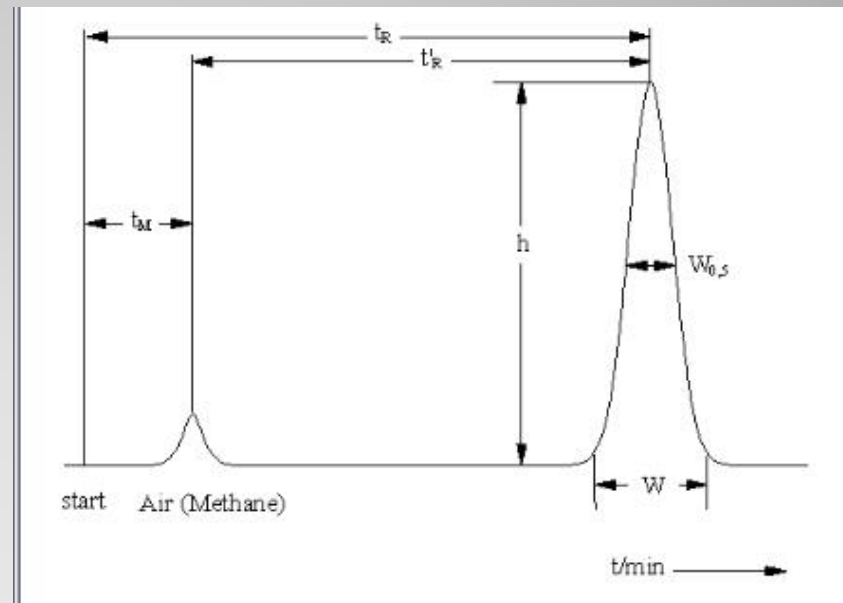
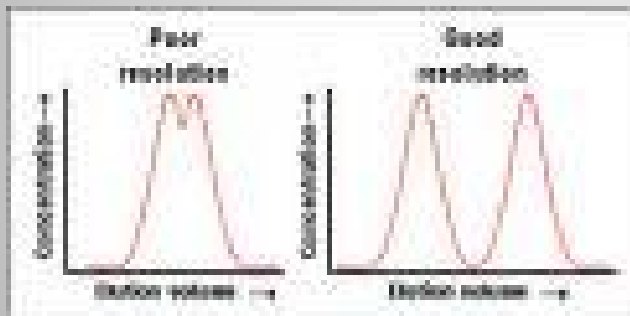
L = ύψος στήλης

H = ύψος ισοδύναμο με μία θεωρητική πλάκα

Διαχωριστική Ικανότητα - Resolution

Μέτρο διαχωρισμού δύο ουσιών

$$R = \frac{2 (t_{RB} - t_{RA})}{W_A + W_B}$$



Βελτίωση διαχωριστικής ικανότητας

Αύξηση του Δt_R

- Αύξηση του μήκους της στήλης

Ελάττωση του πλάτους της κορυφής έκλουσης (W)

