

# Ekstrakcja, krystalizacja, chromatografia preparatywna

## Synteza i Technologia Środków Leczniczych

Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny WUM

mgr Anna Maksymiuk

# Ekstrakcja

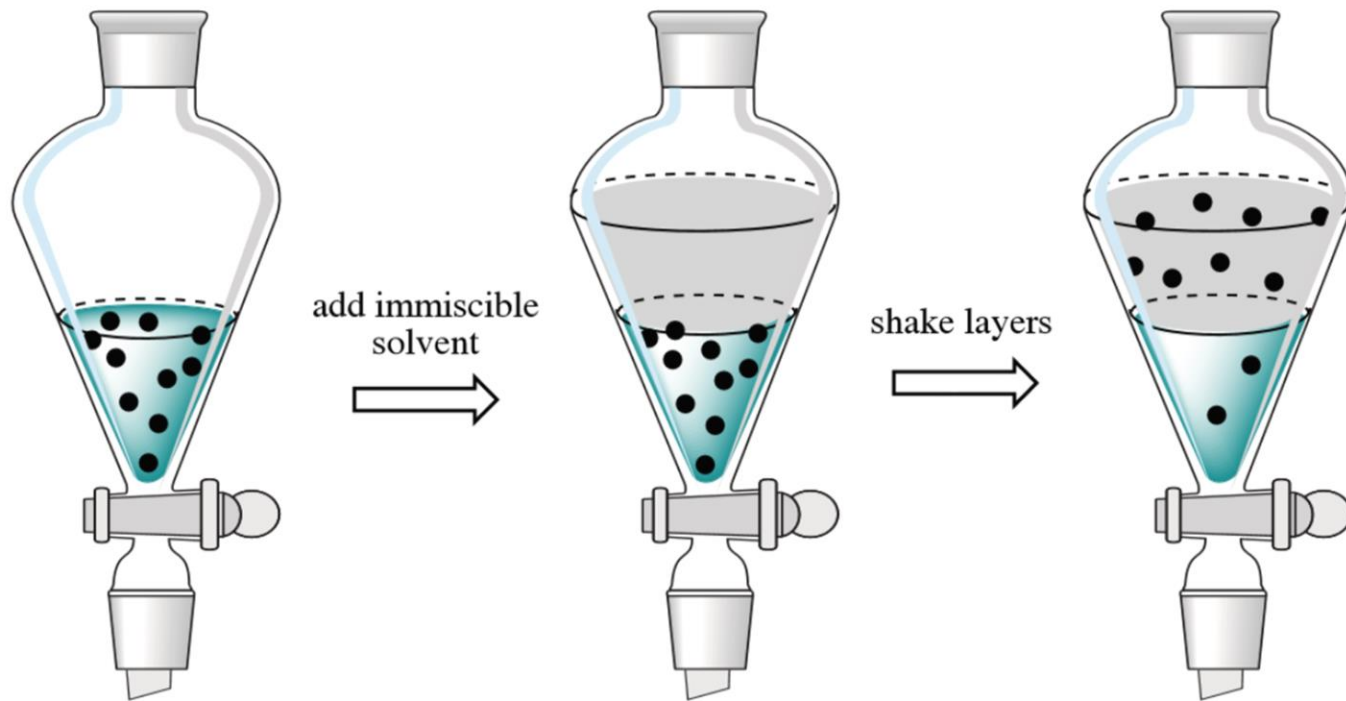
- chemiczna metoda wyodrębniania określonych składników z mieszanin ciekłych lub stałych za pomocą odpowiednio dobranych, selektywnych rozpuszczalników (o różnej zdolności rozpuszczania poszczególnych składników lub określonych ich grup).

(<https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/ekstrakcja;3897126.html>, pobrano: 27.09.2020)



<https://pixabay.com/pl/photos/rozdzielacza-wyci%C4%85g-ekstrakcji-164/>

# Ekstrakcja



**Surowiec** - mieszanina z której ekstrahujemy związek

**Ekstrakt** - substancja ekstrahowana

**Rafinat** - rozpuszczalnik z którego ekstrahujemy związek, pozostały po procesie ekstrakcji

**Ekstrahent** - rozpuszczalnik, którym ekstrahujemy



# Ekstrakcja

- Proces spowodowany różnicą stężeń związku w dwóch fazach (zjawisko dyfuzji)
- Połączenie surówki i ekstrahentu → wytrząsanie (dyfuzja) → ustalenie stanu równowagi (czas) → rozdzielenie ekstraktu i rafinatu → wyodrębnienie związku (odparowanie rozpuszczalnika/suszenie)
- Obowiązuje prawo podziału Nernsta i prawo Ficka

# Prawo podziału Nernsta

- Współczynnik podziału ( $k$ ) w warunkach stałej temperatury i ciśnienia:

$$k = \frac{C_A}{C_B}$$

$C_A$  - stężenie substancji w warstwie A

$C_B$  - stężenie substancji w warstwie B

- Kilkukrotna ekstrakcja mniejszą ilością rozpuszczalnika jest wydajniejsza niż jednorazowa ekstrakcja większą ilością rozpuszczalnika.

# Prawo podziału Nernsta

## ► Po I ekstrakcji:

$$k = \frac{C_1}{C_{1'}}$$

$$n = n_1 + n_{1'} \quad C_0 V_0 = C_1 V_1 + C_{1'} V_{1'} \quad V_1 = V_0$$

$$C_1 = C_0 \frac{V_0 k}{V_0 k + V_{1'}}$$

## ► Po II ekstrakcji:

$$k = \frac{C_2}{C_{2'}}$$

$$n' = n_2 + n_{2'} \quad C' V' = C_2 V_2 + C_{2'} V_{2'} \quad C' = C_1 \quad V' = V_0 = V_2 \quad V_{2'} = V_{1'}$$

$$C_2 = C_1 \frac{V_0 k}{V_0 k + V_{1'}}$$

$$C_n = C_0 \left( \frac{V_0 k}{V_0 k + V_{1'}} \right)^n$$

k-stała podziału

$C_0$ - stężenie substancji początkowe

$C_1$ - stężenie substancji w warstwie 1 po pierwszej ekstrakcji

$C_{1'}$ - stężenie substancji w warstwie 2 po pierwszej ekstrakcji

$C_2$ - stężenie substancji w warstwie 1 po drugiej ekstrakcji

$C_{2'}$ - stężenie substancji w warstwie 2 po drugiej ekstrakcji

$n_0$ - liczba moli początkowa

$n_1$ - liczba moli w fazie 1 po pierwszej ekstrakcji

$n_{1'}$ - liczba moli w fazie 2 po pierwszej ekstrakcji

$n_2$ - liczba moli w fazie 1 po drugiej ekstrakcji

$n_{2'}$ - liczba moli w fazie 2 po drugiej ekstrakcji

$V_0$ - objętość początkowa roztworu

$V_1$ - objętość roztworu ekstrahowanego w ekstrakcji 1

$V_{1'}$ - objętość ekstrahenta w ekstrakcji 1

$V_2$ - objętość roztworu ekstrahowanego w ekstrakcji 2

$V_{2'}$ - objętość ekstrahenta w ekstrakcji 2

# Prawo dyfuzji Ficka

- Ilość składnika dyfundującego:

$$n_A = kFt (c_2 - c_1)$$

$k$  – stała charakterystyczna dla danego związku i rozpuszczalników


$n_A$  – gęstość strumienia masy składnika dyfundującego

$F$  - powierzchnia przez którą dyfunduje związek

$t$  – czas

$(c_2 - c_1)$  - różnica stężeń składnika w warstwach 1 i 2

- Ekstrakcja jest zależna od powierzchni styku mieszanin (rozdrobienie, mieszanie), czasu (ustalenie stanu równowagi), różnicy stężeń substancji pomiędzy roztworami (krotność ekstrakcji, ilość rozpuszczalnika, proces przeciwnyprądowy), rodzaju rozpuszczalnika, rodzaju substancji ekstrahowanej, temperatury (lepkość rozpuszczalnika, zmiana rozpuszczalności związków)



