

# Centrifugalna particijska kromatografija u izolaciji prirodnih produkata

---

**Raos, Tea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:825763>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Tea Raos**

**Centrifugalna particijska kromatografija u  
izolaciji prirodnih produkata**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu i izrađen u Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Blažeković.

*Hvala svima koji su me naučili pravim životnim vrijednostima te od mene napravili osobu kakva sam danas, osobu koja je empatična, staložena, odgovorna, samouvjerena, ambiciozna, ali prije svega sretna. Mojoj obitelji od srca hvala što su uvijek bili uz mene, što su imali razumijevanja za svaku moju suzu, svaki moji smijeh, moji očaj, moju radost, moje uspjehe i neuspjehe, što su mi bili bezuvjetna potpora i što mi nisu dopustili da odustanem. Mojim roditeljima neizmjereno hvala na svemu što su mi u životu pružili, što su mi pokazali da je u životu najbitnije prvo biti čovjek, a tek onda sve ostalo. Mojoj sestri i mome bratu hvala što su ujedno i moji najbolji prijatelji, osobe koje me najbolje poznaju i razumiju. Hvala mojoj maloj Lu što mi je uljepšala život. Mojim prijateljima hvala na strpljenju i podršci. Studirati na FBF-u bilo je moje najveće zadovoljstvo, no ujedno i moje najveće razočaranje. Svim mojim kolegicama i kolegama hvala što su mi uljepšali studiranje.*

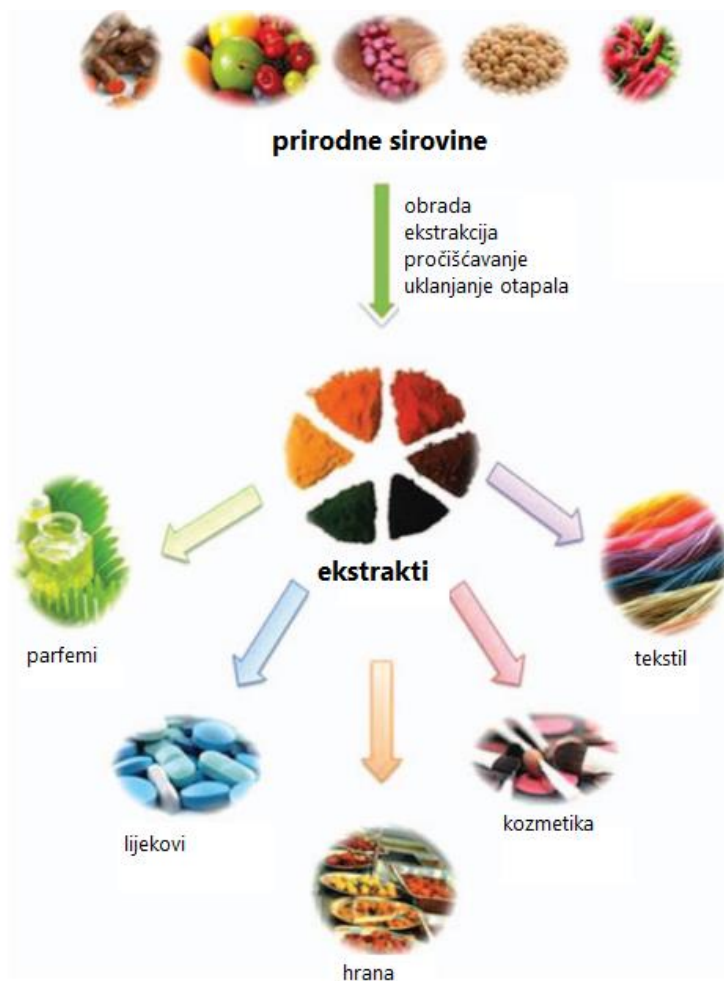
## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Prirodni produkti .....	1
1.2.	Kromatografija tekuće – tekuće bez čvrstog nosača .....	2
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	4
3.	MATERIJALI I METODE .....	5
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	6
4.1.	Teorijske osnove CPC tehnike .....	6
4.1.1.	Načelo metode.....	9
4.1.2.	Učinkovitost odjeljivanja .....	12
4.1.3.	Sustavi otapala.....	16
4.1.4.	Prednosti i nedostaci CPC tehnike .....	19
4.2.	Mogućnost primjene CPC tehnike u području prirodnih produkata .....	20
4.2.1.	Izolacija kanabinoida iz Cannabis sativa primjenom CPC tehnike.....	22
4.2.2.	Pročišćavanje proantocijanidina iz biljne vrste Vitis vinifera primjenom CPC metode .....	28
4.2.3.	Pročišćavanje sekoiridoidnog glikozida svertiamarina iz Centaurium erythraea centrifugalnom particijskom kromatografijom – usporedba dvaju različitih CPC uređaja ...	32
4.2.4.	Ostali primjeri primjene CPC tehnike u izolaciji i pročišćavanju prirodnih produkata .....	36
5.	ZAKLJUČCI.....	41
6.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	42
7.	LITERATURA.....	45
8.	SAŽETAK.....	53
8.	SUMMARY .....	54

