

Metode cromatografice.

Cromatografia plană

Cromatografia- principiu

- Trecerea unui amestec de substanțe dizolvat în "faza mobilă" de-a lungul unei "faze staționare" care separă substanțele din amestec și permite izolarea acestora.

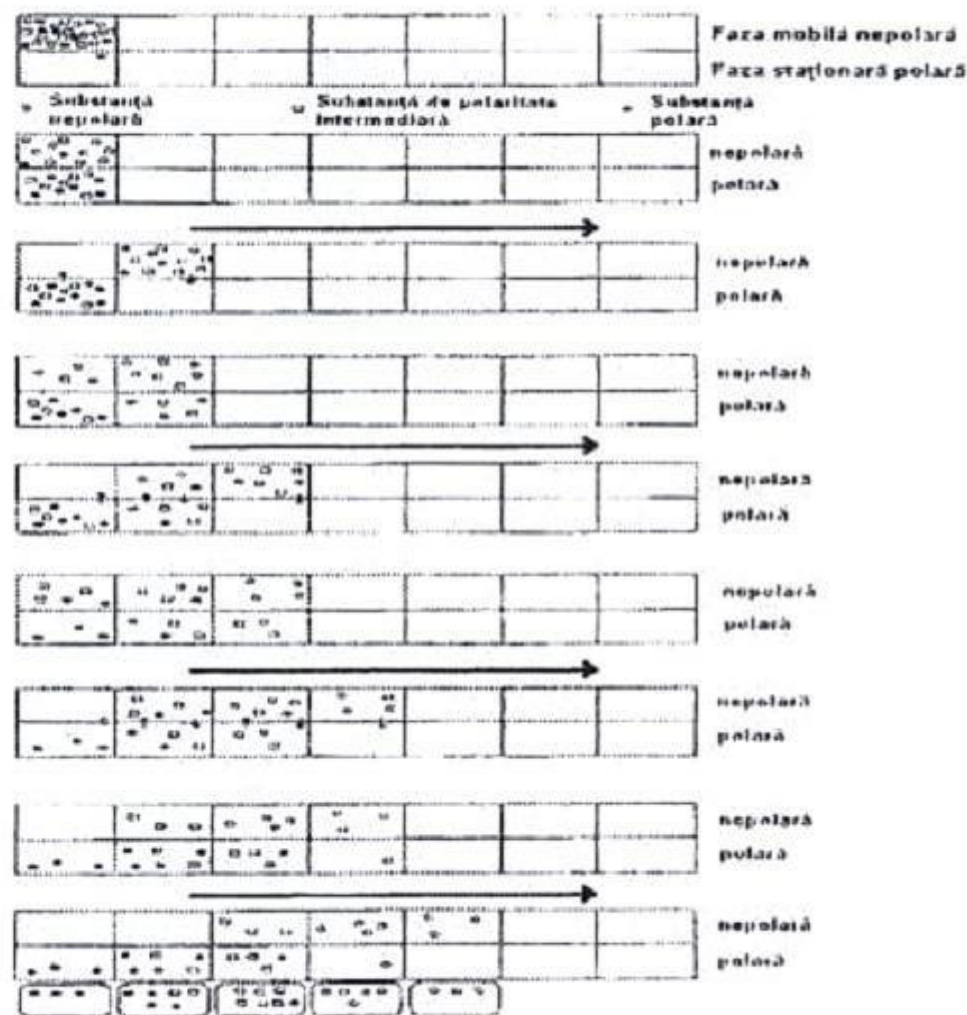


Fig.2 Principiul cromatografiei



Procesul cromatografic

1. Coeficientul de partiție (constanta de distribuție) K_x :
 - gradul de preferință al compusului x pentru una dintre cele două faze;

$$K_x = \frac{C_{stat}}{C_{mob}}$$

C_{stat} , C_{mob} = concentrația compusului x în faza staționară respectiv în cea mobilă, la echilibru

2. Talerele teoretice (N):
 - lungimea suportului cromatografic pe care se atinge echilibrul între concentrația analitului în faza mobilă și faza staționară



Cromatografia

- Cromatografia:
 - preparativă
 - analitică
- Cromatografia preparativă- separarea componentelor unui amestec complex în vederea utilizării lor ulterioare;
- Cromatografia analitică- măsoară cantitatea relativă în care se găsește fiecare component într-un amestec.



