به نام خدا

فارماگوگنوزی ۲ عملی

جلسه: اول

عنوان جلسه: تعیین سیستم حلال کروماتوگرافی

استاد مربوطه: دکتر ثمین محمدی

نویسنده و تایپیست: محمدجواد کمالی

ویراستار: امین شفائی باقری

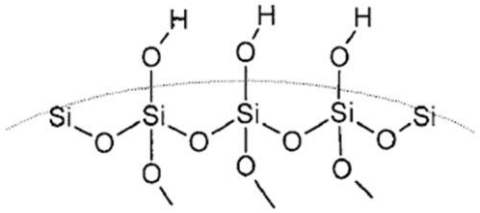
گروه جزوه نویسی داروسازی ورودی بهمن ۹۵

موضوع این جلسه، تعیین سیستم حلال مناسب برای کروماتوگرافی می باشد.

کروماتوگرافی روشی برای جداسازی اجزای یک مخلوط است تا بتوانیم هر یک از این اجزا را بصورت مستقل آنالیز کنیم. همه روشهای کروماتوگرافی بر پایه توزیع متمایز ترکیبات بین دو فاز عمل می کنند که یک فاز نسبت به فاز دیگر حرکت می کند. به این فازها، فازهای ساکن و متحرک گفته می شود. فاز ساکن در اغلب موارد، جامد است و به دو دسته کلی قطبی و غیر قطبی تقسیم می شود.

اگر فاز ساکن قطبی باشد (مثل سیلیکاژل) به این نوع کروماتوگرافی، کروماتوگرافی فاز نرمال می گویند. ولی اگر فاز ساکن، غیر قطبی باشد (مثل ستون های C_8H_{18}) کروماتوگرافی فاز معکوس گفته می شود.

در شکل زیر، گروه های سیلانول سطح سیلیکاژل را مشاهده می نمایید که اگر زنجیره های هیدروکربنی C_8H_{18} با پیوند اتری به گروه های هیدروکسیل وصل شوند، ماهیت ستون عوض شده و غیر قطبی می شود.



فرآیندهای فیزیکوشیمیایی متعددی در انواع روش های کروماتوگرافی دخیل هستند، از جمله: جذب، تقسیم، تعویض یونی، اندازه ذرات و افینیتی که هر کدام کاربرد های مختلفی دارند. برای مثال، فرآیند افینیتی (تمایل) را برای جداسازی آنتی ژن و آنتی بادی یا آنزیم و سوبسترا می توان استفاده کرد.

به طور معمول، مخلوطی از روش های فیزیکوشیمیایی گفته شده در هر روش کروماتوگرافی دخیل هستند. بطور مثال، رطوبت موجود در سطح سیلیکاژل، می تواند فرآیند تقسیم را به جذب اضافه کند. در فرآیند تقسیم، ترکیبات براساس partition coefficient بین دو فاز مایع غیر قابل اختلاط توزیع می شوند. در فرآیند جذب، مولکول ها با نیروی های بین مولکولی مثل واندروالس، دوقطبی-دوقطبی و پیوند هیدروژنی به سایت های فعال روی فاز ساکن، جذب می شوند. مثلاً در مورد سیلیکاژل، حضور گروه های هیدروکسیل، امکان برقراری پیوند های هیدروژنی با مولکول های آنالیت وجود دارد.

اگر همه سایت های فعال سیلیکاژل، پوشیده از مولکول های آب باشد، پلیت غیر فعال است. چون فرآیند جذب، که اصلی ترین فرآیند جداسازی با سیلیکاژل است صورت نمی گیرد. اگر بخشی از سیلیکاژل با مولکول های آب پوشیده شده باشد، پلیت نیمه فعال است و فرآیند تقسیم در کنار فرآیند جذب صورت می گیرد.