## 1. UVOD

### 1.1. Prirodni produkti

Pojam prirodni produkti odnosi se na kemijske tvari koje se nalaze u prirodi te posjeduju karakteristične farmakološke ili biološke aktivnosti (Xiao i sur., 2013). Velik broj znanstvenih istraživanja i rezultirajući dokazi o izraženom biološkom, farmakološkom i/ili kliničkom djelovanju prirodnih produkata i potencijalnim dobrobitima za ljudskog zdravlje koje pruža njihova primjena, značajno su povećali njihovu popularnost i tržišnu potražnju (Rostagno i Prado, 2013). Prirodne produkte, njihove ekstrakte, frakcije ili čiste sastavnice danas naširoko nalazimo u proizvodima farmaceutske, prehrambene, kozmetičke, parfemske i tekstilne industrije (slika 1).



Slika 1. Primjena ekstrakata prirodnih produkata (preuzeto i prilagođeno iz Cavalcanti i sur., 2013)

Prirodni produkti općenito su složene smjese sastavljene od mnogo različitih kemijskih spojeva koje pripadaju različitim klasama sekundarnih biljnih metabolita. Uslijed sve većih zahtjeva za kvalitetom i djelotvornošću tržišnih proizvoda na bazi prirodnih produkata, do izražaja sve više dolaze inovativne tehnike njihove izolacije, pročišćavanja i ukoncentriravanja (Rostagno i Prado, 2013). Izolacija bioaktivnih prirodnih produkata iz prirodnih sirovina započinje procesom ekstrakcije, a potom slijede postupci odjeljivanja i pročišćavanja kojima je cilj postići visoku čistoću bioaktivnih spojeva od interesa koji se kasnije koriste u industrijskoj proizvodnji i/ili različitim istraživanjima (Xiao i sur., 2013). U istraživanju novih lijekova često se primjenjuje pristup biološkim djelovanjem-vođenog probira i frakcioniranja prirodnih produkata za dobivanje bioaktivnih frakcija i identifikaciju aktivnih spojeva, pri čemu se najčešće koriste različite kromatografske tehnike. Većina bioaktivnih spojeva u biljnoj je sirovini prisutna u niskoj koncentraciji, koegzistira sa spojevima slične strukture i termolabilna je (Xiao i sur., 2013). Činjenica da su prirodni produkti smjese kompleksnog fitokemijskog sastava implicira da je odjeljivanje i pročišćavanje ciljnih spojeva složen, zahtjevan i dugotrajan postupak (Rostagno i Prado, 2013), stoga se ističe potreba za pronalaskom što učinkovitijih i bržih postupaka koji mogu povećati prinose i ukupnu kvalitetu dobivenih prirodnih produkata i/ili njihovih bioaktivnih sastavnica.