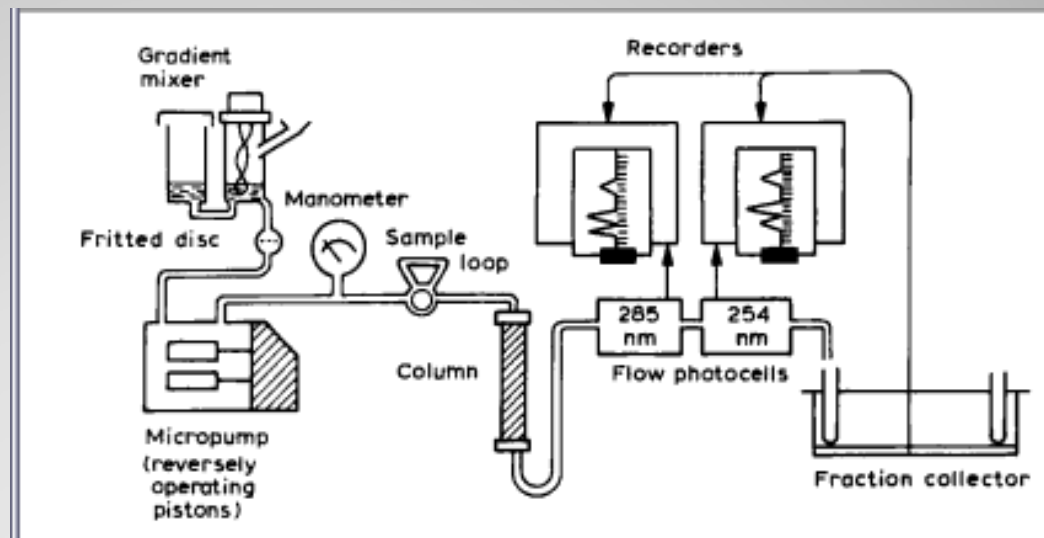
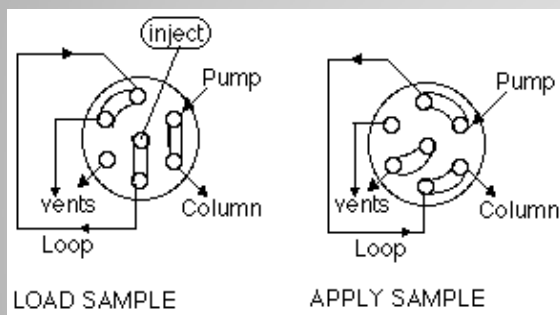
- Χρήση πιο ομοιόμορφου υλικού πλήρωσης
 - Πιο πυκνό πακετάρισμα στήλης
 - Πιο λεπτό υλικό πλήρωσης
- Αύξηση ταχύτητας ροής
- Ελάττωση ποσότητας δείγματος
- Ελάττωση διαμέτρου στήλης
- Αύξηση του εμβαδού επαφής των 2 φάσεων

Διαδικασίες στην χρωματογραφία

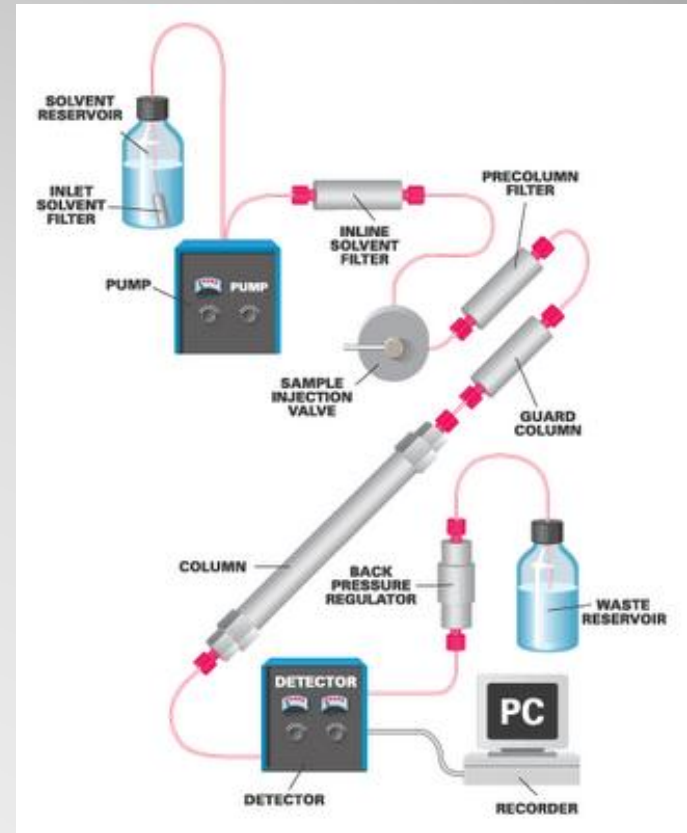
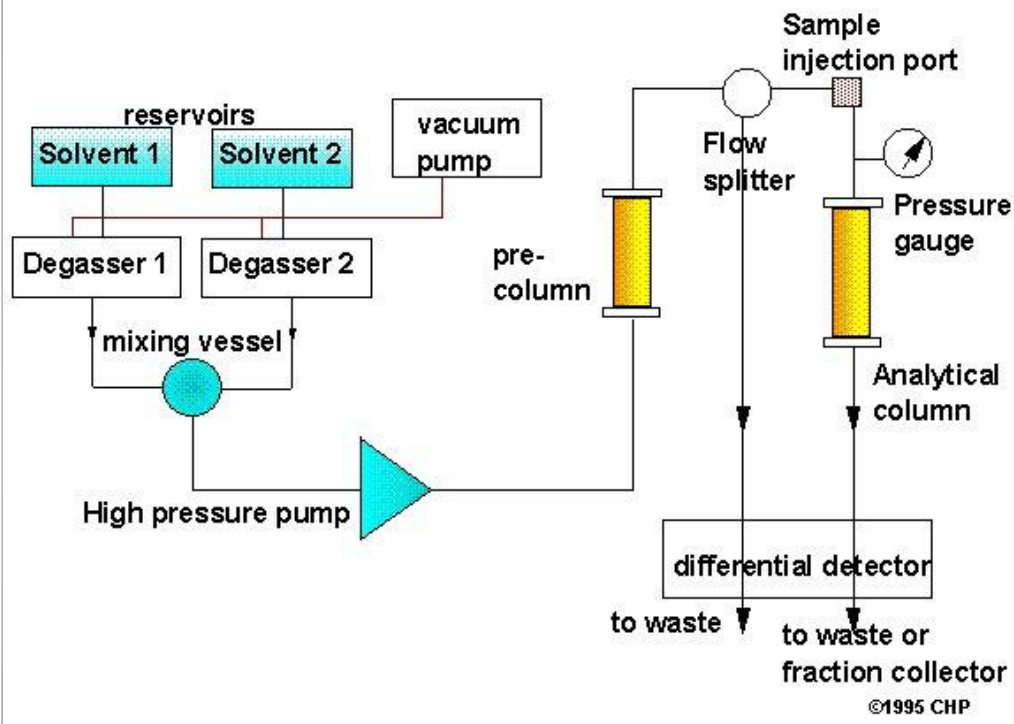
- Πακετάρισμα στήλης (στερεό ή υγρό)
- Προσθήκη δείγματος
- Ανάπτυξη χρωματογραφίας (ισοκρατική ή βαθμιδωτή)
- Εφαρμογή κενού (VLC) ή πίεσης ή απλός με την βαρύτητα

Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)

Pressure : 20 Bar



High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

- υλικό πλήρωσεως στήλης λεπτότατου διαμερισμού
- υψηλή σφαιρική κανονικότητα



- Μεγάλη ομοιομορφία και πυκνότητα πλήρωσης στήλης
- Η υγρή φάση να είναι σε μορφή λεπτότατου υμένα, χωρίς λιμνάζοντες χώρους

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

- Πληρωτικά υλικά

1. Μικροπωρόδη σωματίδια (5-10 μm)
2. Μακροπωρόδη σωματίδια (> 60 μm)
3. Υμενοειδή σωματίδια (35-45 μm)

- Αναλυτική
- Παρασκευαστική

70-300 bar

Handy PSI / Bar Converter

Input PSI and click BAR Button

PSI BAR

Input BAR and click PSI Button

BAR PSI




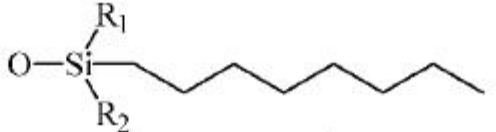
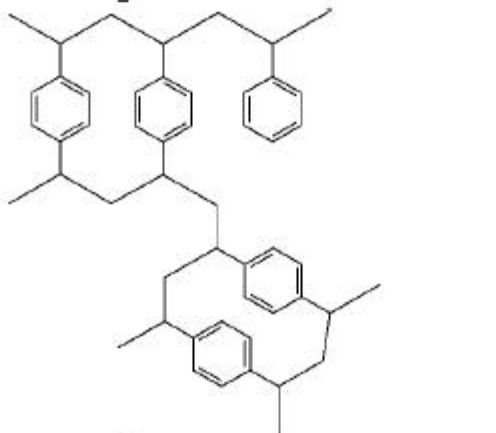
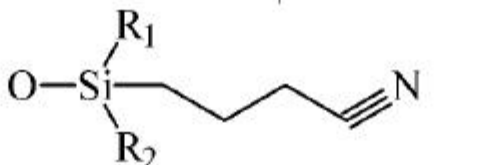
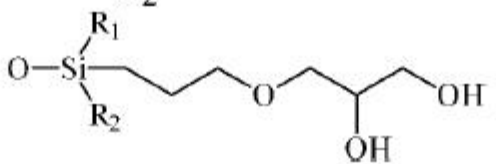