کروماتوگرافی به روش های مختلفی انجام می شود:

- Gas chromatography (GC): روشی برای جداسازی مواد فرار مثل اسانس ها
- high-pressure liquid chromatography (HPLC)
- Thin-layer chromatography (TLC): کروماتوگرافی لایه نازک

تمرکز ما در این جلسه روی روش TLC است.

- کاربردهای روش TLC:

۱- کنترل و شناسایی ترکیبات اصلی موجود در عصاره

۲- بهینه سازی سیستم حلال برای جداسازی های نهایی. چون مقدار کمی از حلال و نمونه نیاز است، به صرفه تر است که با TLC ، سیستم حلال مناسب را انتخاب بکنیم. بعد، از HPLC برای جداسازی نهایی استفاده کنیم. چون اگر مستقیم به روش ستون یا HPLC برویم، برای بهینه سازی، مقدار زیادی از حلال و نمونه را از دست می دهیم.

۳- تخلیص نهایی مقادیر نسبتاً کم ترکیبات خالص. اگر ماتریکس خیلی پیچیده نباشد، یعنی نمونه از دو یا سه ترکیب خالص تشکیل شده باشد، می توانیم از این روش برای تخلیص نهایی استفاده کنیم. پس ایرادی که این روش دارد این است که مقادیر کمی از مواد را می توانیم جداسازی کنیم.

فاز ساکن در TLC، معمولاً سیلیکاژل است. البته می تواند آلومین هم باشد. آلومین می تواند اسیدی، بازی یا خنثی باشد، پس روش مناسبی برای جدا سازی ترکیباتی مثل آلکالوئیدها که خاصیت قلیایی دارند، مناسب است.

بر خلاف محدودیت هایی که برای انتخاب فاز ساکن داریم، فاز متحرک می تواند انواع مختلفی داشته باشد. یعنی برای بهینه کردن جداسازی، بیشتر می توانیم روی فاز متحرک مانور دهیم تا فاز ساکن.

سه ویژگی مهم حلال ها که در انتخاب سیستم حلال باید مورد توجه قرار بگیرد،Elution , Selectivity , Miscibility می باشد.

از آنجایی که سیستم حلال، باید تک فازه باشد، اختلاط پذیری (Miscibility) حلال ها، اهمیت ویژه ای دارد. روش های مختلفی برای پیش بینی اختلاط حلال ها وجود دارد. برای مثال، در یک روشی باتوجه به اینترکشن های مولکولی به ۵ کلاس مختلف تقسیم شده اند و تفاوت آنها ناشی از تعداد و قدرت پیوند هیدروژنی بین مولکول های حلال است که حلال های معروف و تیپیکال هر یک از این گروه ها عبارت است از :

Water, Methanol, Piperidine, Chloroform, n-Heptane

اعضای هر یک از گروه ها به ترتیب افزایش محلولیت در آب یا کاهش محلولیت در n-Heptane رده بندی شده اند و به این ترتیب، سری میکسوتروپیک برای حلال ها بوجود امده است. در این رده بندی حلال ها، هرچه فاصله در حلال از هم بیشتر باشد، احتمالً اختلاط پذیری آنها در هم کمتر است.

در سری میکسوتروپیک، حلال ها با ۷-۸ تا فاصله از هم قابل اختلاط هستند و اگر فاصله بیشتر باشد با اختلاط پذیری بصورت تجربی امتحان شود. برای مثال استیک اسید (شماره ۸) را در نظر بگیرید. این حلال با حلال های شماره ۱ تا ۱۶ قابل اختلاط است. اما نمی توانیم بگوییم با حلال فنول (شماره۲۱) غیر قابل اختلاط است و برای اطمینان از اختلاط پذیری بصورت تجربی امتحان می کنیم.

Table A-10. Mixotropic Solvent Series[a–e].