# Cechy rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji

Ważny jest odpowiedni dobór ekstrahentu względem ekstraktu/ surowca:

- brak mieszalności z rozpuszczalnikiem pierwotnym
- obojętny chemicznie względem ekstraktu/rozpuszczalnika pierwotnego
- selektywny
- wydajny
- łatwy do usunięcia (niska temperatura wrzenia)
- tani (przemysł)
- bezpieczny (niepalny, nietoksyczny, łatwy w regeneracji)





# Istotne:

- Dodatek soli nieorganicznych (solanka – nasycony roztwór chlorku sodu/ siarczanu amonu) zmniejsza rozpuszczalność zw. organicznych w warstwie wodnej przez zwiększenie stałej dielektrycznej roztworu i zmianę współczynnika podziału. Pozwala na wstępne osuszenie warstwy organicznej poprzez zmniejszenie mieszalności warstw.
- Suszenie związków po ekstrakcji (środki suszące np. bezwodny siarczan sodu lub magnezu)

# Ekstrakcja - rodzaje

Wybór metody ekstrakcji – zależny od surowca, stałej podziału:

## W zależności od formy surowca:

- ciecz - ciecz
- ciało stałe – ciecz

## W zależności od metody:

- ekstrakcja ciągła
- ekstrakcja periodyczna

**Ługowanie** – periodyczna ekstrakcja z roztworu

**Perforacja** – ciągła ekstrakcja z roztworu

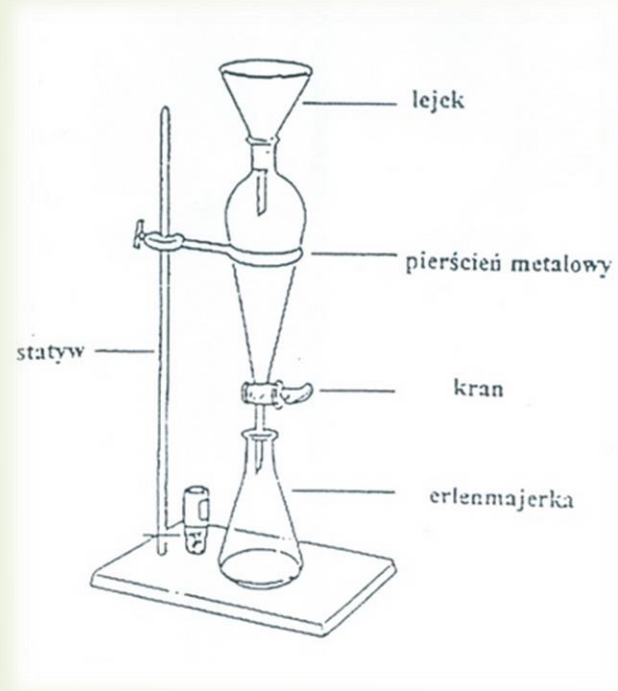
**Maceracja** – periodyczna ekstrakcja z mieszaniny substancji stałych

**Digestia** – maceracja na gorąco

**Perkolacja** – ekstrakcja ciągła z mieszaniny substancji stałych

Ekstrakcja ciągła z mieszaniny substancji stałych na gorąco z zastosowaniem ekstraktorów np. ekstraktora Soxhleta.

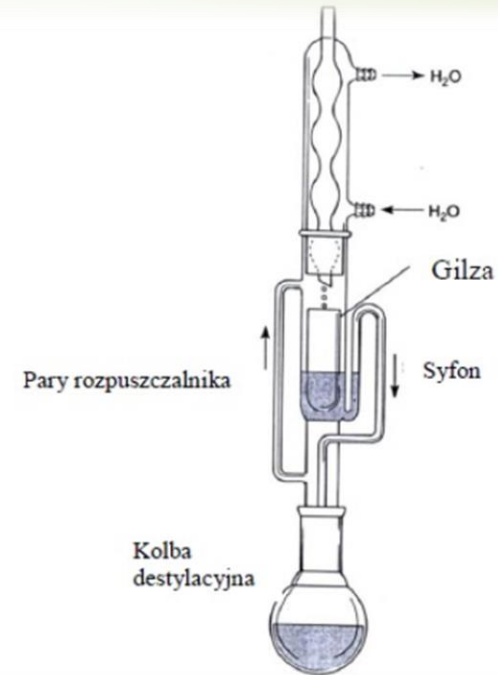
# Ekstrakcja w laboratorium



## Ekstrakcja prosta ciec-z-ciecz

<https://absta.pl/materiay-pomocnicze-z-laboratorium-chemii-organicznej.html?page=2>