Cromatograma

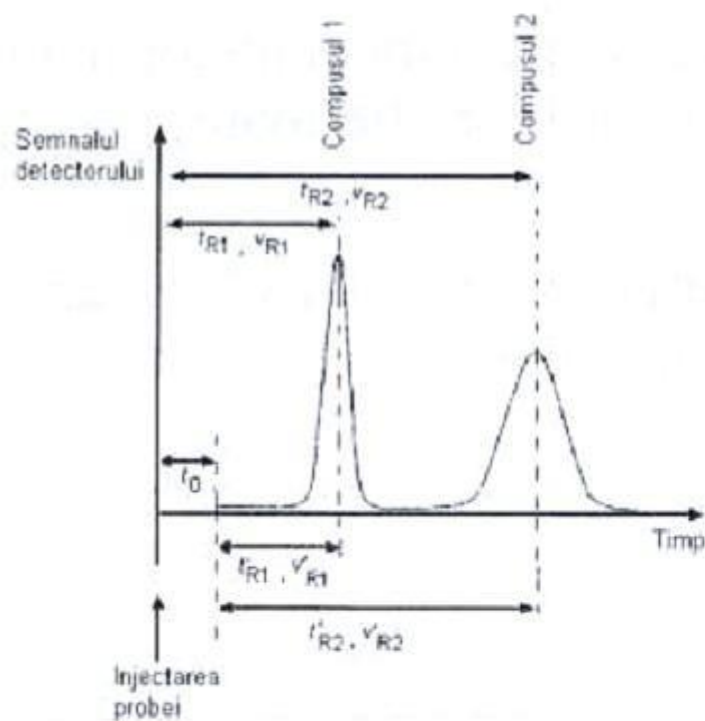


Fig.3 Schema unei cromatograme de eluție

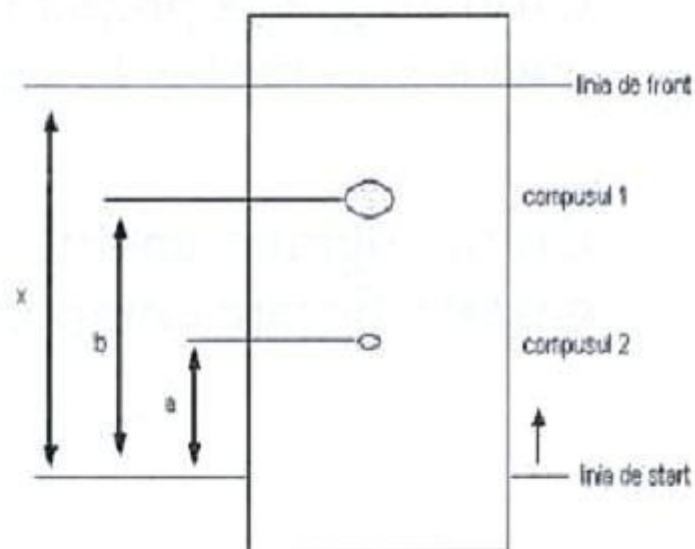


Fig.4 Schema unei cromatograme planare

Cromatograma de eluție- parametri de identificare

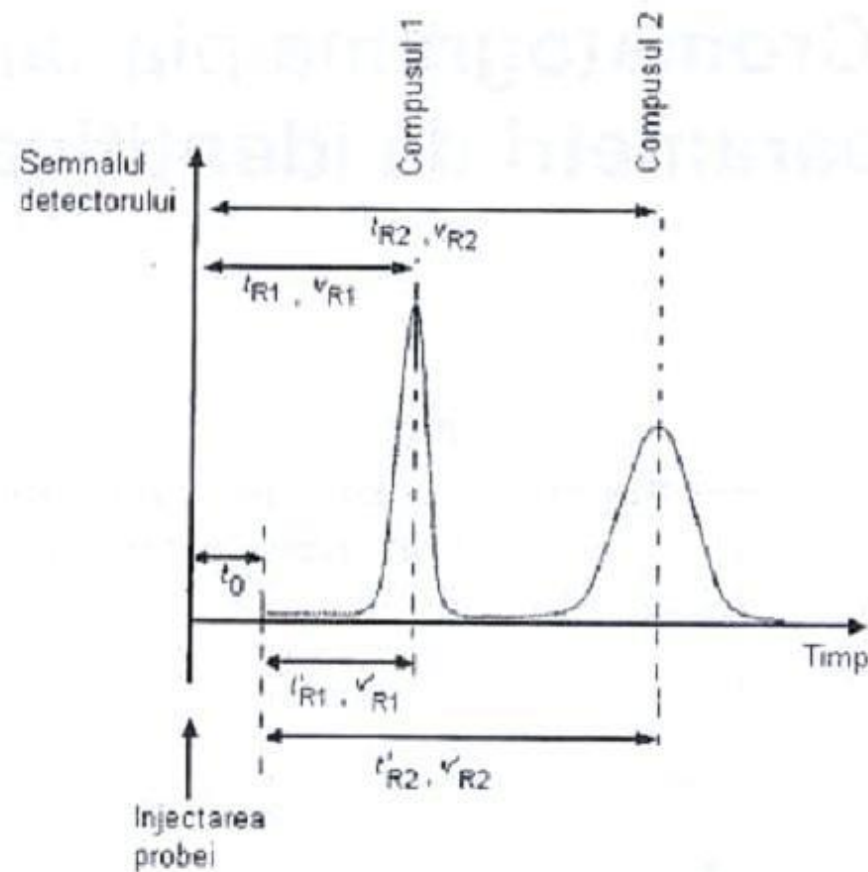


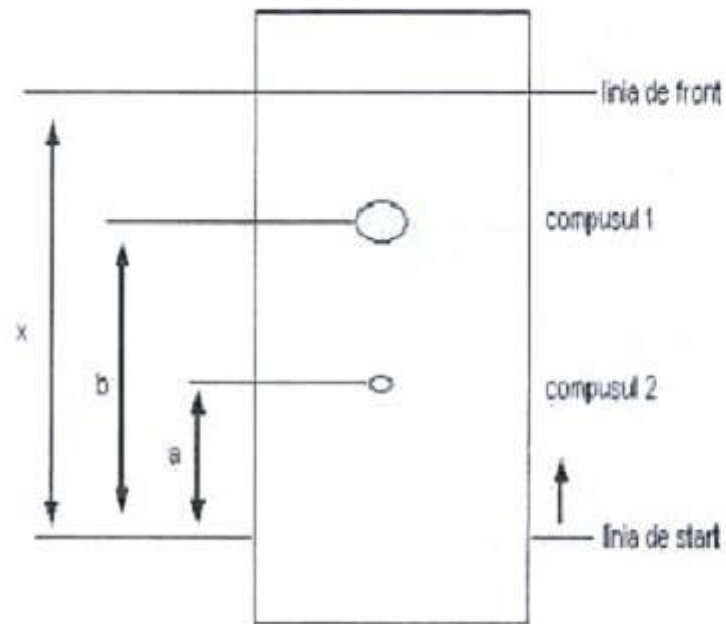
Fig.3 Schema unei cromatograme de eluție

Cromatograma de eluție- parametri de identificare

- Timpul mort (t_o): timpul de eluție al unui component nereținut pe coloană;
- Volumul mort (v_o): volumul de fază mobilă necesar eluției unui component nereținut pe coloană;
- Timpul de retenție (t_R): timpul scurs din momentul injectării probei până la obținerea maximului picului unui compus;
- Volumul de retenție (v_R): volumul de fază mobilă care trece prin coloană din momentul injectării probei până la obținerea maximului picului unui compus;
- Timpul de retenție corectat (t'_r): $t'_r = t_R - t_o$
- Volumul de retenție corectat (v'_r): $v'_r = v_R - v_o$



Cromatograma planară- parametri de identificare



R_f :

- poziția spotului în cromatografia planară
- este reproductibil în condiții reproductibile

compusul 2

$$R_f < 1$$

compusul 1

Fig.4 Schema unei cromatograme planare



CROMATOGRAFIA PLANARĂ

CROMATOGRAFIA PE HÂRTIE (CH)

CROMATOGRAFIA PE STRAT SUBȚIRE (CSS)



Cromatografia pe strat subtire (CSS)

- FR X, European Pharmacopoeia ed. 6.0
- metodă care permite separarea componentelor unui amestec pe baza diferenței lor de deplasare de-a lungul unui strat adsorbant sub acțiunea unui sistem de solvenți.