(1) Water	(37) 1-Octanol
(2) Lactic acid	(38) Diethoxymethane
(3) Formamide	(39) Hexanoic acid
(4) Morpholine	(40) Butyl acetate
(5) Formic acid	(41) Di-*i*-propoxymethane
(6) Acetonitrile	(42) Nitromethane
(7) Methanol	(43) 1-Bromobutane
(8) Acetic acid	(44) Di-*i*-propyl ether
(9) Ethanol	(45) Butyl butyrate
(10) 2-Propanol	(46) 1-Bromopropane
(11) Acetone	(47) Di-*n*-butyl ether
(12) 1-Propanol	(48) Dichloromethane
(13) 1,4-Dioxane	(49) Trichloromethane
(14) Propanoic acid	(50) Di-*i*-amyl ether
(15) Tetrahydrofuran	(51) 1,2-Dichloroethane
(16) *t*-Butanol	(52) Bromobenzene
(17) 2-Methylpropanoic acid	(53) 1,1,2-Trichloroethane
(18) 2-Butanol	(54) 1,2-Dibromethane
(19) 2-Butanone	(55) Bromoethane
(20) Cyclohexanone	(56) Benzene
(21) Phenol	(57) 1-Chloropropane
(22) *t*-Amyl alcohol	(58) Trichloroethene
(23) 1-Butanol	(59) Toluene
(24) 3-Methylphenol	(60) Xylenes
(25) Cyclohexanol	(61) Tetrachloromethane
(26) *i*-Amyl alcohol	(62) Carbon disulfide
(27) 1-Pentanol	(63) Decalin
(28) Benzyl alcohol	(64) Cyclopentane
(29) Ethyl acetate	(65) Cyclohexane
(30) 1-Hexanol	(66) *n*-Hexane
(31) 2,4,6-Trimethylpyridine	(67) *n*-Heptane
(32) Pentanoic acid	(68) Kerosene
(33) Ethyl formate	(69) Petroleum ether
(34) 3-Methylbutanoic acid	(70) Petroleum
(35) Furan	(71) Paraffin oil
(36) Diethyl ether	

ویژگی مهم دیگری که حلال ها بر اساس آن طبقه بندی می شوند، شویندگی(Elution) است. چون نمونه و حلال برای اتصال به سایت های فعال فاز ساکن باهم رقابت می کنند، بنابراین اگر می خواهیم مولکول های نمونه را به سایت های فعال فاز ساکن جذب شده اند از ستون بشوییم و خارج کنیم، باید از حلالی استفاده کنیم که افینیتی آن نسبت به جاذب بیشتر از نمونه باشد. بنابرین در سیستم های کروماتوگرافی، فاز نرمال که فاز ساکن قطبی است، هرچه قطبیت حلال بیشتر باشد، راحت تر می تواند مولکول نمونه یا آنالیت را از فاز ثابت جدا کند و خودش جایگزین آن شود.

Solvents	ε° $(Al_2O_3)^{f)}$	Solvents	ε° $(Al_2O_3)^{f)}$
(1) Fluoroalkanes (1,1,2-Trichloro-1,2,2-trifluoroethane)	−0.25	(20) 2-Butanone	0.51
		(21) Triethylamine	0.54
(2) *n*-Pentane	*0.00*	(22) Acetone	0.56
(3) *n*-Hexane	0.01	(23) 1,4-Dioxane	0.56
(4) 2,2,4-Trimethylpentane	0.01	(24) Tetrahydrofuran	0.57
(5) Cyclohexane	0.04	(25) Ethyl acetate	0.58
(6) Cyclopentane	0.05	(26) Diethylamine	0.63
(7) Carbon disulfide	0.15	(27) Nitromethane	0.64
(8) Tetrachloromethane	0.18	(28) Acetonitrile	0.65
(9) 1,1,1-Trichloroethane	0.19	(29) Pyridine	0.71
(10) *t*-Butyl methyl ether	0.20	(30) Dimethyl sulfoxide	0.75
(11) Xylene	0.26	(31) 1- and 2-Propanol	0.82
(12) Di-*i*-propyl ether	0.28	(32) Ethanol	0.88
(13) Toluene	0.29	(33) Methanol	0.95
(14) Chlorobenzene	0.30	(34) 1,2-Ethanediol	1.11
(15) Benzene	0.32	(35) Acetic acid	High (≫1)
(16) Diethyl ether	0.38	(36) Water	Higher
(17) Trichloromethane	0.40	(37) Aqueous salt solutions, buffers	Highest
(18) Dichloromethane	0.42		
(19) 1,2-Dichloroethane	0.44		