©absta.pl 2019, pobrano 27.09.2020

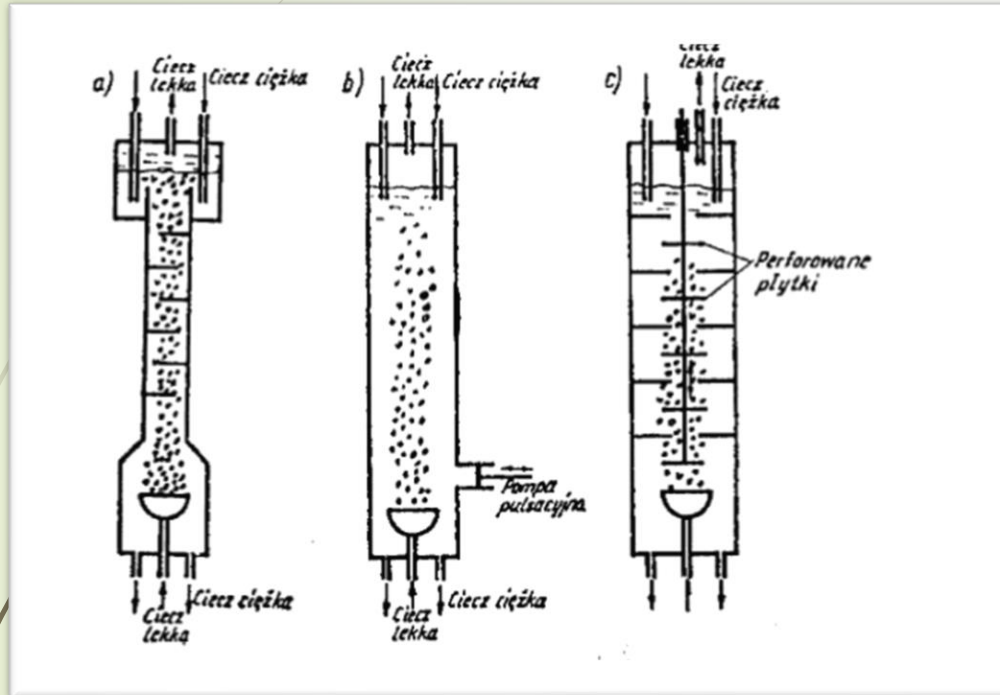


## Ekstrakcja ciągła z ciał stałych w aparacie Soxleta

<http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/ekstrakcja>

Autor: Adam Kuzdraliński, pobrano: 27.09.2020

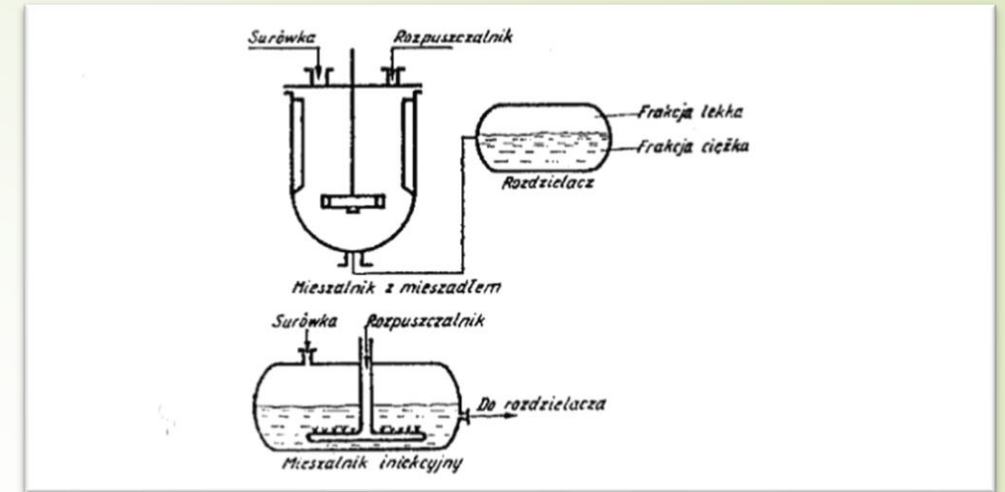
# Przemysł



**Ekstrakcja ciecz – ciecz w ekstraktorach kolumnowych:**

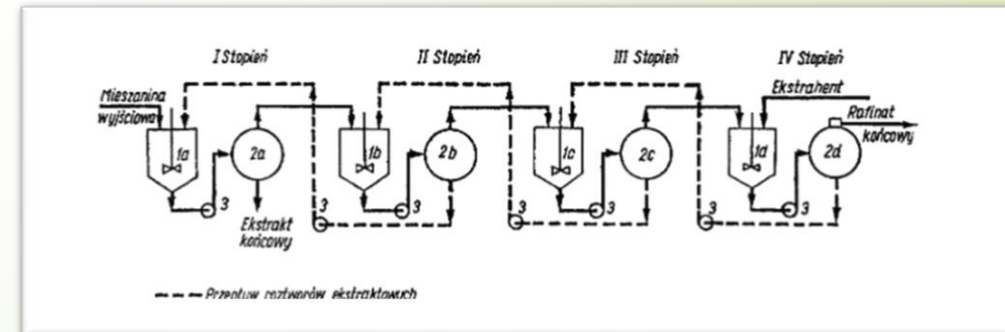
- a) Kolumna półkowa
- b) Kolumna pulsacyjna
- c) Kolumna z oscylującymi płytkami w układzie

Selecki A., Gradoń L., „Podstawowe procesy przemysłu chemicznego.”, WNT, Warszawa, 1985



**Ekstrakcja ciecz- ciecz w układach ekstrakcji okresowej**

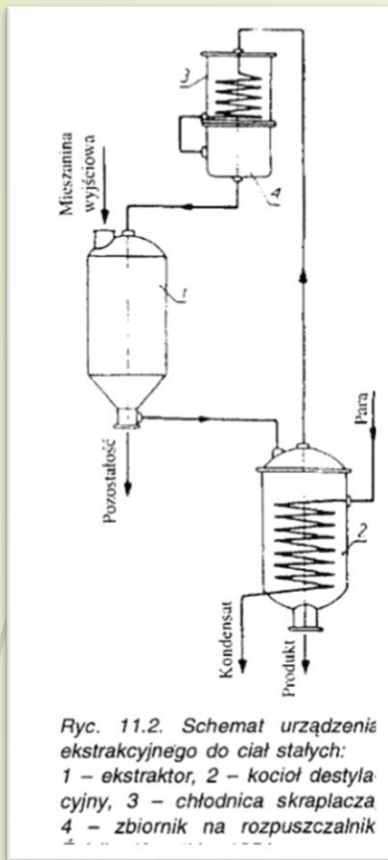
Selecki A., Gradoń L., „Podstawowe procesy przemysłu chemicznego.”, WNT, Warszawa, 1985



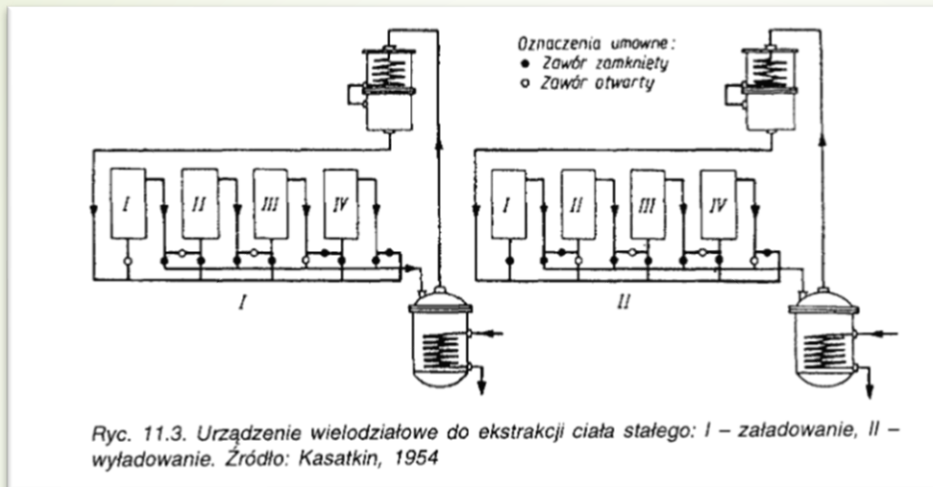
**Ekstrakcja wielostopniowa w układzie kilkuzbiornikowym.**