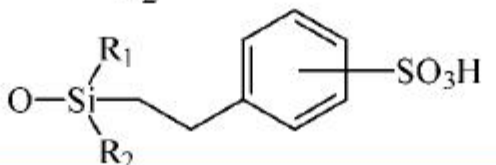
Stationary phase	Structure	Modes
C ₁₈		Reversed phase
C ₈		Reversed phase
Polymeric polystyrene divinyl benzene		Reversed phase
CN (cyano)		Normal and reversed phase
Diol		Normal and reversed phase
Silica		Normal phase
Benzenesulfonic acid		Strong cation exchange

Table 2
Properties of Solvents Used in Normal and Reversed-Phase HPLC

Solvent	Molecular weight	b.p. (°C)	Refractive index at 20°C	Eluotropic value (silica)	UV cutoff (nm)
Acetone	58.1	56	1.359	0.43	330
Acetonitrile	41.1	81	1.344	0.5	190
<i>t</i> -Butylmethyl ether	88.2	53–56	1.369	0.29	—
Chloroform	119.4	60.5–81	1.426	0.03	200
Heptane	100.2	98	1.387	0	200
Hexane	86.2	69	1.375	0	200
Methanol	32	64.6	1.329	0.73	205
Tetrahydrofuran	72.1	67	1.407	0.35	215
Water	18	100	—	0.73	—

pH

Table 3
Properties of Some Buffers Used in Reversed-Phase HPLC

Name	Molecular weight	Usual concentration range (mM)
Ammonium acetate	77	5–20
Ammonium dihydrogen phosphate	115	10–100
Sodium phosphate	120	10–100
Sodium phosphate (dibasic)	142	10–100
Potassium phosphate (monobasic)	136	10–100
Potassium phosphate (dibasic)	174	10–100

Table 4
Properties of Some Acids Used in Reversed-Phase HPLC

Name	Molecular weight	Usual concentration range (% v/v)	Removal from HPLC fraction
Acetic acid	60	0.01–0.1	Rotary evaporation
Formic acid	46	0.01–0.1	Rotary evaporation
Trifluoroacetic acid	114	0.01–0.2	Freeze drying or desalting