Mecanismele prin care se poate realiza separarea :

- adsorbție
- repartiție
- schimb ionic



Cromatografia pe strat subtire (CSS)

◆ **Faza staționară**

◆ **Faza mobilă**



Faza staționară în CSS

➤ Silicagel

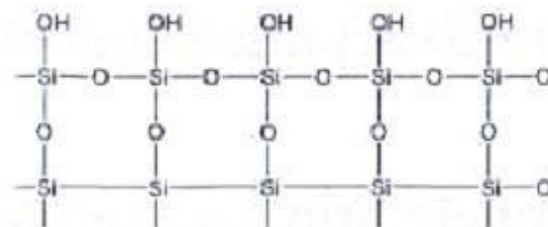


Fig.1 Structura silicagelului

- oxid de aluminiu
- celuloză
- pulbere de poliamidă
- hidroxid, silicat de magneziu/ calciu
- rășini schimbătoare de ioni



Faza staționară în CSS

Se poate aplica:

- sub formă de suspensie:
 - pe placă de sticlă
 - folie de aluminiu/polimer

Se pot adăuga:

- lianți (CaSO_4 , amidon, CMC)- ex. silicagel G, keiselgur G;
- agenți fluorescenți ex. silicagel GF₂₄.

Se activează înainte de utilizare:

- 105°C- 110°C sau 120°C- 1h (FR X)



Alegerea fazei staționare în CSS

În funcție de:

- natura substanțelor de separat (*structură, proprietăți chimice, solubilitate*)
- natura procesului de separare (*adsorbție, repartiție, schimb ionic*).

Separare prin adsorbție:

1. Solidă, insolubilă în faza mobilă;
2. Să nu interacționeze chimic cu faza mobilă și cu substanțele de separat;
3. Polaritate, capacitatea de adsorbție:
 - Slabă ex. CaCO_3
 - Puternică ex. Gel de silice (SiO_2), alumină (Al_2O_3)

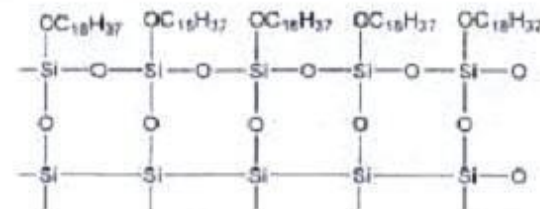
Faza staționară în CSS

Separare prin repartiție:

1. Lichid nemiscibil cu faza mobilă;
2. Impregnată pe un suport rigid (silice)
3. Fixată prin legături covalente la suprafața stratului adsorbant

➤ Fazele grefate:

- Polare: -diol, -cianopropil, -aminopropil;
- Nepolare: -alchil, -fenil;



Separare prin schimb ionic:

1. Suport insolubil în apă grefat cu grupări funcționale ionizabile;



Faza mobilă în CSS

- solvenți organici/anorganici de puritate avansată, cu capacitate de eluție diferită față de același adsorbant.

Capacitatea de eluție a fazei mobile depinde de:

- polaritate
- constanta dielectrică
- capacitatea de a forma legături de hidrogen
- variația Ph-ului mediului de adsorbție



Faza mobilă în CSS

Clasificarea diferiților solvenți, în funcție de capacitatea eluantă
SERIE ELUOTROPĂ

Solvent	Capacitate eluantă	Solvent	Capacitate eluantă
Eter de petrol	0,01	Acetonă	0,56
Hexan	0,01	Dioxan	0,56
Ciclohexan	0,04	Butanol	0,56
Tetraclorură de carbon	0,18	Acetat de etil	0,58
Eter izopropilic	0,28	Acetonitril	0,65
Toluen	0,29	Piridină	0,71
Benzen	0,32	Dimetilsulfoxid	0,75
Eter etilic	0,38	Izopropanol	0,82
Cloroform	0,40	Etanol	0,88
Clorură de metilen	0,42	Metanol	0,95
Diclorețan	0,49	Apă	> 0,95
		Acid acetic	> 0,95



Alegerea fazei mobile în CSS

- structura, proprietățile substanțelor de separat;
- se utilizează amestecuri de doi sau mai mulți solvenți.
- polaritate opusă fazei staționare

Alegerea fazei staționare și a fazei mobile în CSS

- ◆ Faza staționară:
 - Aceeași polaritate cu cea a substanțelor de separat
- ◆ Faza mobilă:
 - Polaritate opusă fazei staționare



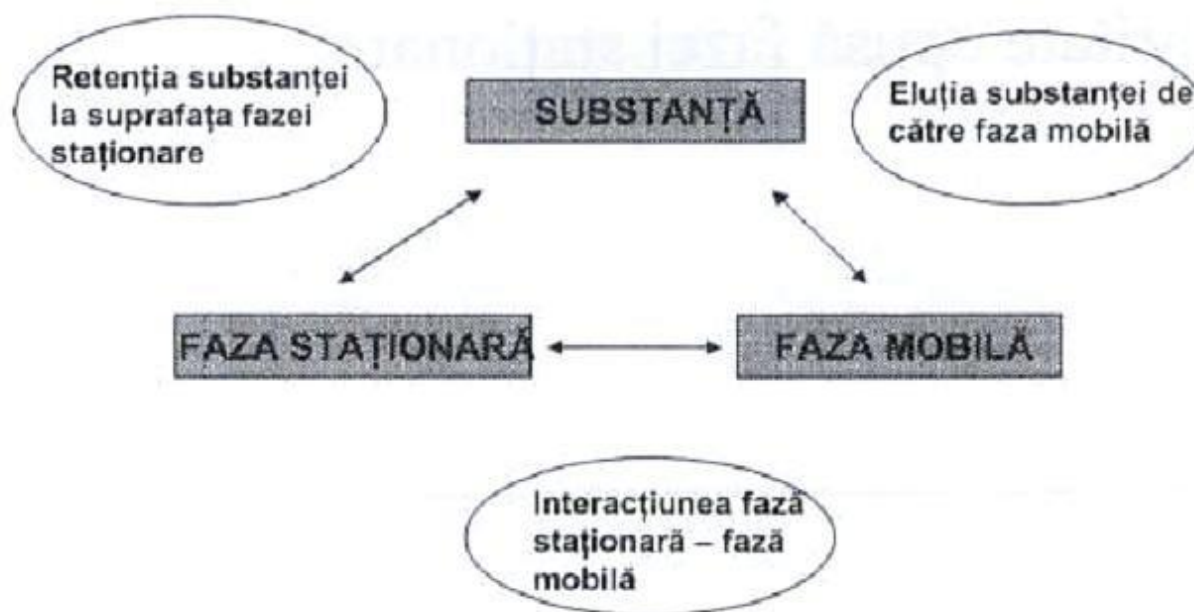
Procesul de separare prin CSS

Are la bază interacțiunea:

Fază staționară- Substanță- Fază mobilă

FORȚA DE RETENȚIE

FORȚA DE ELUARE





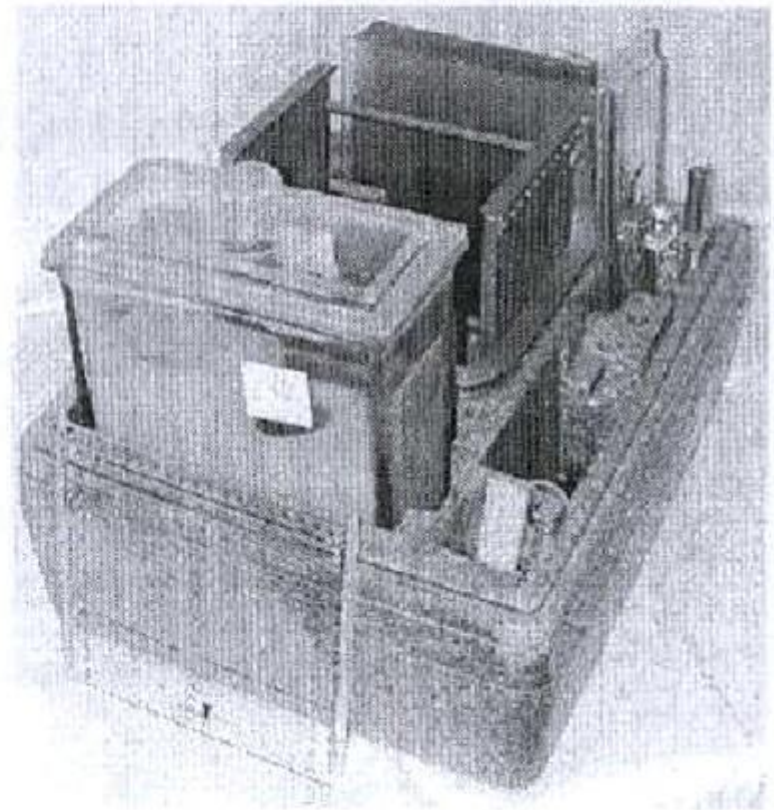
Procesul de separare prin CSS

Optimizarea procesului de separare:

- substanțele rămân pe linia de start → se crește polaritatea fazei mobile (prin adăugare de apă, alcooli, acizi, baze);
- substanțele migrează în frontul solventului → se scade polaritatea fazei mobile.

● ● | Aparatura în CSS

- Plăci cromatografice din sticlă sau din alte materiale:
 - $L = 20\text{ cm}$, l variabilă;
- Vase de sticlă :
 - închidere etanșă, dimensiuni convenabile;
- Micropipete, microsiringi sau alte dispozitive (FR X).





Etapele unei tehnici CSS

- Aplicarea probelor
- Developarea
- Uscarea
- Revelarea
- Interpretarea
- Conservarea

● ● | Etapele unei tehnici CSS

- ◆ Aplicarea probelor:
 - solvenți volatili
 - pipete Pasteur, microsiringi,
 - la 2 cm de bază (linia de start);
 - volumul de probă aplicat: μl ;
- ◆ Developarea cromatogramei:
 - pe o distanță de 10 cm;
 - linia de front- 5 cm de la baza plăcii opusă liniei de start;
 - în sistemul de solvenți aleși, folosind tehnicile cromatografice de developare;



Tehnici cromatografice de dezvoltare

- I. În funcție de sensul de migrare a solventului pe placa cromatografică:
 - ♦ tehnica ascendentă: migrarea fazei mobile se realizează datorită forței de capilaritate;
 - ♦ tehnica descendentă: migrarea fazei mobile se realizează în sensul forței de gravitație;



Tehnici cromatografice de dezvoltare

II. Dezvoltarea plăcii cromatografice se poate realiza:

- ◆ tehnica unidimensională

Exemplu: amestec aspirină(A)/ cafeină(C)/ fenacetină(F)

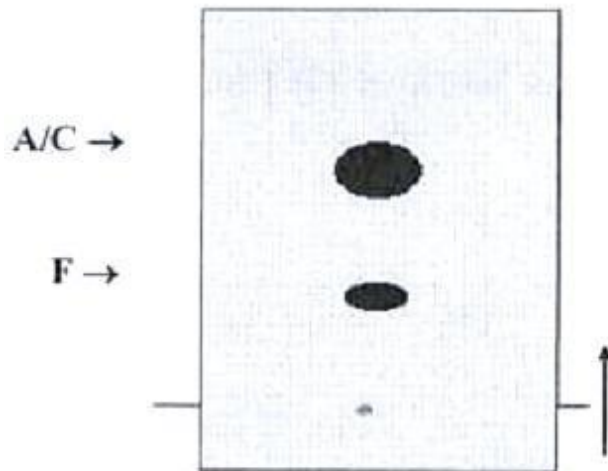


Fig 2. A/C/F

Sistem de solvenți A

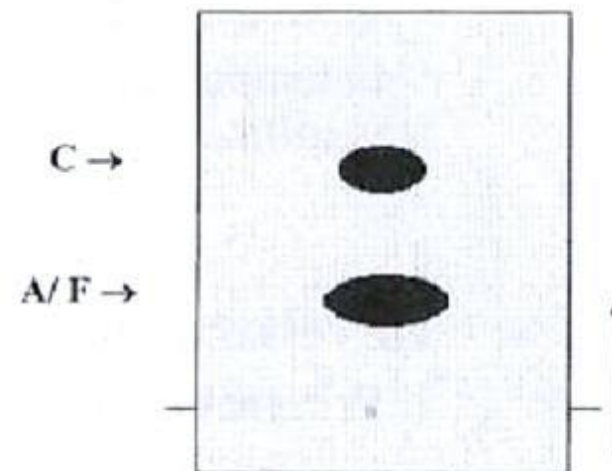


Fig 3. A/C/F

Sistem de solvenți B



Tehnici cromatografice de dezvoltare

- ◆ tehnica bidimensională

Exemplu: amestec aspirină(A)/ cafeină(C)/ fenacetină(F)

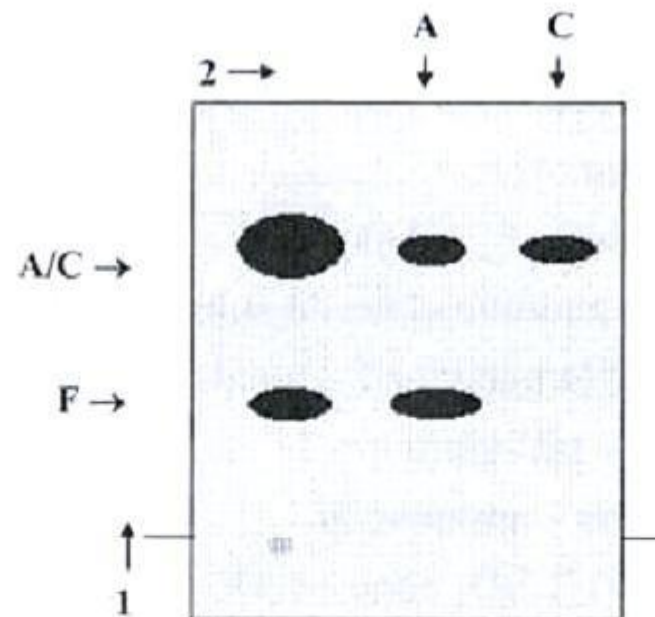


Fig 4. A/C/F

Sistem de solvenți
1,2



Etapele unei tehnici CSS

- ◆ Uscarea cromatogramelor:
 - în scopul îndepărtării solvenților;
 - la temperatura camerei (în nișă), cu un uscător de păr, cu un ventilator.