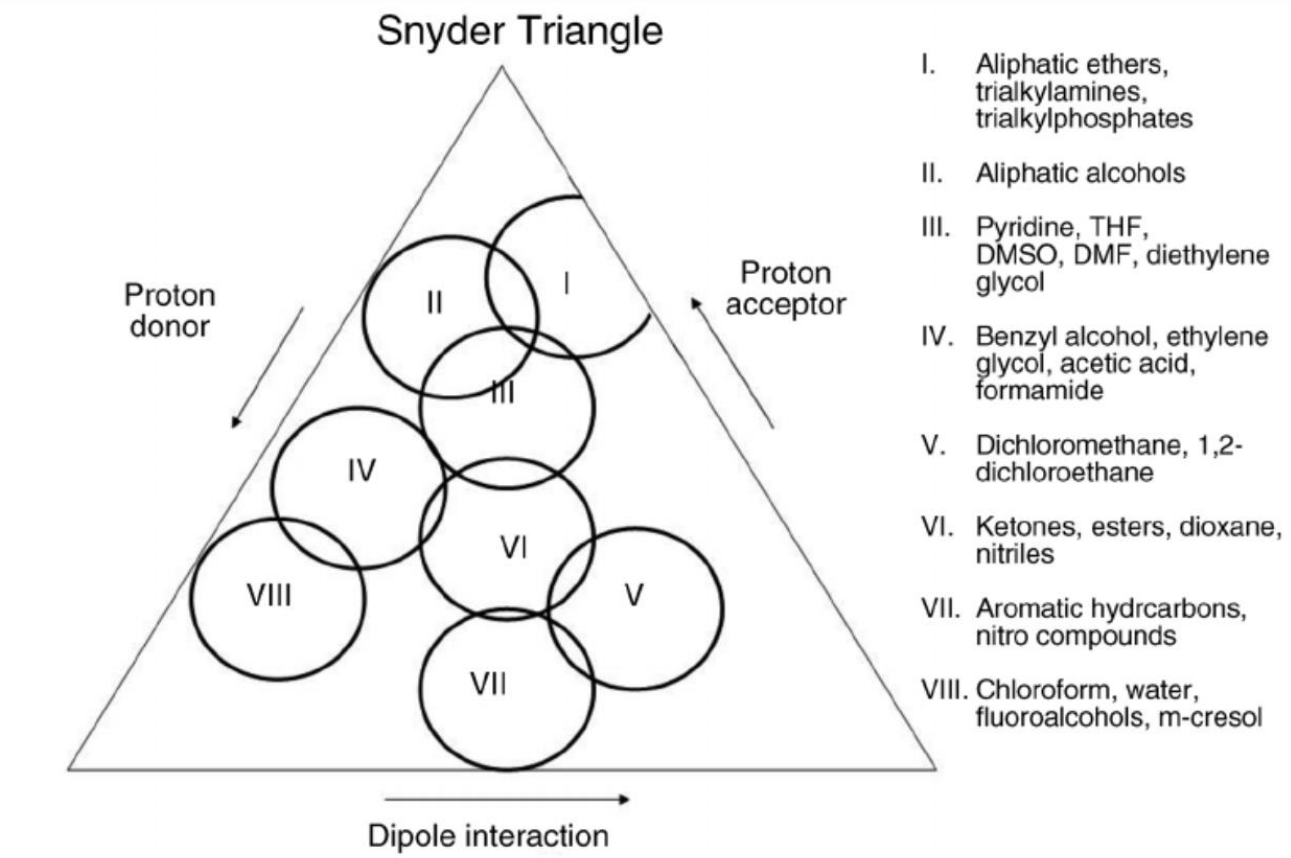
بنابراین در سیستم های کروماتوگرافی فاز نرمال، شویندگی با قطبیت نسبت مستقیم دارد. بنابراین در کروماتوگرافی فاز نرمال، کربوکسیلیک اسیدها و بعد الکل ها، بیشترین قدرت شویندگی را دارند مثل استیک اسید و متانول ولی هیدروکربن های اشباع مثل n-Hexane کمترین قدرت شویندگی را دارند. اما در سیستم کروناتوگرافی فاز معکوس، یعنی جاذب از نوع غیر قطبی باشد مثل شارکول، شویندگی با قطبیت رابطه عکس خواهد داشت.