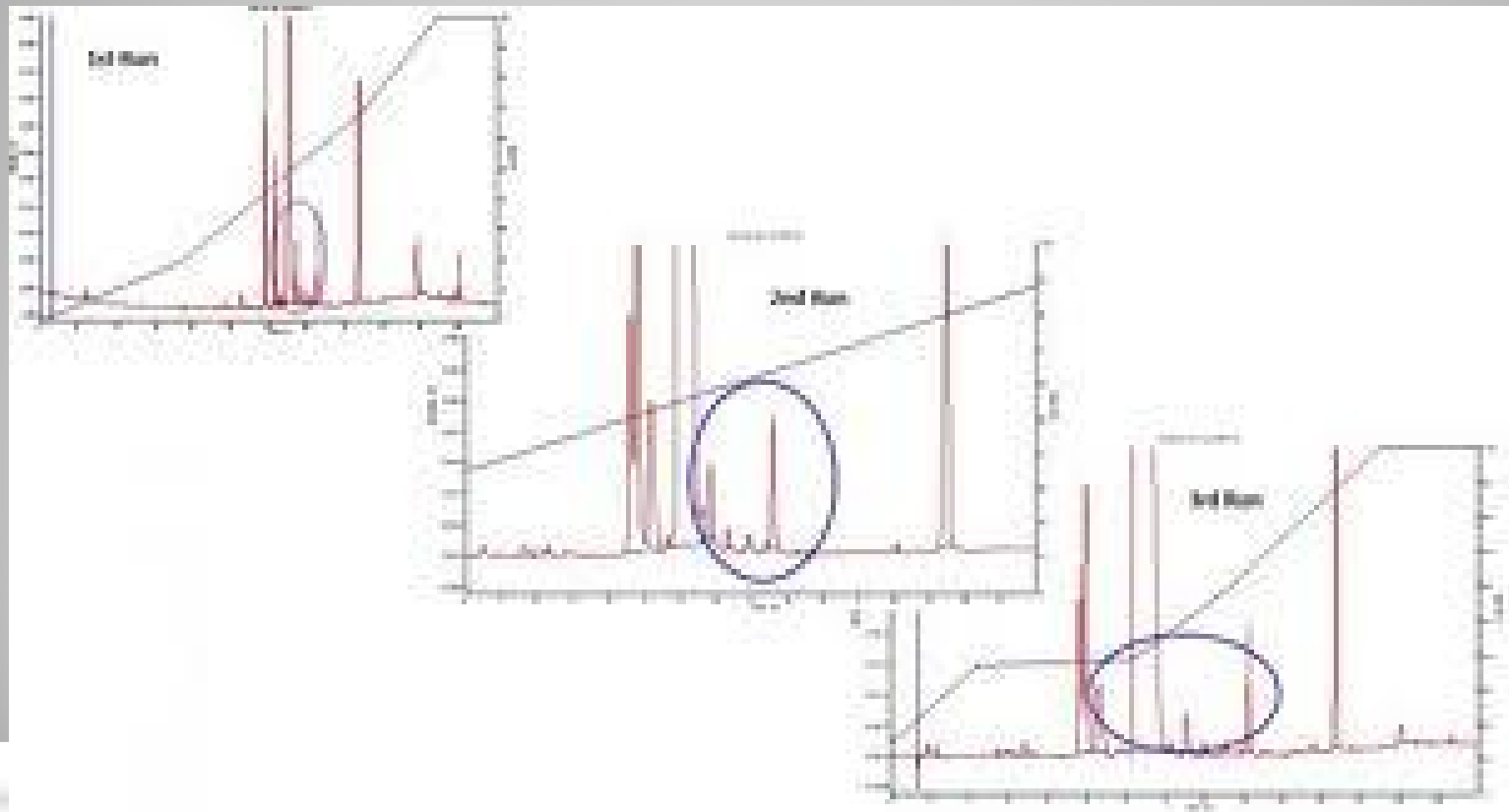
Method development

Επιλογή στατικής φάσης

Επιλογή κινητής φάσης

Επιλογή προγράμματος μεταβολής των διαλυτών (gradient)

Επιλογή ανιχνευτή



Σύγκριση χρωματογραφικών τεχνικών

5.2

Different Preparative **Pressure** Liquid Chromatographic Methods

Since column (and sample) sizes vary so much, it is better to classify the different preparative techniques according to the **pressure** employed for the separation:

- flash chromatography (ca. 2 **bar**/30 psi);
- low-**pressure** LC (<5 **bar**/75 psi);
- medium-**pressure** LC (5–20 **bar**/75–300 psi);
- high-**pressure** LC (>20 **bar**/300 psi).

There is a considerable overlap between low-**pressure**, medium-**pressure** and high-**pressure** LC, and it is only for convenience that the three classes are treated separately.