- ◆ Revelarea cromatogramei:
 - I. Prin metode fizice:
 - iradierea cu radiații UV- substanțele separate prezintă fluorescență;
 - tratarea fazei staționare cu indicatori fluorescenți- substanțele separate apar ca pete întunecate pe fond fluorescent.



Etapele unei tehnici CSS

2. Prin metode chimice:

Reactivi de revelare:

- generali: ex. KMnO_4 , I_2 , AgNO_3 ;
- specifici pentru anumite clase de substanțe:
 - reactivul Dragendorff – alcaloizi ;
 - NaNO_2 – sulfamide ;
 - ninhidrina – aminoacizi.
- reactivi corosivi (H_2SO_4 conc., 100°C , $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

3. Prin metode biologice:

- se bazează pe proprietatea unor substanțe de a forma compuși colorați sau fluorescenți sub acțiunea unor enzime cu care faza staționară a fost impregnată în prealabil.



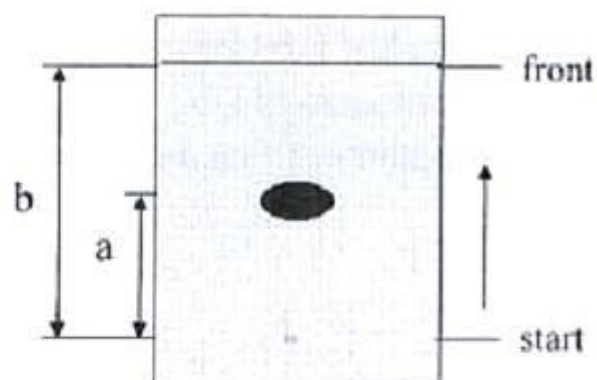
Etapele unei tehnici CSS

♦ Interpretarea cromatogramei :

Analiza calitativă

R_f:

- constantă fizico- chimică caracteristică fiecărei substanțe;
- este reproductibil în condiții reproductibile.



$$R_f = a/b \quad R_f < 1$$

(cm)



Etapele unei tehnici CSS

Analiza cantitativă:

1. Metode directe - măsurătorile se fac direct pe placa cromatografică;
2. Metode indirecte - se extrag în prealabil substanțele separate pe cromatogramă.

1. Metode directe

- ♦ Metoda măsurării suprafeței $S(\text{cm}^2) = f \lg C(\mu\text{g})$;
- ♦ Metode optice
 - Măsurarea densității optice/fluorescenței;
 - Spectrofotometrie "*in situ*" → curbe de etalonare absorbantă- concentrație;

Interpretarea cromatogramei

2. Metode indirecte

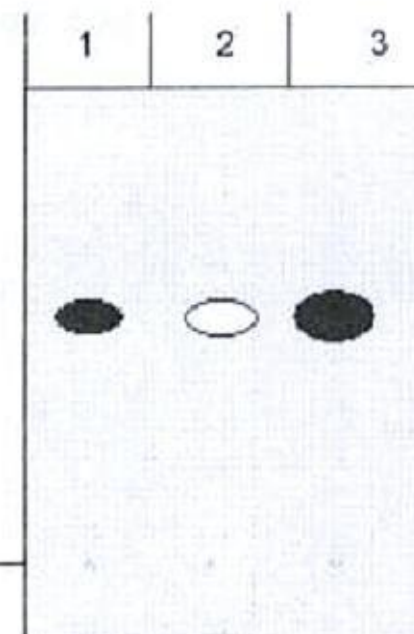
- Se răzuiește zona care conține spotul corespunzător substanței de analizat;
- Se răzuiește zona care conține spotul corespunzător substanței etalon;
- Se răzuiește și o zonă fără substanță de la același Rf (blanc);
- Se eluează în solvenți potriviți pentru determinarea în UV;
- Se citește absorbanta probei (A_p) și a etalonului (A_e) față de blanc.

$C_p \dots \dots \dots A_p$

$C_e \dots \dots \dots A_e$

◆ Păstrarea cromatogramei

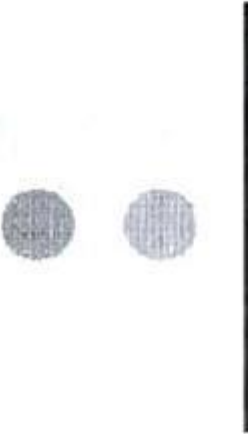
- se fotografiază;
- se impregnează cu un lac izolant sau cu parafină.



1-subst de analizat

2-blanc

3-subst. etalon



CROMATOGRAFIA PE STRAT SUBȚIRE (CSS)

Aplicații în analiza medicamentului



Aplicațiile CSS în analiza medicamentelor

- ♦ **Separare**
- ♦ **Identificare**
- ♦ **Control de puritate**
- ♦ **Determinare cantitativă**



Identificare prin CSS

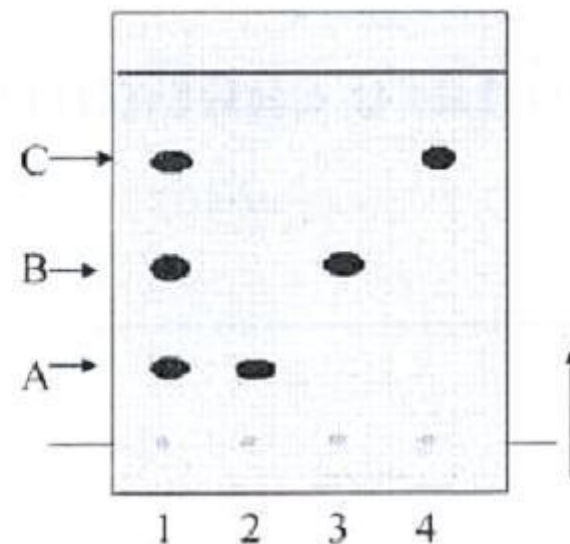
- Tehnica standardelor externe;
- Tehnica standardelor interne;
- Tehnica standardelor interne în concentrații crescânde;
- Tehnica eluției.