Molenda J., Technologia Chemiczna, WSiP Warszawa 1988

# Przemysł



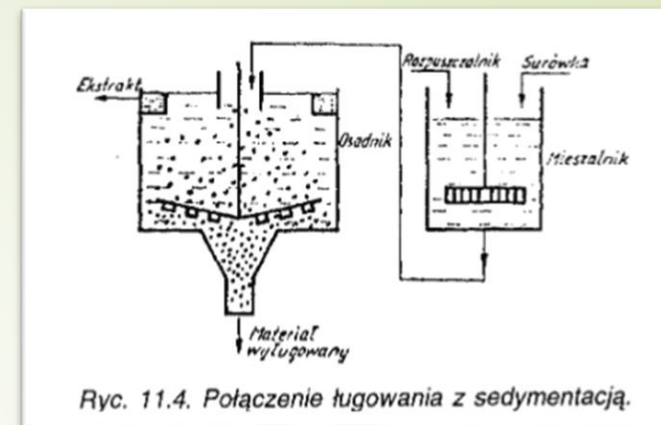
**Jednodziałowe urządzenie ekstrakcyjne (ciał stałych)**  
 Kasatkin A.G., Podstawowe procesy aparaty w technologii chemicznej, PWT, Warszawa 1954



**Wielodziałowe urządzenie ekstrakcyjne (ciał stałych)**  
 Kasatkin A.G., Podstawowe procesy aparaty w technologii chemicznej, PWT, Warszawa 1954

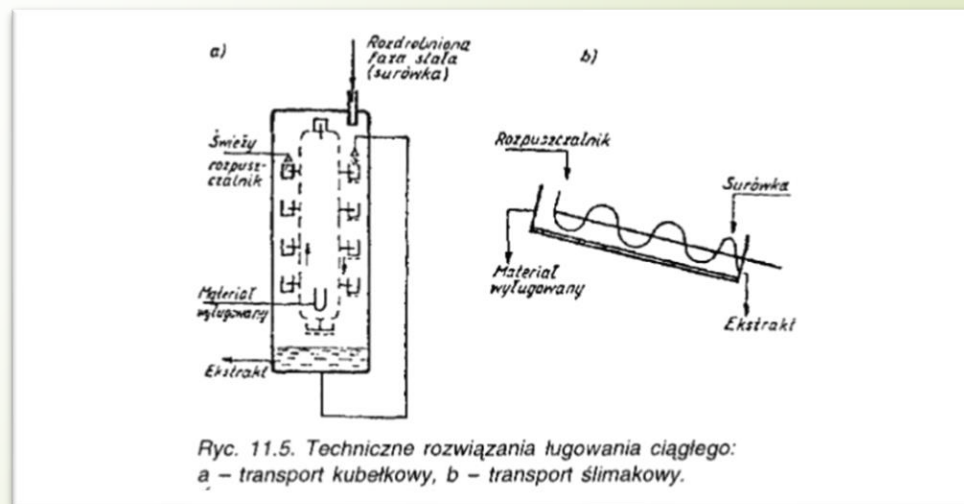
## Ługowanie w systemie ciągłym

Selecki A., Gradoń L., „Podstawowe procesy przemysłu chemicznego.”, WNT, Warszawa, 1985



## Ługowanie

Selecki A., Gradoń L., „Podstawowe procesy przemysłu chemicznego.”, WNT, Warszawa, 1985



# Krystalizacja

- Proces powstawania kryształów danej substancji z przesyconego roztworu [...]

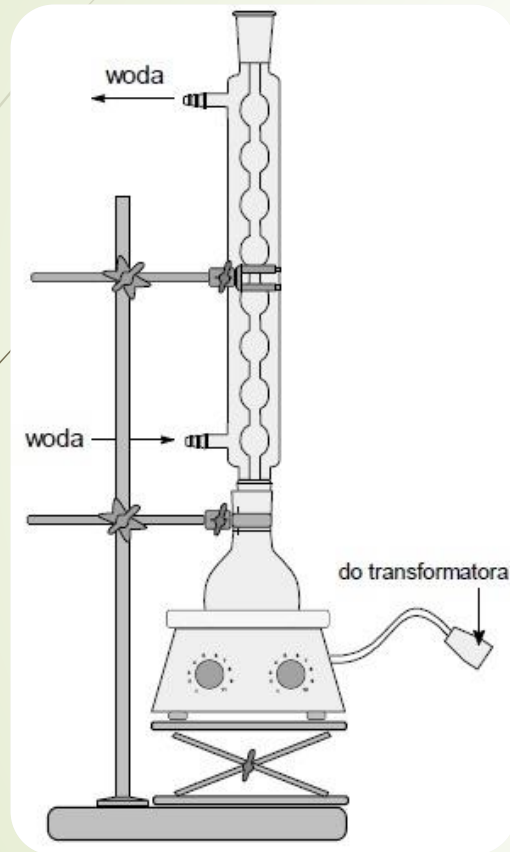
(<https://sjp.pwn.pl/sjp/krystalizacja;2565042.html>, pobrano 27.09.2020)

