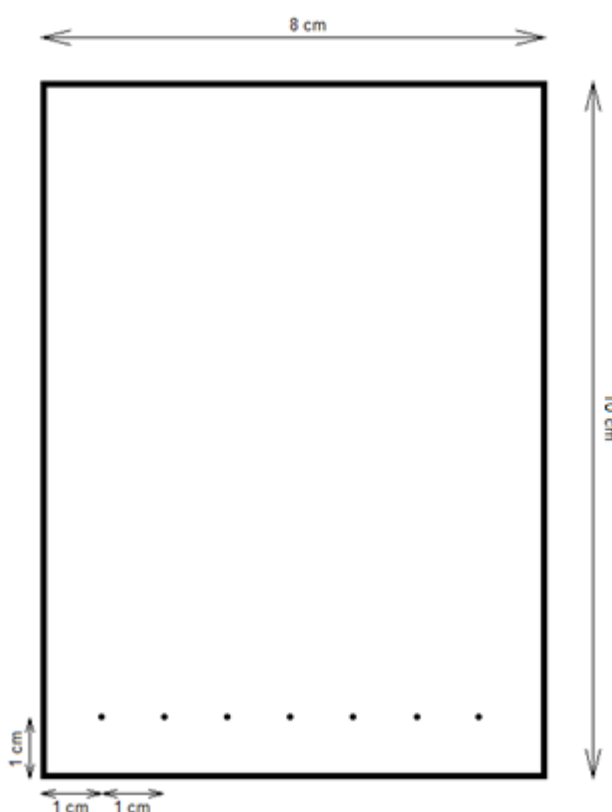


Ćwiczenie 4 – Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) niesteroidowych leków przeciwzapalnych

Zakres materiału: chromatografia – zastosowanie, mechanizmy działania, podział, podstawowe pojęcia; chromatografia cienkowarstwowa; niesteroidowe leki przeciwzapalne – przykłady, struktury chemiczne, mechanizm działania

Wykonanie ćwiczenia

1. Przygotuj płytkę chromatograficzną (folia aluminiowa pokryta żelom krzemionkowym 60 ze znacznikiem fluorescencyjnym) o rozmiarach 8 x 10 cm. Około 1 cm od dolnej krawędzi płytki zaznacz miękkim ołówkiem 7 punktów startowych (zachowaj odstęp 1 cm między punktami oraz między punktami skrajnymi a krawędzią płytki).



2. Przygotuj komorę chromatograficzną – zlewkę o pojemności 500 cm³ przykrytą szalką Petriego. Na dno zlewki wlej eluent – mieszaninę octanu etylu i chloroformu w stosunku objętościowym 1:1. Warstwa cieczy powinna mieć wysokość 5-8 mm (po wstawieniu płytki punkty startowe muszą się znajdować **powyżej** poziomu cieczy). Przykryj zlewkę szalką i zostaw na 15-20 min. celem wysycenia atmosfery parami rozpuszczalnika.

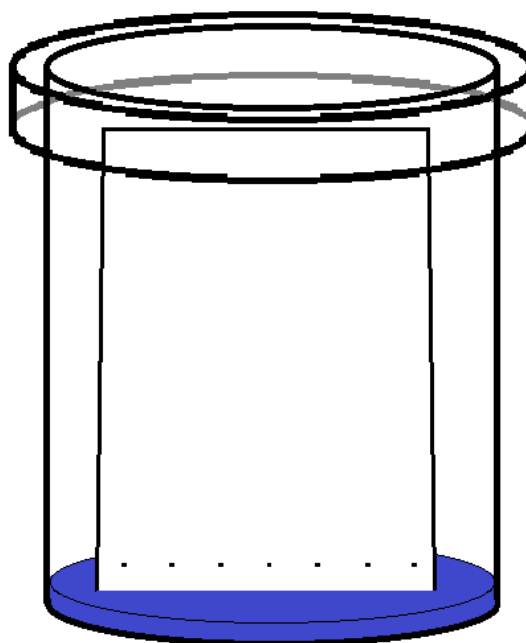
3. Tabletkę nieznanego preparatu leczniczego utrzyj dokładnie w moździerzu porcelanowym i przesyp do małej zlewki (25 cm³). W wypadku leków w kapsułkach wysyp zawartość kapsułki do naczynia. Do proszku dodaj 5 cm³ octanu etylu, zawieszinę mieszaj kilka minut a następnie przesącz przez mały sączek z bibuły do szklanej fiolki.