Identificare prin CSS

- Tehnica standardelor externe
 - când dispunem de un standard extern;
 - se compară Rf-ul substanței de analizat separată prin CSS cu Rf-ul etalonului cromatografiat în paralel;

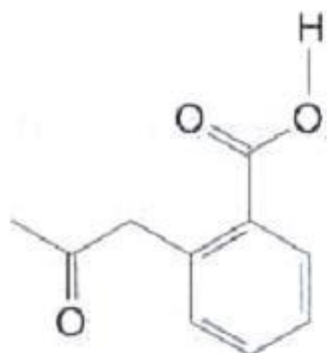
Ex. 1= Proba: A+B+C; etaloane: 2= A, 3= B, 4= C



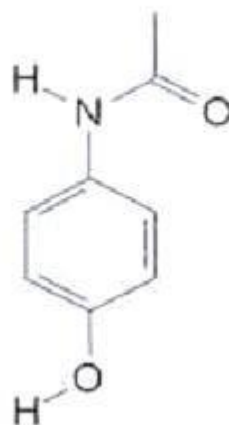


Identificare prin CSS

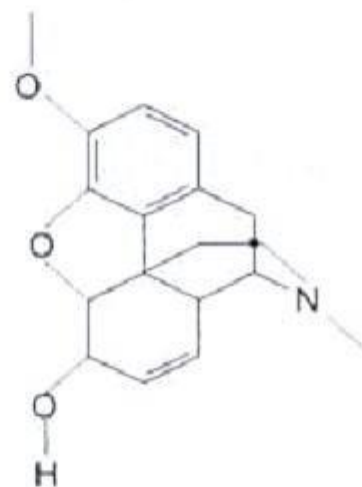
- Identificarea componentelor din comprimate analgezice



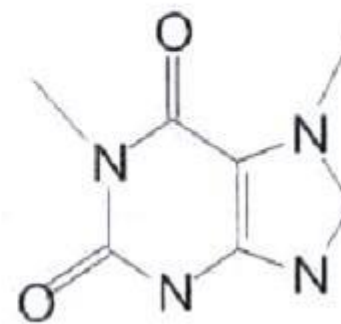
Acid acetil salicilic



Codeină



Paracetamol



Cafeină



Identificare prin CSS

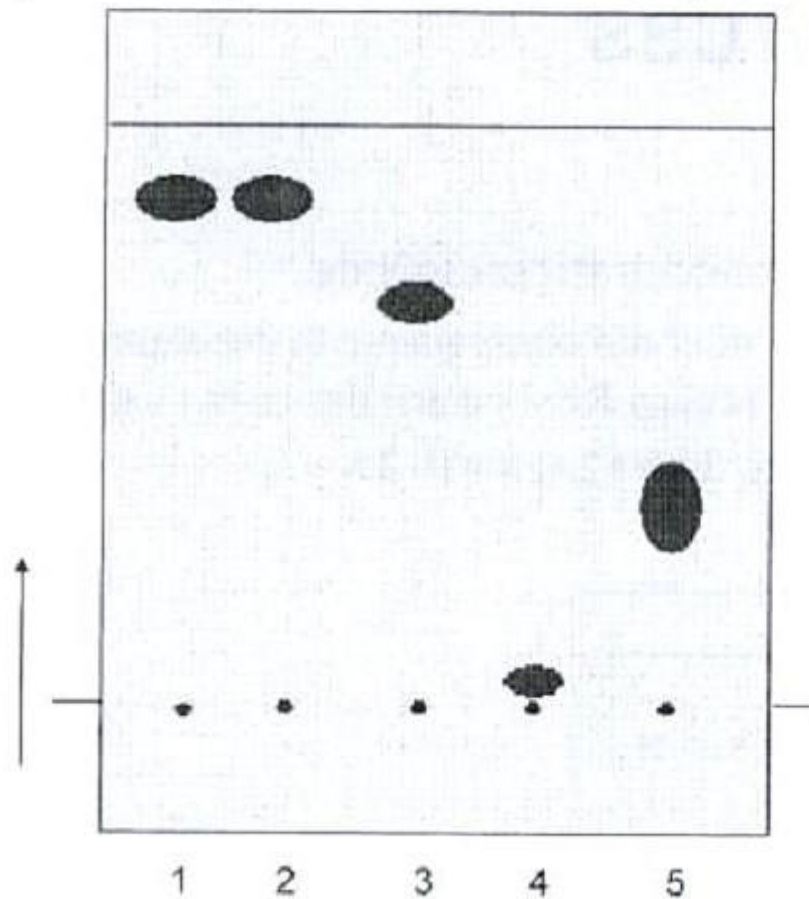
Condiții cromatografice:

- *Adsorbant:* silicagel GF₂₅₄
- *Developant:* acetat de etil - acid acetic glacial (99:1)
- *Soluții de aplicat:*
 - Sol. etalon 1% m/V în metanol de acid acetil salilic, paracetamol, codeină, cafeină
 - Sol. probă
- *Distanța de migrare a developantului:* 10 cm
- *Revelarea cromatogramei:*
 - expunere la lumina UV



Identificare prin CSS

Separarea și identificarea componentelor din comprimate analgezice



- 1- sol. probă
- 2- sol etalon acid acetilsalicilic
- 3- sol. etalon paracetamol
- 4- sol. etalon codeină
- 5- sol etalon cafeină

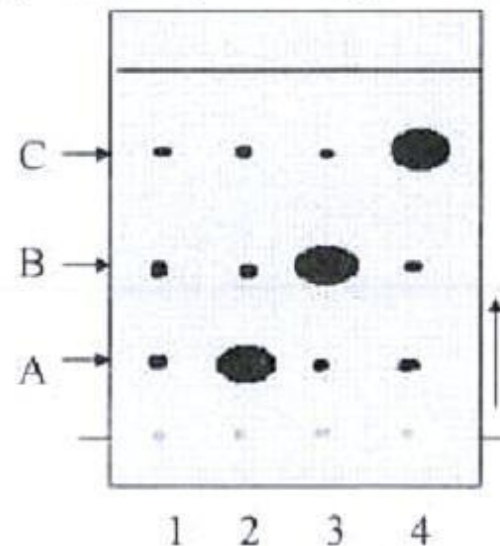


Identificare prin CSS

➤ Tehnica standardelor interne

- când nu dispunem de standarde externe;
- în proba de analizat se introduce pe rând unul din componente; se observă creșterea suprafeței zonei și a intensității colorației spotului corespunzător componentului adăugat.