- Metoda oczyszczania związków chemicznych lub wydzielania ich z roztworu

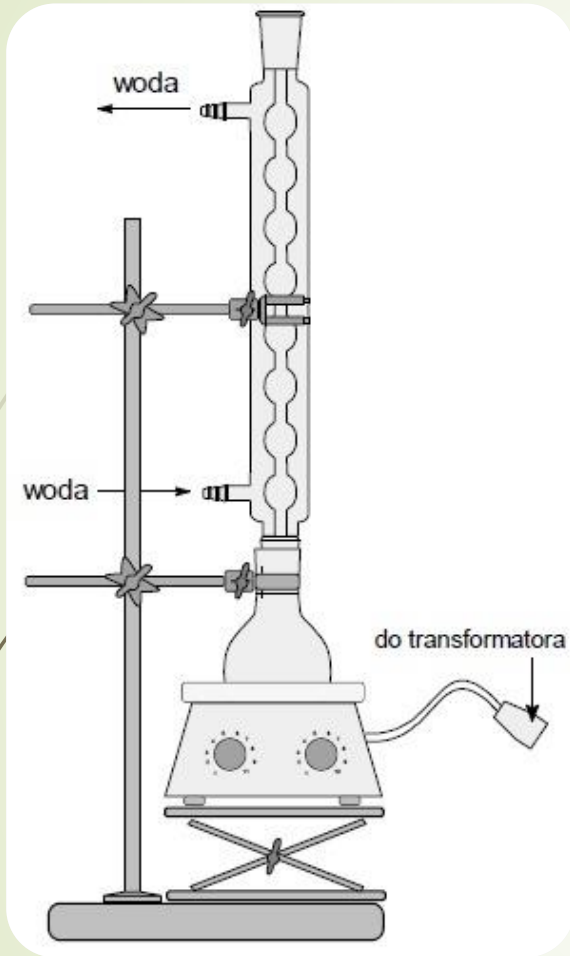


<https://pixabay.com/pl/photos/kryszta%C5%82y-kamienie-koryguj%C4%85cy-1567953/>

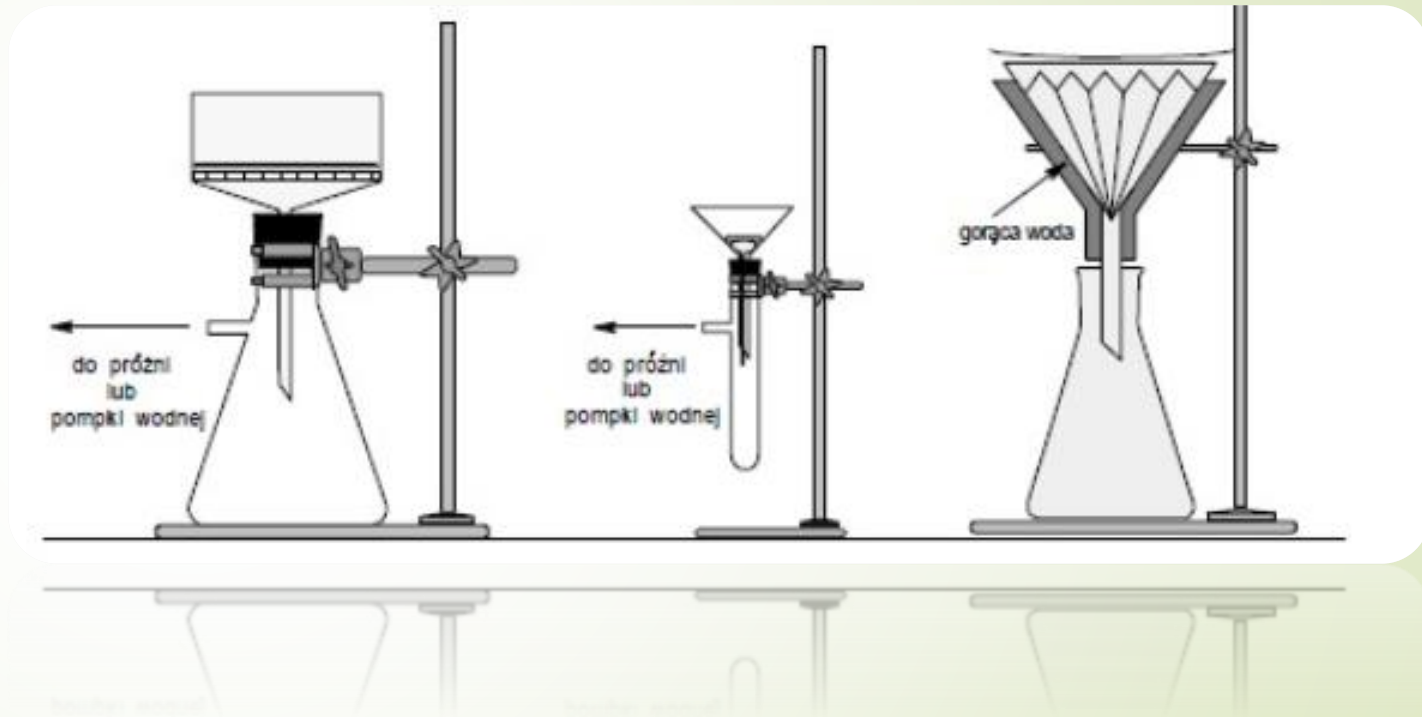
# Krystalizacja



- Proces opierający się na różnicy rozpuszczalności związku i zanieczyszczeń w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku w danej temperaturze.
- Zanieczyszczony związek → rozpuszczenie na gorąco w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku → usunięcie zanieczyszczeń (dodatek węgla aktywowanego, sączenie na gorąco) → ochłodzenie roztworu (wytrącenie produktu) → odsączenie i przemycie kryształów → suszenie → czysty produkt



<http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/krystalizacja>  
Autor: Adam Kuzdraliński, pobrano 27.09.2020



<http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/zestawy-laboratoryjne>  
Autor: Adam Kuzdraliński, pobrano 27.09.2020





# Krystalizacja

## **Niezbędna zasada:**

- Rozpuszczalnik dobrze rozpuszcza oczyszczaną substancję w temperaturze wrzenia roztworu i słabo w temperaturze pokojowej lub obniżonej oraz dobrze rozpuszcza zanieczyszczenia w temp. pokojowej lub obniżonej

## **lub**

- Rozpuszczalnik słabo rozpuszcza zanieczyszczenia ale jednocześnie dobrze rozpuszcza oczyszczaną substancję w temperaturze pokojowej lub obniżonej



# Rozpuszczalnik

## Cechy rozpuszczalnika do krystalizacji:

- Selektywna rozpuszczalność związku oczyszczanego/zanieczyszczeń
  - Łatwy do usunięcia (lotny)
  - Bezpieczny, nietoksyczny, niepalny
  - Tani
- 
- W krystalizacji stosowane są również mieszaniny rozpuszczalników: dodatek rozpuszczalnika w którym związek ma mniejszą rozpuszczalność powoduje wytrącenie kryształów z roztworu.

# Krystalizacja

- Stosowanie węgla aktywowanego ( mała ilość 1-4%, wprowadzana do gorącej ale nie wrzącej mieszaniny) do usuwania barwnych zanieczyszczeń (adsorbpcja zanieczyszczenia na porowatej powierzchni).
- Zależność wielkości i czystości otrzymanych kryształów od czasu chłodzenia

Szybkie chłodzenie i mieszanie → szybkie narastanie kryształów → więcej mniejszych kryształów, więcej zanieczyszczeń (większa powierzchnia). Wolniej rosnące kryształy są większe i mają bardziej uporządkowaną strukturę krystaliczną. Zanieczyszczenia obecne w siatce krystalicznej

- Dodatek zarodków krystalizacji w postaci drobnych monokryształów danej substancji/pocieranie bagietką o wnętrze kolby stosowane w celu ułatwienia procesu krystalizacji
- Odsączenie i przemycie kryształów: mała ilość zimnego rozpuszczalnika
- Suszenie – stosowanie lotnych rozpuszczalników, suszarki, eksykatory, systemy próżniowe
- Zwiększenie wydajności: odparowanie rozpuszczalnika z przesączu po filtracji i wytrącenie drugiego rzutu kryształów ( roztwór nienasycony → roztwór nasycony)
- Stosowanie w krystalizacji najmniejszej możliwej ilości rozpuszczalnika rozpuszczającej związek/ mieszaninę na gorąco → wysycenie roztworu → większa wydajność krystalizacji

# Polimorfizm

- Występowanie substancji chemicznej w postaci różnych form krystalicznych (odmian polimorficznych) – ten sam stan skupienia, różne ułożenie cząsteczek w kryształach (m.in. układ trójskośny, rombowy, trygonalny, tetragonalny, heksagonalny).
- Forma amorficzna – struktura nieuporządkowana
- Forma zależy od procesu krystalizacji: rodzaj rozpuszczalnika, szybkość chłodzenia, czas, ciśnienie, temperatura, mieszanie