برای رده بندی حلال ها از نظر قدرت شویندگی بصورت تجربی، زمان بازدارندگی (Retention time) با یک جاذب و نمونه ثابت برای حلال های مختلف اندازه گیری می کنند. هر چه این زمان بازدارندگی کمتر باشد، یعنی شویندگی این حلال بیشتر است و بر این اساس حلال ها را بر اساس قدرت شویندگی شان رده بندی می کنند و سری های ایلوتروپیک بدست می آید.

جدول بالا، سری ایلوتروپیک برای کروماتوگرافی فاز نرمال می باشد که حلال ها به ترتیب افزایش قدرت شویندگی، تقسیم بندی شده اند که می توانیم بر عکس این سری را برای کروماتوگرافی فاز معکوس در نظر بگیریم.

ویژگی سوم در انتخاب حلال مناسب، Selectivity است بر گرفته از رده بندی حلال ها براساس روش اشنایدر (Snyder) است. در این روش، حلال ها بر اساس سه ویژگی پروتون دهندگی، پروتون گیرندگی و ممان دیپل به ۸ گروه تقسیم می شوند. در این روش، دو حلال که از نظر قطبیت بهم نزدیکند به شرطی در یک گروه قرار می گیرند که بقیه پارامترها یعنی پروتون دهندگی، پروتون گیرندگی و ممان دیپل بهم نزدیک باشد. هیدروکربن های آلیفاتیک در گروه ۱ و آب در گروه ۸ قرار دارد. همچنین نتایج این طبقه بندی بصورت ساده در مثلث Selectivity حلال ها آورده شده است که هر یک از اضلاع، یکی از یا سه پارامتر را نشان می دهد. کاربرد روش سلکتیویتی این است که برای مثال اگر یک حلال، سلکتیویتی مناسب برای یک روش جداسازی فراهم