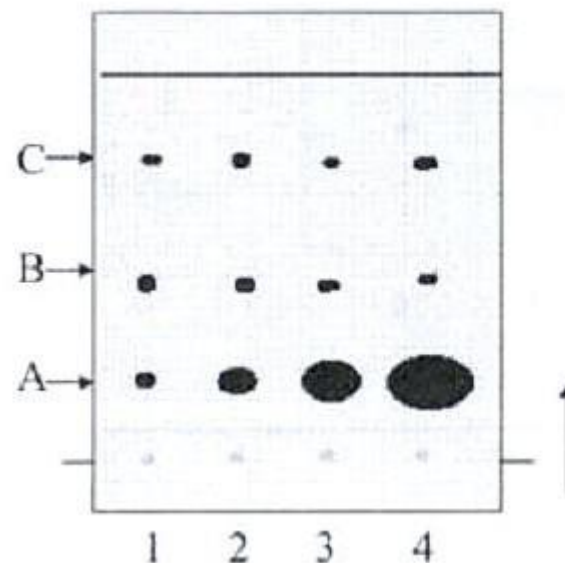
Ex. 1= Proba(P):A+B+C; 2=P+A, 3= P+B, 4= P+C





Identificare prin CSS

- Tehnica standardelor interne în concentrații crescânde
 - în proba de analizat se introduce unul din componente în concentrații crescânde; se observă apariția unor zone cu același R_f și cu arii din ce în ce mai mari.
 - Ex. 1= Proba(P):A+B+C; 2=P+A, 3= P+2A, 4= P+3A





Identificare prin CSS

➤ Tehnica eluției

- când nu dispunem de etaloane
- se răzuiește adsorbantul care conține zona corespunzătoare cromatografiei compusului, se suspendă în solvenți adecvați
- substanța extrasă se va determina prin metode spectrale (UV, VIS), refractometrice.

Determinarea purității unei substanțe medicamentoase prin CSS

- tehnica CSS se poate utiliza pentru evaluarea purității unei s.m. în condițiile în care ea prezintă o sensibilitate de 0,5-5%;
- uneori natura impurității se cunoaște, alteori se presupune;
- în cazul în care atât substanța de analizat cât și impuritatea prezintă aceeași modalitate de revelare, testul de puritate în CSS se poate aborda în una din următoarele situații:

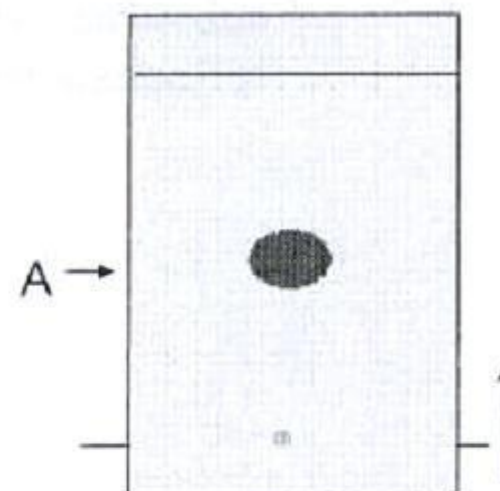
Determinarea purității unei substanțe medicamentoase prin CSS

➤ O anumită cantitate de substanță cromatografiată în condițiile prescrise este considerată pură numai dacă pe cromatogramă apare o singură zonă (pată)

Ex. FRX - **CHLORDIAZEPOXIDUM** (Clordiazepoxid)

Condiții cromatografice:

- *Adsorbant*: silicagel G
- *Developant*: toluen-cloroform-metanol (40:100:10)
- *Soluția de aplicat*: 0,50% m/V în metanol
- *Volumul de soluție aplicat*:
10 μ l (50 μ g clordiazepoxid)
- *Distanța de migrare a developantului*: 15 cm
- *Revelarea cromatogramei*: tetraiodobismutat (III) de potasiu
- *Examinare*: la lumina zilei



➤ Pe cromatogramă, în afara petei corespunzătoare clordiazepoxidului (A), nu trebuie să apară alte pete.

Determinarea purității unei substanțe medicamentoase prin CSS

- FRX: etaloane de impurități
- O anumită cantitate de probă se examinează în paralel cu un etalon de impurități (în concentrație situată la limita maximă admisă de FRX).

Ex. FRX – CHLORAMPHENICOLI NATRII SUCCINAS

(Succinat de cloramfenicol și de sodiu)

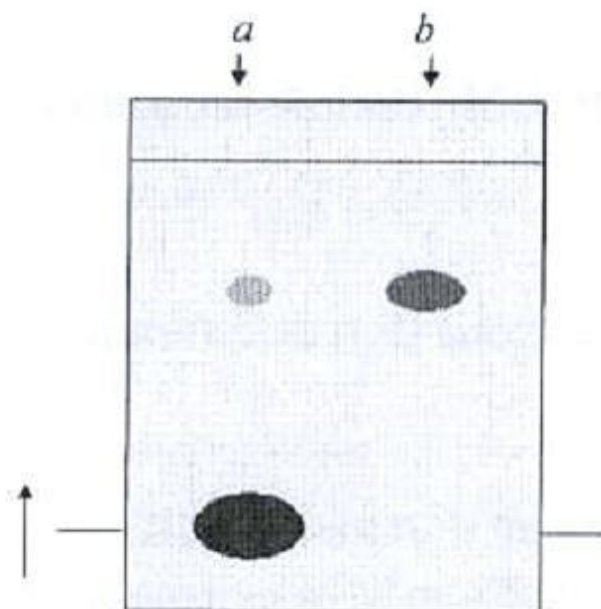
Cloramfenicol neesterificat. Cel mult 2,0%

Condiții cromatografice:

- *Adsorbant*: silicagel G
- *Developant*: acetonă-cloroform-eter de petrol (30:20:50)
- *Soluția de aplicat*: a = succinat de cloramfenicol și de sodiu 10,0% m/V în metanol
 b = cloramfenicol (c.n.) 0,2% m/V în metanol
- *Distanța de migrare a developantului*: 15 cm
- *Examinare*: în lumină UV(254 nm)

Determinarea purității unei substanțe medicamentoase prin CSS

Dacă pe cromatogramă, în dreptul punctului *a*, pe lângă pata principală corespunzătoare succinatului de cloramfenicol și de sodiu, cu fluorescență violetă, de pe linia de start, mai apare o altă pată, mărimea și intensitatea acesteia nu trebuie să depășească mărimea și intensitatea petei din dreptul punctului *b*.