<https://pixabay.com/pl/photos/kryształ-crystal>

Układ	Parametry sieciowe	Komórka elementarna
Regularny	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Tetragonalny	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Rombowy	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Trygonalny (romboedryczny)	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	
Heksagonalny	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$	
Jednoskośny	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$	
Trójskośny	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	

<http://mineralogiadlakolectionerow.blogspot.com/2016/03/nauka-o-krysztaach-krystalografia.html>

<https://kmim.wm.pwr.edu.pl/baszczuk/wp-content/uploads/sites/14/2020/04/Wyk%C5%82ad-10.pdf>

# Formy polimorficzne

- Ten sam skład chemiczny
- Takie same właściwości a stanie gazowym i ciekłym
- Różne właściwości fizyczne w stanie skupienia stałym:
  - Kolor, kształt
  - Temperatura topnienia
  - Temperatura sublimacji
  - Gęstość, twardość
  - Prężność par
  - Rozpuszczalność
  - Stabilność
  - Higroskopijność
  - Skręcalność optyczna

**Wpływ na biodostępność leków (np. ze względu na rozpuszczalność) oraz toksyczność!**



# Metody określania formy polimorficznej:

- Rentgenowska analiza dyfrakcyjna
- Metody analizy termicznej: różnicowa kalorymetria skaningowa, termogravimetria
- Spektroskopia: IR, Raman, NMR
- Badanie właściwości fizycznych np. rozpuszczalności
- Metody mikroskopowe



# Przemysł

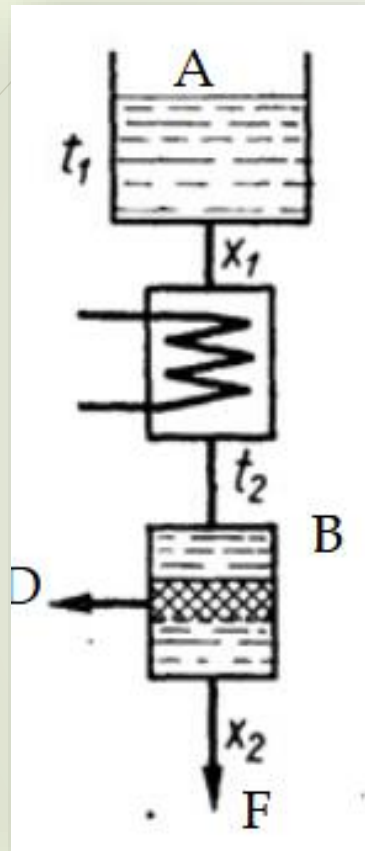
## **Cel:**

- Oczyszczenie substancji stałej
- Zmiana formy substancji (kryształy)

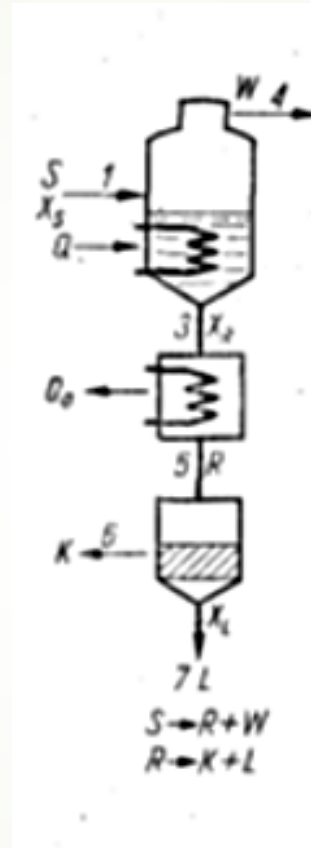
## **Kryształizacja w przemyśle może być prowadzona przez:**

- Chłodzenie
- Odparowanie rozpuszczalnika (panwie, warki)
- Precypitację
- Techniki rozpyłowe
- Kryształizatory – kryształizacja poprzez schładzanie wodą i intensywne mieszanie