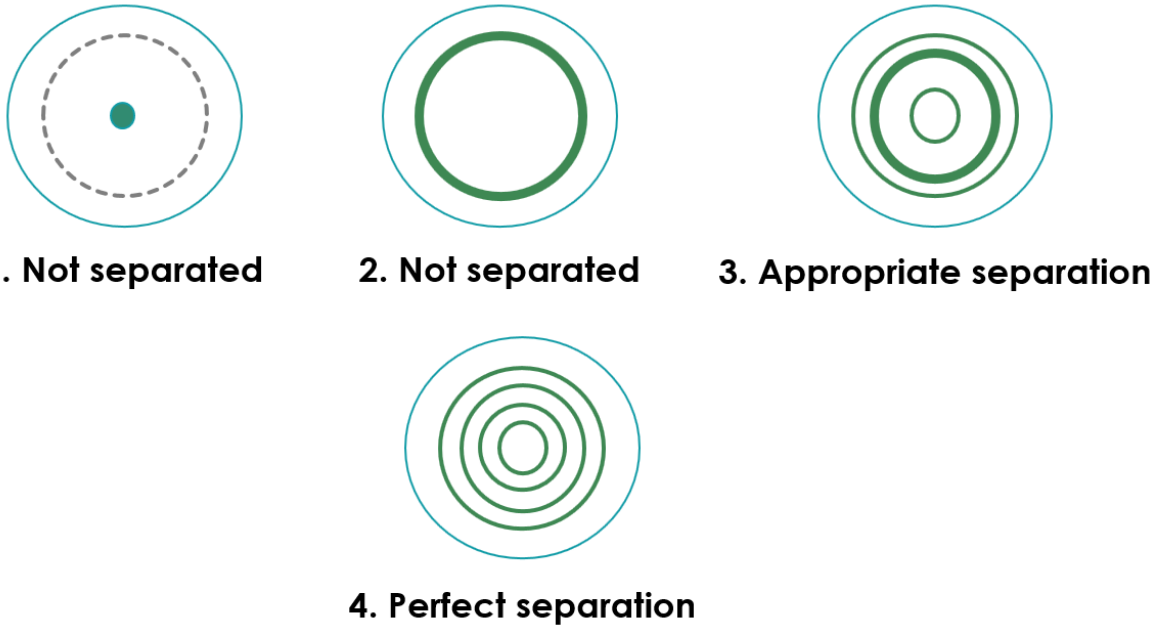
نمی کند، احتمالاً حلالی از همین دسته هم نمی تواند به جداسازی کمک کند یا برای مثال اگر میخواهیم فاز متحرک با مخلوطی از چندین حلال تهیه کنیم، حدالامکان و به شرط اختلاط پذیری، از گروه هایی که بیشترین فاصله را از هم دارند استفاده می کنیم تا سیستم حلال مان از نظر selectivity، طیف وسیعی مواد را پوشش دهد.



- **کار عملی این جلسه:**

نمونه مخلوطی از ۴ ماده کومارین، آنیزالدهید، دانترون و کافئین است. این مواد ماهیت نیمه قطبی تا قطبی دارند. می خواهیم سیستم حلال مناسب را از ۱۰ حلالی که موجود داریم انتخاب بکنیم. توجه کنید حلال هایی که بصورت اولیه تست می کنیم از گروه های مختلف اشنایدر باشد تا مسئله سلکتیویتی هم در نظر گرفته شده باشد. اولین کاری که انجام می دهیم این است که با استفاده از لوله مویین مقداری از نمونه را برداشته و بر روی کاغذ TLC لکه گذاری می کنیم. بعد یکی از این ۱۰ حلال موجود را انتخاب کنیم و روی کاغذ TLC لکه ای را که گذاشته با این حلال پیشروی می دهیم. (پیشروی بصورت دایره ای است). پس حلال را با لوله مویین پر می کنیم و لوله مویین را بر لکه نمونه مماس می کنیم تا اینکه دایره های متحد المرکز شکل بگیرید. بعد از خشک کردن حلال، نتیجه را زیر لامپ UV بررسی می کنیم تا ببینیم جداسازی مطلوب بوده یا نه.

معیار جداسازی مطلوب در تمام روش های کروماتوگرافی، قدرت تفکیک بالاست که به معنای فاصله مناسب بین پیک یا دو لکه است. همچینین در جداسازی مناسب، پهنای پیک یا لکه باید کم باشد که خود این مسئله به تفکیک بهترلکه ها از هم کمک می کند.



در شکل فوق، چهار نتیجه متحمل از پیشروی دادن لکه بصورت دایره ای را مشاهده می کنید.

شکل ۱: حلال قدرت شویندگی مناسبی نداشته است و مواد هیچ حرکتی نکرده و در همان محل لکه گذاری باقی مانده است. مثال اگر از حلال n-Hexane استفاده می کردیم چنین نتیجه ای بدست می آمد.

شکل ۲: حلال قدرت شویندگی خیلی بالایی دارد؛ بطوری که حلال تمام ماده را شسته و به جبهه حلال برده است که این حالت هم مطلوب نیست و جداسازی انجام نشده است.