4. Na punkty startowe nanieś przy pomocy szklanych kapilar lub plastikowych końcówek do pipet (tzw. tipsów) krople roztworów wzorcowych (kwas acetylosalicylowy, ibuprofen, naproksen, ketoprofen, paracetamol, kofeina w octanie etylu) oraz ekstrakt badanego leku (każdy roztwór na osobny punkt). Plamka naniesionego roztworu powinna mieć średnicę 3-4 mm. **UWAGA 1:**

Naniesienie odpowiedniej kropli jest trudne – łatwo uzyskać plamkę o zbyt dużej średnicy. Aby osiągnąć sukces: i) pobierając roztwór do kapilary/tipsa zanurz tylko jej końcówkę w cieczy, nie zatykaj otwartego końca, pozwól swobodnie wypłynąć nadmiarowi roztworu (w kapilarze zostanie mała kropla, utrzymywana siłami włoskowatości); ii) usuń część cieczy dotykając końcem kapilary/tipsa suchego sączka z bibuły, słup cieczy w kapilarze powinien mieć wysokość 2-3 mm; iii) kontakt między kapilarą a płytką powinien trwać ułamek sekundy; iv) poćwicz nanoszenie cieczy na kawałku starej płytki do TLC (do otrzymania od laboranta lub prowadzącego). **UWAGA 2:** Uważaj, aby nie zanieczyścić roztworów wzorcowych i próbki – do nanoszenia używaj osobnych kapilar/tipsów, po zakończeniu ćwiczenia raz użyte kapilary/tipsy wyrzuć.

5. Sprawdź w świetle UV (254 nm), czy wszystkie plamki naniesione na płytkę są widoczne (w razie konieczności nanieś roztwór raz jeszcze na konkretny punkt startowy – plamka na płytce powinna być wysuszona przed ponownym naniesieniem roztworu).

6. Wstaw płytkę lekko skośnie do komory chromatograficznej. Jej górna krawędź powinna opierać się o ścianki komory. Punkty startowe muszą znajdować się powyżej poziomu cieczy. Zakryj komorę szalką Petriego i pozwól cieczy dzięki siłom włoskowatości „wędrować” w górę płytki. Wstawianie płytki do komory należy przeprowadzić delikatnie – ciecz nie może chlapnąć na płytkę, a krawędź rozpuszczalnika musi poruszać się poziomo na całej szerokości płytki.



7. Po osiągnięciu przez krawędź rozpuszczalnika poziomu 5-10 mm poniżej górnej krawędzi płytki wyjmij ją z komory, zaznacz wysokość którą osiągnęło czoło rozpuszczalnika miękkim ołówkiem i wysusz na powietrzu i obejrzyj w świetle UV (254 nm). Zaznacz miękkim ołówkiem położenie plam na chromatogramie.

Eluent z komory wylej do pojemnika na ciekłe odpady chemiczne.

Wykorzystane płytki do TLC, kapilary, końcówki do pipet, fiolki, sączki wyrzuć do odpowiednich pojemników na odpady segregowane i zmieszane.

Opracowanie wyników

- oblicz współczynniki R_f substancji wzorcowych i nieznanego składnika (w wypadku plam kolistych lub szerokoeliptycznych wartość liczy się od środka plamy, w wypadku plam rozciągniętych liczy się środek „głowy” plamy – patrz rysunek poniżej). Pomiary wykonaj linijką;
- jaki/jakie składniki występują w analizowanym leku (w próbce może być do trzech składników)?
- biorąc pod uwagę zidentyfikowane składniki odszukaj, jakie preparaty medyczne (nazwy handlowe) mogły być analizowane;
- stężenia molowe wszystkich wzorców były jednakowe (około 1 mM). Wyjaśnij, dlaczego intensywność plam w świetle UV jest różna;
- czy jakichś substancji (spośród badanych) nie można rozróżnić stosując opisaną metodę chromatograficzną? Dlaczego?