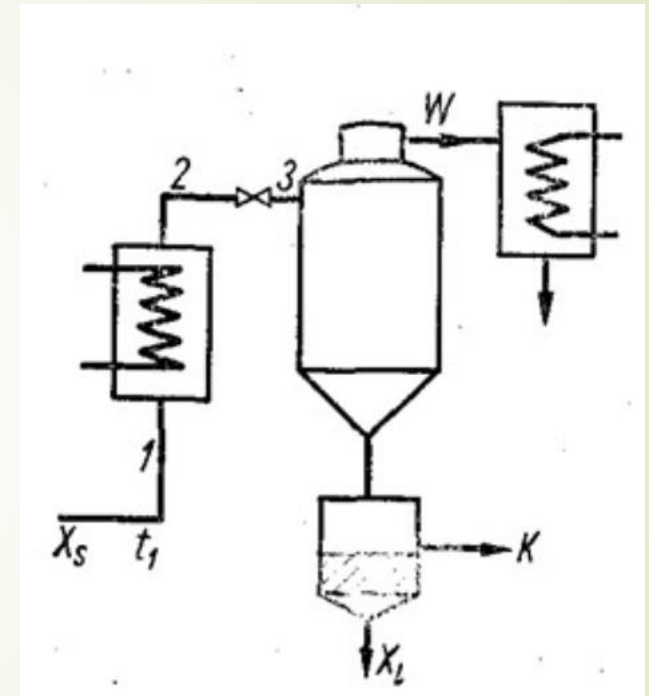
# Krystalizacja - Przemysł



Krystalizacja przez chłodzenie



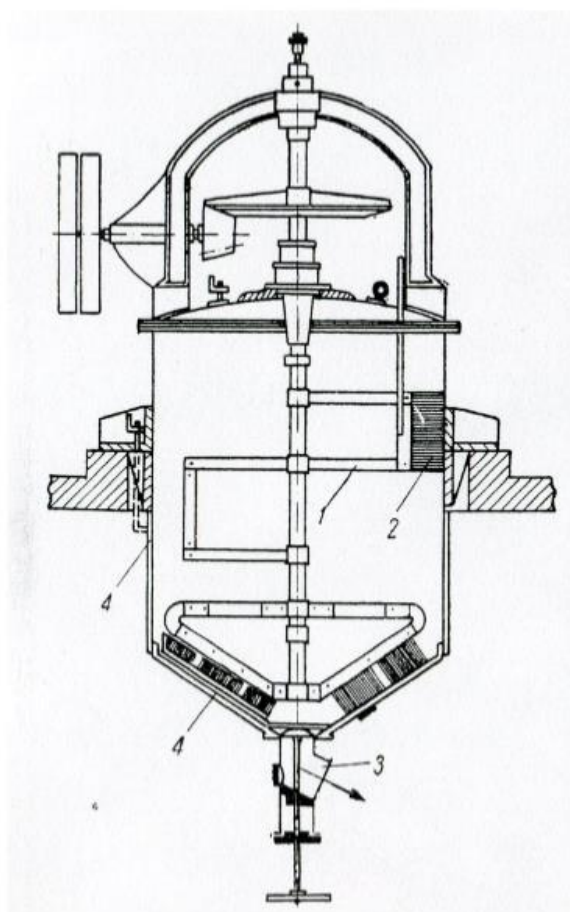
Krystalizacja przez odparowywanie



Krystalizacja przez samoodparowywanie



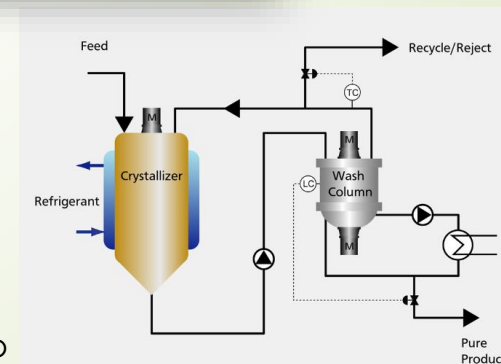
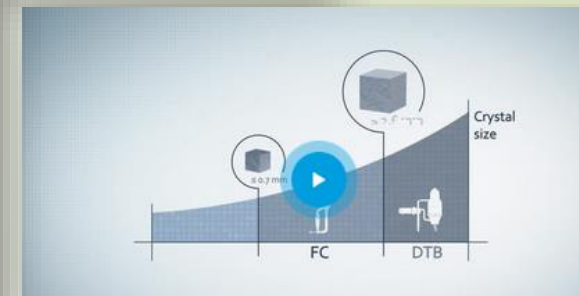
# Krystalizatory:



1- mieszadło; 2- szczotki; 3- usuwanie kryształów; 4- płaszcz chłodzący

# Przemysł- krystalizatory

- **Krystalizatory z wymuszonym obiegiem (FC):** odparowanie rozpuszczalnika z jednoczesnym zwiększeniem nasycenia cieczy procesowej co powoduje krystalizację. Często działają w podciśnieniu lub powyżej ciśnienia atm. Składa się ze zbiornika krystalizatora, pompy cyrkulacyjnej (dostarczenie energii do mieszania), wymiennika ciepła (energia potrzebna do odparowania) oraz sprzętu podciśnieniowego (przetwarzanie oparów procesu krystalizacji). Następuje kontrola przesylenia roztworu w celu uniknięcia spontanicznego zarodkowania (cyrkulacja roztworu). Powstają małe kryształy.
- **Krystalizatory DTB (turbulencji):** dwa strumienie odpływowe odprowadzające zawiesinę z kryształami i roztwór zasilający z niewielką ilością małych kryształów. Może generować duże kryształy. Umożliwia określenie tempa wzrostu i zarodkowania kryształów – duża kontrola operacji.
- **Krystalizacja z fazy stałej:** schłodzenie surowego produktu w krystalizatorze. Wytwarza czyste kryształy i zagęszcza zanieczyszczenia w pozostałym roztworze zasilającym. Następnie następuje rozdzielanie. Można kontrolować rozmiar kryształów poprzez umieszczenie w roztworze zasilającym.



# Chromatografia preparatywna

- ▶ Chromatografia [gr. chrōma 'barwa', gráphō 'piszę'],
- ▶ metoda rozdzielania jednorodnych mieszanin na składniki, w której wykorzystuje się różnicę sił oddziaływania tych składników z fazą ruchomą i nieruchomą (stacjonarną).
- ▶ Preparatywna – dotyczy małych ilości związku (nie w celach przemysłowych)



<https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/chromatografia;3885982.html>

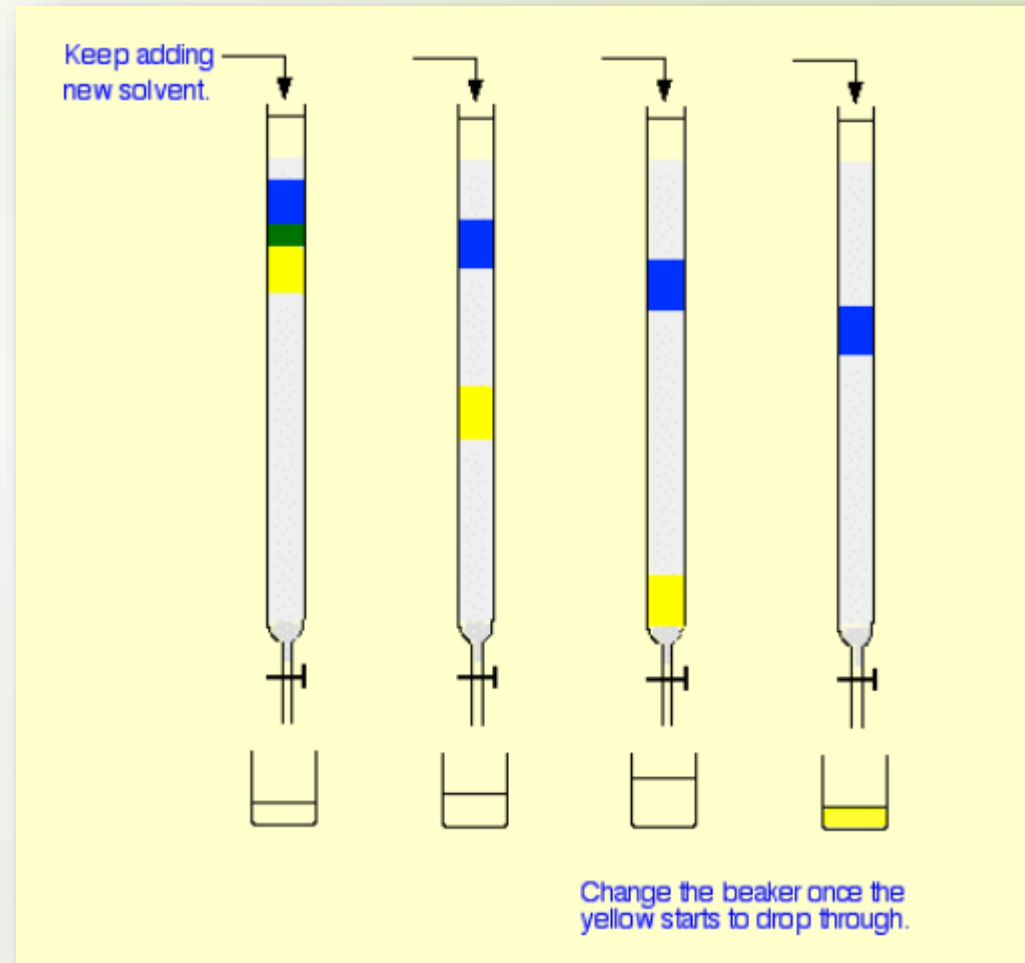
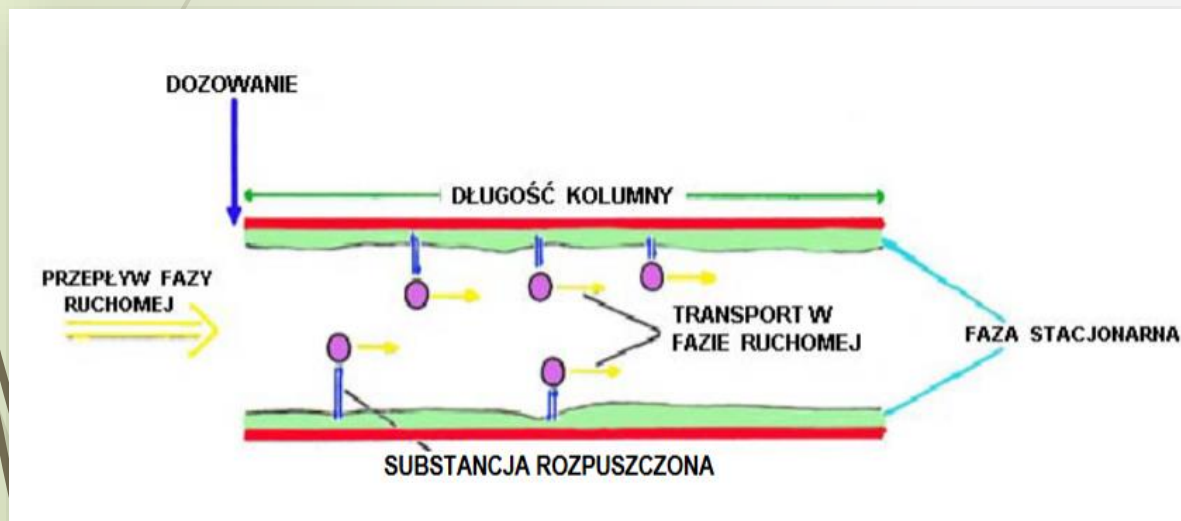
# Chromatografia cieczowa