شکل ۳: حلال جداسازی نسبتا مطلوبی را انجام داده است و ۳ لکه بدست آمده است. چون ما ۴ ماده داشتیم، پس دو ماده در یکی از لکه ها کنار هم هستند. چون لکه دومی ضخیم تر است می توانیم احتمالاً دهیم که ۲ تا از ماده ها در این لکه قرار گرفته اند که اگر ما کمی روی سیستم حلال کار بکنیم، میتوانیم این دو تا ماده را هم از هم جدا کنیم.

شکل ۴: یک جداسازی عالی را نشان می دهد که هر ۴ ماده با فاصله مناسب از هم جدا شده اند که این یک سیستم حلال ایده آل است.

حالا فرض کنید از بین ۱۰ حلالی که داشتیم، چند مورد از آنها را به صورت پیشروی دایره ای تست کردیم و بهترین نتیجه ای که بدست آوردیم مشابه شکل ۳ بود. حالا که این حلال پایه را انتخاب کردیم، نتوانسته تمام اجزا مخلوط را از هم جدا کند، بهتر است یک حلال دیگری را به حلال قبلی اضافه کنیم. حلال دوم باید بتواند شویندگی را اصلاح کند (کم یا زیاد کنیم) و همچنین قابل اختلاط با حلال اول باشد. این مسئله را در نظر بگیرید که ترکیبی از دو یا سه حلال بهتر از یک حلال خالص می تواند جداسازی را انجام دهد. علاوه بر بهینه سازی مسئله شویندگی، متفاوت بودن selectivity حلال های مختلف از اصلی ترین علل ارجحیت سیستم های

چند حلاله نسبت به تک حلاله است که امکان جداسازی ترکیبات متنوع را فراهم می کند. حال برای انتخاب حلال دوم برای اضافه کردن به حلال پایه، در جدول میسکوتروپیک، ۷-۸ حلال بالاترین یا پایین ترنسبت به حلال پایه را در نظر می گیریم.

حال فرض کنید مطلوب این است که شویندگی را افزایش دهیم، از بین این حلال هایی که با حلال پایه، اختلاط پذیرند، در سری ایلوتروپیک دنبال حلالی می گردیم که شویندگی آن نسبت به حلال پایه بیشتر است. آن حلال را به عنوان حلال دوم انتخاب می کنیم و به سیستم حلال اضافه می کنیم. زمانی که حلال دوم را به حلال اول اضافه می کنیم باید از مقادیر کمتر شروع کنیم یعنی ابتدا با نسبت ۱ به ۹ شروع می کنیم. (۱ قسمت از حلال دوم و ۹ قسمت از حلال پایه) بعد نسبت ۲ به ۸.

این مسئله را هم در نظر بگیرید که این طور نیست که هر چقدر مقدار حلال دوم بیشتر باشد، شویندگی هم به همان نسبت افرایش یابد. علتش این است که تعداد سایت های فعال سیلیکاژل محدود است و زمانی که بیشتر گروه های هیدروکسیل در سیلیکاژل توسط حلال اشغال شود، دیگر شویندگی با شیب اولیه افزایش پیدا نمی کند؛ چون حلال با گروه های هیدروکسیل کمتری مواجه می شود که مشابه اثر دارو روی گیرنده هاست. بنابراین بعد از مدتی به حالت پلاتو (کفه ای) خواهیم رسید.

بعد از انتخاب حلال دوم، دو حلال را در لوله آزمایش در حجم کم مثلا ۲ سی سی با نسبت ۱ به ۹ مخلوط می کنیم. بعد یک لکه تازه از نمونه را روی کاغذ TLC قرا می دهیم. بعد مخلوط حلال را که یک حالت تک فازه دارد در لوله مویین می کشیم و روی نمونه یک پیشروی دایره ای انجام می دهیم و نتیجه را زیر لامپ UV بررسی می کنیم. اگر جداسازی مطلوب بود (۴ حلقه جدا شود) که هیچ. اگر نه با توجه به نتیجه ای بدست آمده تصمیم می گیریم که بریم به نسبت ۲ به ۸ و یا کلا حلال دوم را عوض می کنیم و تا زمانی که این ۴ حلقه را بدست نیاورده ایم بصورت آزمون و خطا حلال های مختلف را امتحان می کنیم.