Σύγκριση χρωματογραφικών τεχνικών

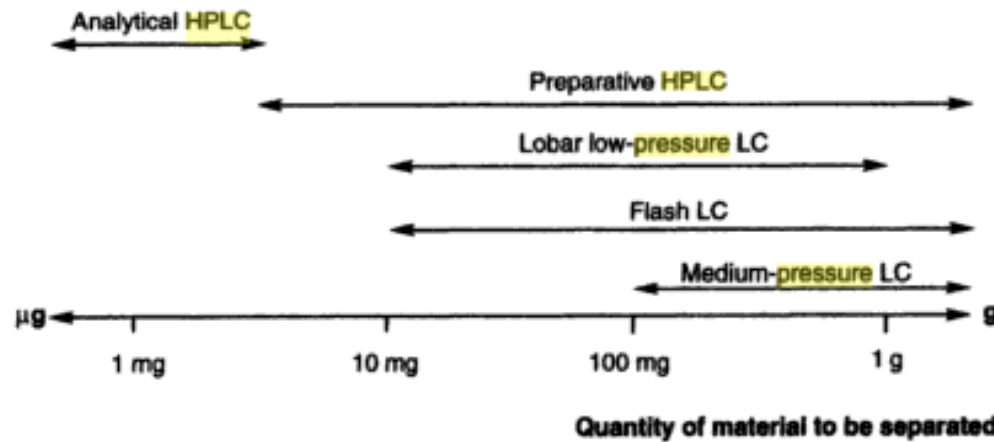
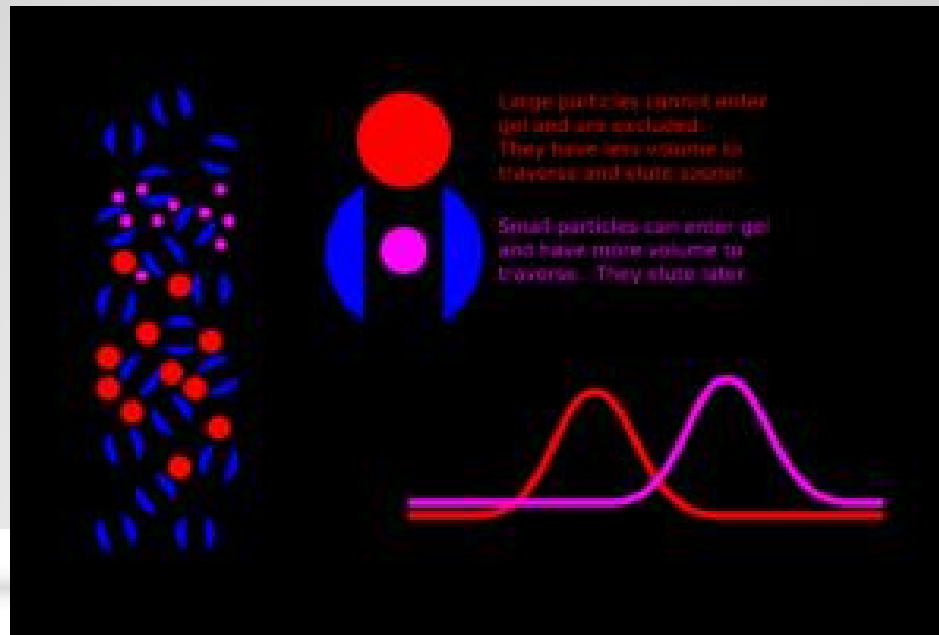


Fig. 5.2. Approximate division of pressure liquid chromatography methods according to the preparative scale required

Χρωματογραφία Μοριακού αποκλεισμού

Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων.

Τα μεγάλα μόρια εξέρχονται πρώτα από τη στήλη, ενώ τα μικρά μόρια, καθώς εισέρχονται στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, καθυστερούν και βγαίνουν αργότερα.



Στατικές φάσεις

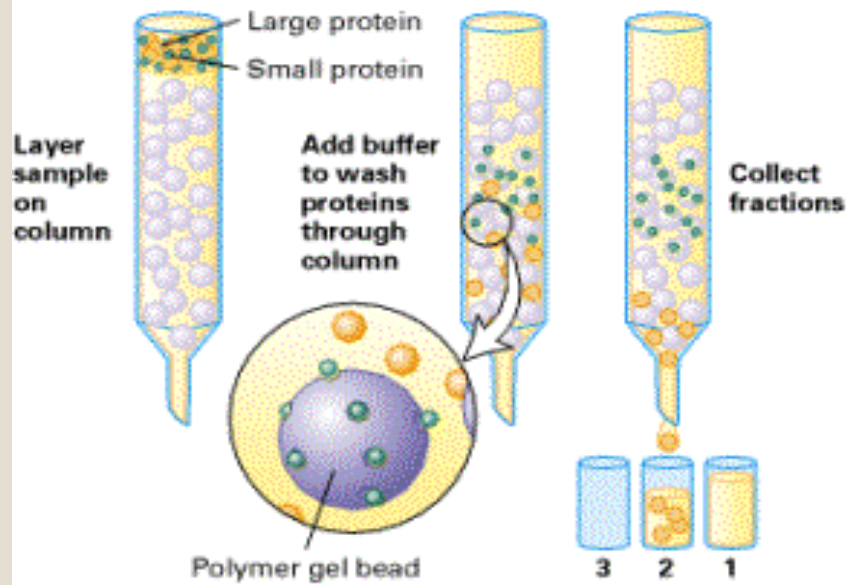
- πολυακρυλαμίδιο
- Πολυσακχαρίτες (Sephadex LH20)