FR X: Cloramfenicol neesterificat.
Cel mult 2,0%

a: 2 μ l soluție *a* (200 μ g succinat de cloramfenicol și de sodiu)

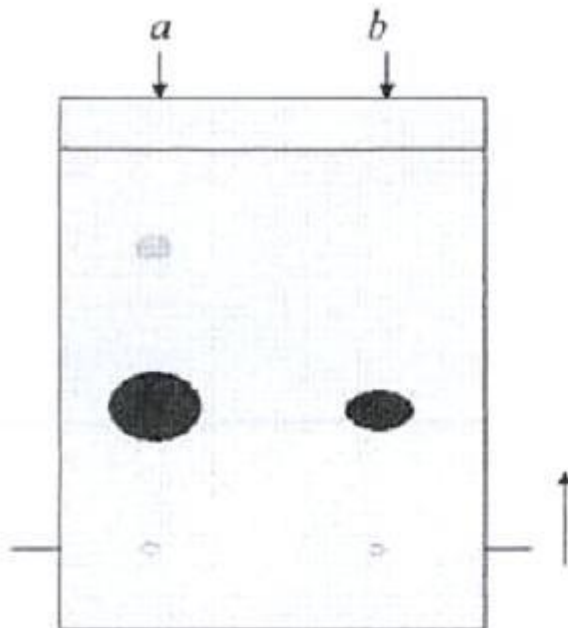
b: 2 μ l soluție *b* (4 μ g cloramfenicol e.n.)

Determinarea purității unei substanțe medicamentoase prin CSS

- Tehnica concentrat- diluat
 - se utilizează când nu dispunem de un etalon de impurități;
 - constă în cromatografierea a două soluții ale aceleiași substanțe active: concentrată și diluată (corespunzând limitei la care impuritatea nu mai trebuie să fie detectată – FR X);
 - se compară zona impurității detectată în soluția concentrată (proba), ca mărime și intensitate cu zona corespunzătoare probei din soluția diluată.

Determinarea purității unei substanțe medicamentoase prin CSS

Pe cromatogramă, în dreptul punctului *a*, pe lângă pata principală corespunzătoare diclofenacului sodic, mai poate să apară o singură pată a cărei mărime și intensitate nu trebuie să depășească mărimea și intensitatea petei din dreptul punctului *b*.



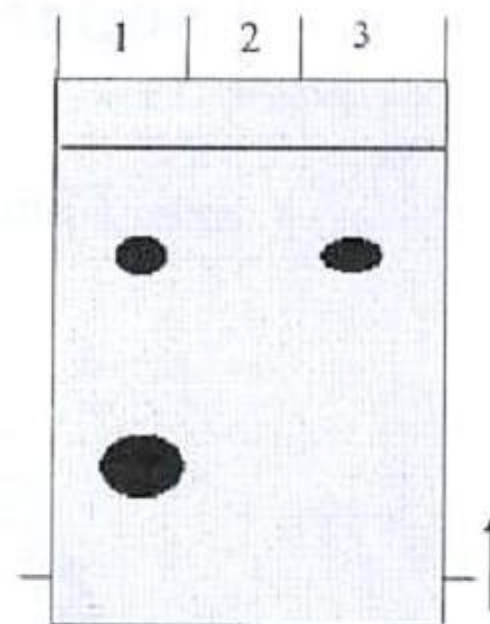
FR X: Impurități înrudite chimic.
Cel mult 0,5%

a: 10 μ l sol.a (100 μ g diclofenac sodic)

b: 2,5 μ l sol.b (0.5 μ g diclofenac sodic)

Determinarea purității unei substanțe medicamentoase prin CSS

- Suprafața plăcii se împarte în trei câmpuri egale (1, 2, 3)
- Se cromatografiază:
 - 1- proba (Cp)
 - 2- zonă liberă (blanc)
 - 3- etalon de impurități (Ce)
- Developare
- Revelare
- Eluarea zonelor de la același Rf din probă, zona liberă, etalon, în solvenți potriviți (UV)
- Se citește absorbanta imp. din probă (Ap) și a etalonului de impurități (Ae) față de blanc (zona 2)
- Se calculează puritatea procentuală a probei cunoscând concentrația etalonului de impurități.





Dozarea unei substanțe medicamentoase separate prin CSS

➤ Metode directe

➤ Metode indirecte

Dozarea unei substanțe medicamentoase separate prin CSS

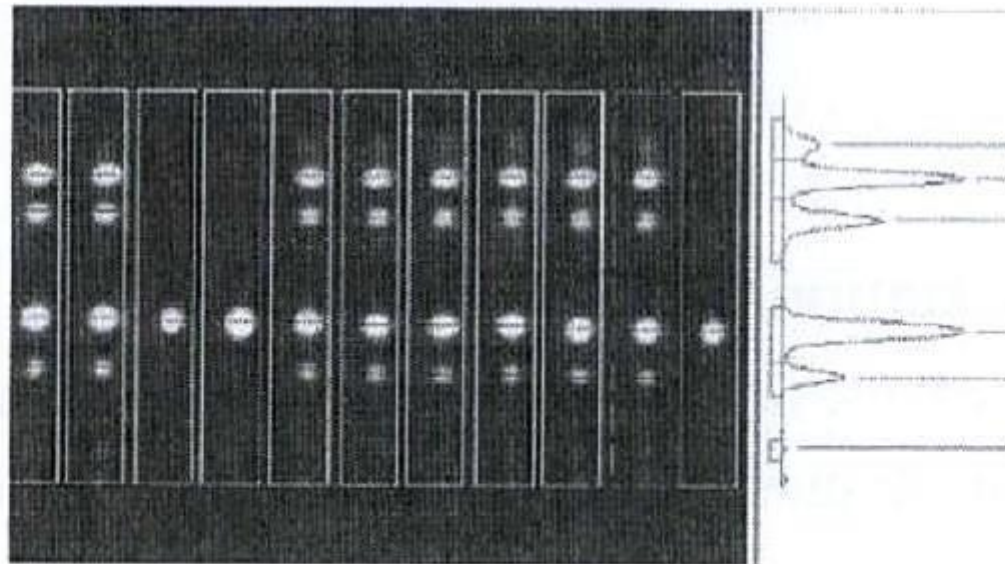
- Metode directe (densitometrice):



Fotodensitometru

Dozarea unei substanțe medicamentoase separate prin CSS

- Metode directe (densitometrice):
- Densitatea optică a substanțelor separate în funcție de distanța de migrare



Fotodensitogramă



Dozarea unei substanțe medicamentoase separate prin CSS

➤ Metode indirecte

Metoda eluției:

1- soluția probei de determinat (C_p);

2- zonă liberă (blanc);

3- soluția unui etalon (C_e , cunoscută).

➤ Developarea cromatogramei

➤ Revelarea cromatogramei

➤ Suspendarea zonelor revelate în diferiți solvenți

➤ Determinarea absorbantei probei (A_p) și a etalonului (A_e) față de blanc