نهایتاً وقتی سیستم حلال مناسب را پیدا کردیم پیشروی نهایی را روی کاغذ TLC انجام می دهیم. برای این کار از کاغذ TLC و شیشه مربا (بعنوان TLC chamber) استفاده می کنیم. سیستم حلال را در حجم نهایی ۱۰ سی سی تهیه می کنیم و داخل شیشه قرار می دهیم. بعد در ظرف را می بندیم و به مدت ده دقیقه صبر می کنیم تا فضای تانک اشباع از حلال شود.

در این فاصله یک کاغذ TLC به شکل مستطیل برش می دهیم و با فاصله 1cm از پایین کاغذ، لکه گذاری را با نمونه انجام می دهیم. علت فاصله 1cm نمونه از پایین کاغذ، این است که نمی خواهیم لکه مستقیماً داخل حلال قرار گیرد. بلکه کی خواهیم حلال پیشروی کند و بیاد از روی لکه عبور کند. همچنی لکه به کناره های کاغذ نزدیک نباشد.

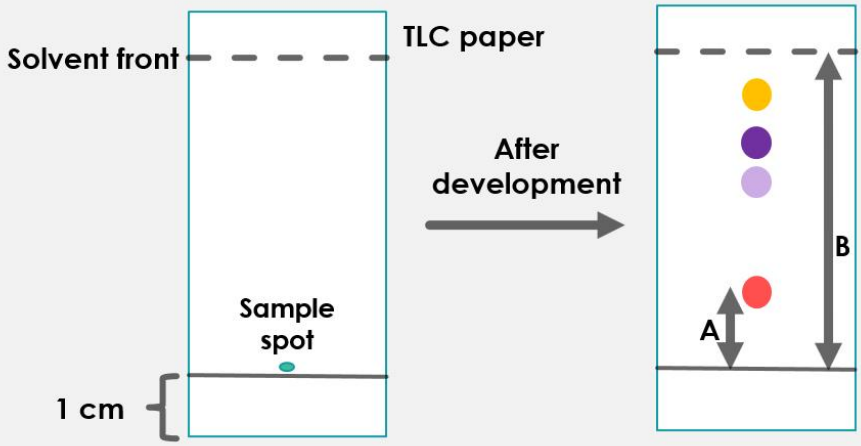
بعد از لکه گذاری و اشباع شدن تانک، در تانک را باز کرده و کاغذ را داخل آن قرار می دهیم و دوباره در تانک را می بندیم و صبر می کنیم تا پیشروی انجام شود. تا زمانی که حلال به 1cm انتهای کاغذ برسد، پیشروی باید ادامه پیدا کند. بعد کاغذ را از تانک خارج کرده و حلالش را خشک می کنیم و زیر UV نتیجه را بررسی می کنیم.

همانطور که در شکل نشان داده شده است، نتیجه مطلوب این است که ۴ لکه مربوط به ۴ ماده موجود در نمونه را بصورت کامل از هم تفکیک کرده باشیم.

نهایتاً باید R_f لکه ها را اندازه بگیریم. برای این کار ابتدا جبهه حلال را با مداد علامت می گذاریم و مرکز لکه را هم با مداد یک نقطه علامت می گذاریم. بعد نسبت پیشروی لکه به پیشروی حلال را بدست می آوریم که بدین صورت R_f لکه ها بدست می آید.

- ✓ Multisolvent systems
- ✓ Final TLC development

TLC chamber



$$RF = \frac{A}{B}$$