Commonly Used Sephadex G-series

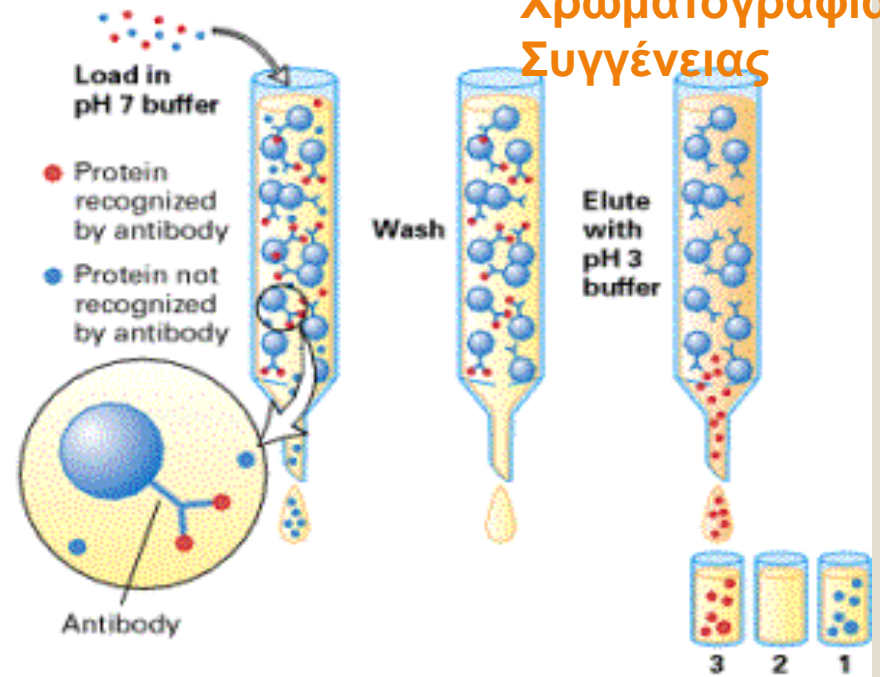
Sephadex type	Bead size (μm)	Fractionation range (molecular weight)
G-10	40–120	≤700
G-15	40–120	≤1500
G-25	20–50	100–5000
	20–80	100–5000
	50–150	100–5000
	100–300	100–5000
G-50	20–50	500–10,000
	20–80	500–10,000
	50–150	500–10,000
	100–300	500–10,000
G-75	20–50	1000–50,000
	40–120	1000–50,000
G-100	20–50	1000–100,000
	40–120	1000–100,000
G-150	40–120	>100,000
G-200	40–120	>100,000