Układ chromatograficzny:

- **Mieszanina**, którą chcemy rozdzielić
- **Faza stacjonarna**: złożę oddziałujące z cząsteczkami związków poddawanych rozdzielaniu o odpowiedniej budowie, powierzchni i stopniu obsadzenia grupami funkcyjnymi
- **Faza ruchoma**: eluent, rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników przenoszący rozdzielane substancje przez złożę.

Związki poddawane rozdzielaniu są przenoszone przez fazę stacjonarną przy pomocy eluentu (wymywanie). Ze względu na różne powinowactwo do fazy stacjonarnej i selektywne wymywanie rozpuszczalnikiem związki ulegają rozdzielaniu.

Chromatografia opiera się na wielokrotnym wiązaniu i odłączaniu cząsteczek rozdzielanych substancji do fazy stacjonarnej. Ze względu na różne powinowactwo do fazy stacjonarnej i rozpuszczalność w eluencie związki przemieszczają się z różną prędkością (posiadają różny czas wymywania – tzw. czas retencji)





## **Elucja:** wmywanie składników mieszanki w trakcie procesu chromatograficznego

- ▶ **izokratyczna** – stały skład eluentu
- ▶ **gradientowa** – zmienny skład fazy ruchomej, wzrastająca siła elucji w czasie prowadzenia procesu chromatograficznego wprowadzona przez stopniowe zwiększanie procentu rozpuszczalnika o większej sile retencji (wmywania) w czasie. Pozwala na początkowy rozdział składników o małej różnicy czasu retencji i przyspieszenie procesu wmywania w późniejszym etapie (składniki o większej różnicy czasów retencji)
- ▶ **Czas retencji** – czas potrzebny na wmycie składnika mieszanki z kolumny chromatograficznej w konkretnych warunkach (długość i skład fazy stacjonarnej, rodzaj i skład eluentu, powinowactwo substancji do fazy stacjonarnej)



# Ważne zasady w chromatografii

- ▶ Odpowiednie wysuszenie rozdzielanej próbki (brak rozpuszczalnika, który może zaburzyć rozdział)
- ▶ Dobór odpowiedniego rozpuszczalnika
- ▶ Odpowiedni dobór złoża do rozdziału
- ▶ Odpowiednia ilość żelu, długość kolumny chromatograficznej
- ▶ Czas, ekonomia
  
- ▶ **Normalny układ faz NP:** faza stacjonarna bardziej polarna niż faza ruchoma: stosowane złoża to m.in. krzemionka, tlenek glinu, celuloza, żywice jonowymienne, modyfikowane złoża do rozdziału aminokwasów, cukrów itp..
- ▶ **Odwrócony układ faz RP:** faza stacjonarna mniej polarna niż faza ruchoma np. silicażel modyfikowany długimi łańcuchami węglowodorowymi

# Rodzaje chromatografii preparatywnej

- **Chromatografia cienkowarstwowa** – prowadzona na płytkach szklanych lub aluminiowych pokrytych złożem np. żelem krzemionkowym. Mieszanina reakcyjna i związki referencyjne umieszczone na linii startowej. Poprzez wnikanie rozpuszczalnika w żel i jego wędrowanie po płytce następuje rozdział chromatograficzny. Następnie odpowiednie fragmenty żelu z rozdzieloną substancją są zeskrobywane z płytki i substancja jest wmywana z żelu za pomocą odpowiednich rozpuszczalników. TLC umożliwia rozdział małych ilości związków (do 100mg). Metoda TLC częściej stosowana jest w celach analitycznych.
- **Chromatografia kolumnowa** – złożo jest umieszczone w kolumnie chromatograficznej a mieszanina umieszczana na kolumnie i wmywana eluentem. W przypadku zautomatyzowanego procesu prowadzonego z zastosowaniem wysokich ciśnień mamy do czynienia z chromatografią HPLC.
- **Elektroforeza**



**TLC jako metoda analityczna**

[http://www2.chemia.uj.edu.pl/lab\\_chem\\_org/galeria-operacje-tlc.htm](http://www2.chemia.uj.edu.pl/lab_chem_org/galeria-operacje-tlc.htm)  
Pobrane 27.09.2020





**System Reveleris do prowadzenia częściowo zautomatyzowanej chromatografii ciekowej**

<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/25302-Pharmaceutical-HPLC-Systems-HPLC-Instruments/10541492-Reveleris-X2-Flash-Chromatography-System/>  
Pobrano 27.09.2020



**Aparatura do HPLC**

<https://www.tudelft.nl/citg/over-faculteit/afdelingen/watermanagement/research/waterlab/equipment/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>  
Pobrano 27.09.2020



# Literatura

1. Tułeckie J.: *Technologia środków leczniczych*. Warszawa PZWL 1978
2. Kuczyński L.: *Technologia leków*. Warszawa WNT 1971
3. Binięcki S.: *Preparatyka środków leczniczych. Podręcznik dla studentów farmacji*. Warszawa PZWL 1983  
Marona H.: *Syntezy środków leczniczych*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego. Kraków 2002
4. Jerzmanowska Z.: *Preparatyka organicznych związków chemicznych*. Warszawa PZWL 1973
5. Kieć- Kononowicz K.: *Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego. Kraków 2000
6. McMurry J.: *Chemia organiczna*. Tom I i II. Wydawnictwo Naukowe PWN S.A. Warszawa 2000
7. Tkaczyński T., Tkaczyńska D.: *Synteza i Technologia Chemiczna Leków*. PZWL. Warszawa 1984
8. Clayden J., Greeves N., Warren S.: *Organic Chemistry*. Oxford 2001