Χρωματογραφία Συγγένειας

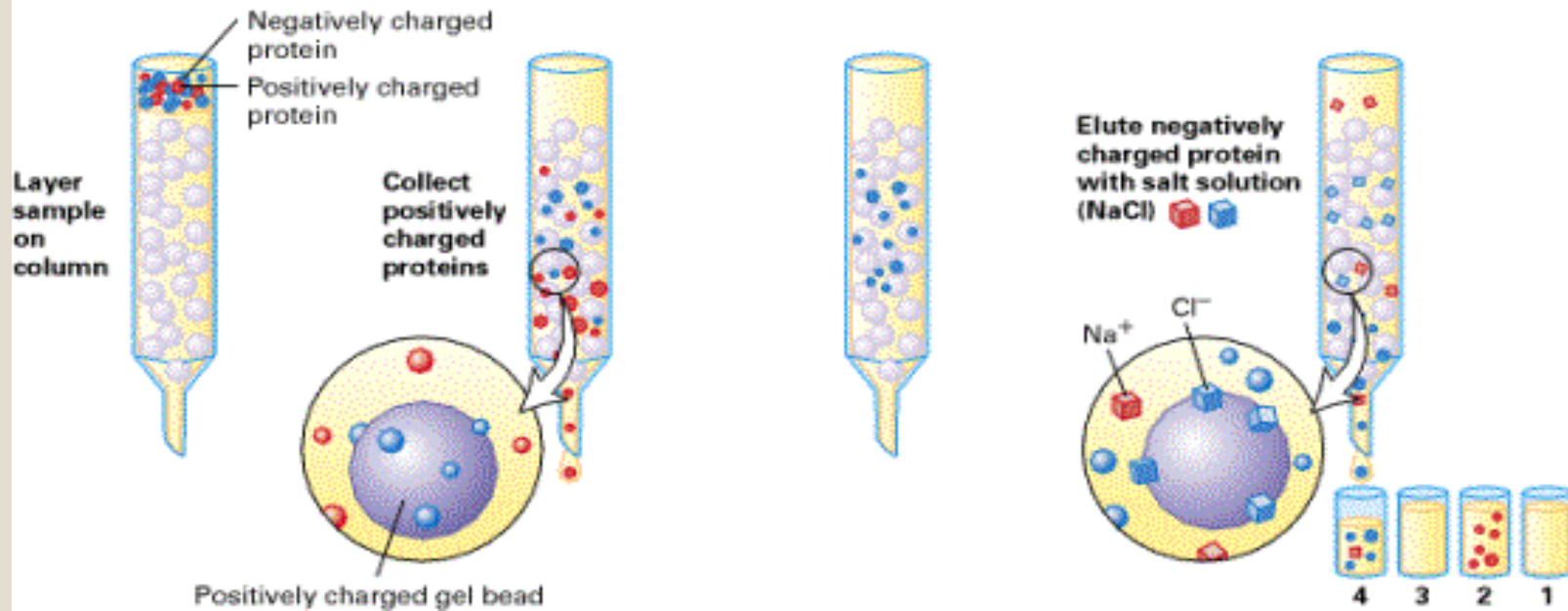
(a) Gel filtration chromatography



(c) Antibody-affinity chromatography



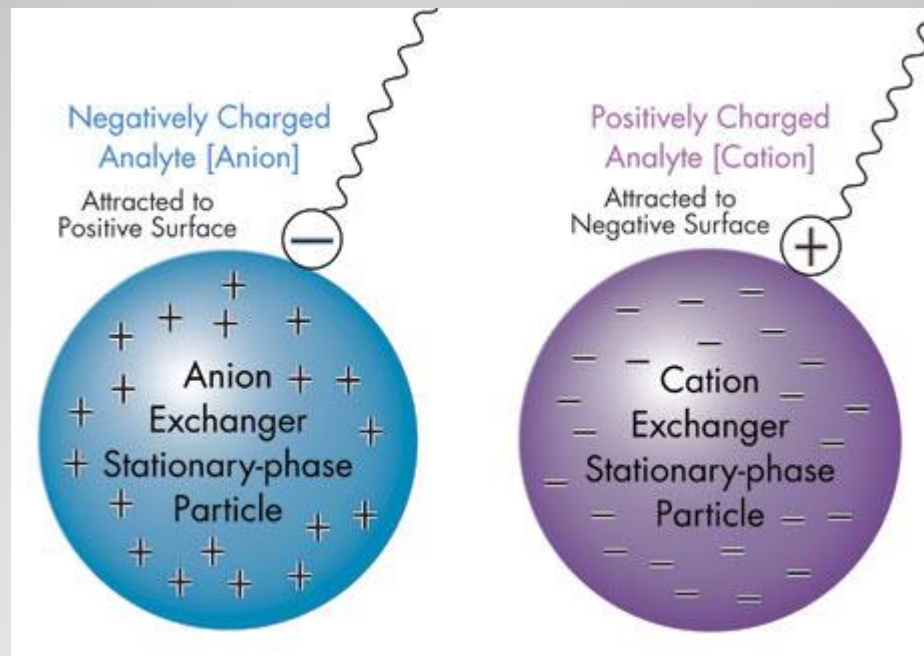
(b) Ion-exchange chromatography



Διαχωρισμός με ιοντοανταλλαγή

ανιονανταλλακτική

κατιονανταλλακτική



Διαχωρισμός με ιοντοανταλλαγή



Ανταλλακτική χωρητικότητα (exchange capacity) =
ικανότητα συγκράτησης = ικανότητα της ρητίνης να
συγκρατεί ανταλλάξιμα ιόντα.

Διαχωρισμός με ιοντοανταλλαγή

– Συντελεστής εκλεκτικότητας (partition constant)

$$K_M = \frac{[X^+][M^+R^-]}{[M^+][X^+R^-]}$$

- Αριθμός διακλαδώσεων 8-10
- Αντιστρεπτότητα
- Sephadex

Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, η κινητή φάση και η θερμοκρασία.

Στατικές φάσεις

Λιπόφιλες

- Ρητίνες πολυστυρενίου (XAD, DOWEX) pH 1-14

Υδρόφιλες

- πολυμερή πολυσακχαριτών

Κινητές φάσεις

H₂O
MeOH
ACN



Buffer

Χειρόμορφη χρωματογραφία

Δυνατότητα διαχωρισμού στερεοϊσομερών

Ειδική στατική φάση