## **1.2. Kromatografija tekuće – tekuće bez čvrstog nosača**

Za učinkovito provođenje frakcioniranja, izolacije i pročišćavanja prirodnih produkata obično se koristi kombinacija različitih metoda. Kromatografija je najraširenija metoda odjeljivanja (Xiao i sur., 2013), kojom se odjeljuju sastojci smjese ovisno o njihovoj raspodjeli između dviju faza, stacionarne i mobilne faze. Razlike u afinitetu analita prema stacionarnoj u odnosu na mobilnu fazu dovode do različite mobilnosti analita, a time i do razdvajanja. Priroda mobilne faze omogućuje klasifikaciju kromatografija na plinsku kromatografiju, tekućinsku kromatografiju te kromatografiju superkritičnim fluidom (Berthod i Faure, 2015). U novije vrijeme javlja se povećan interes za kromatografiju tekuće –tekuće bez čvrstih nosača kao tehniku koja osigurava visoku razinu odjeljivanja, izolacije i pročišćavanja prirodnih produkata te kao takva predstavlja obećavajuću alternativu tradicionalnim kromatografskim metodama (Spinu i sur., 2020). Radi se o tehnici tekućinske kromatografije, poznatoj kao protustrujna kromatografija (engl. *countercurrent chromatography*, CCC), koju karakterizira tekuća stacionarna faza koja nije vezana za čvrsti nosač. Tekuća stacionarna faza zadržava se na mjestu centrifugalnom silom i to

na dva načina, hidrostatski ili hidrodinamički pa s obzirom na to razlikujemo dva tipa: protustrujnu kromatografiju velike brzine (engl. *high-speed countercurrent chromatography*, HSCCC) i centrifugalnu particijsku kromatografiju (engl. *centrifugal partition chromatography*, CPC) (Hubert i sur., 2013). CPC koristi hidrostatsku kolonu s poljem konstantne gravitacijske sile koju proizvodi kolona s jednom osi rotacije. HSCCC instrument koristi hidrodinamičku kolonu koja se sastoji od zavojnice namotane na bobinu koja rotira oko svoje osi i okreće se oko druge osi centrifuge (Roehrer i Minceva, 2019a).

Centrifugalna particijska kromatografija pokazuje odlične rezultate u frakcioniranju ekstrakata te izolaciji i pročišćavanju različitih bioaktivnih spojeva iz prirodnih produkata (Lee i sur., 2013). Prvi CPC instrument je proizvela japanska tvrtka Sanki Engineering Ltd. u Kyotu, na čelu s Kanichijem Nunogakijem, 1982. godine (Marchal i sur., 2003). Navedena metoda kombinira načela ekstrakcije i kromatografije i može se koristiti za izolaciju tvari sa širokim rasponom polarnosti (Bartnik i Mazurek, 2016), a prikladna je za proizvodnju velikih količina spojeva visoke čistoće (Kedzierski i sur., 2014). Njena jedinstvenost leži u tome što su i stacionarna i mobilna faza tekuće pa se analiza i odjeljivanje sastavnica prirodnih produkata zasniva na raspodjeli otopljenih tvari između te dvije nemješljive tekuće faze (Bojczuk i sur., 2017). Uloge stacionarne i mobilne faze mogu se zamijeniti tijekom postupka odjeljivanja što je jedna od karakteristika kromatografije tekuće – tekuće bez čvrstog nosača koja navedenu tehniku čini superiornijom u odnosu na kromatografiju s čvrstom stacionarnom fazom (Morley i Minceva, 2020).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Za procjenu biološke aktivnosti i kontrolu kvalitete biljnih lijekova potrebna je velika količina pročišćenih bioaktivnih spojeva iz prirodnih materijala. Navedeno zahtjeva razvoj učinkovitih preparativnih metoda odjeljivanja i pročišćavanja. Centrifugalna particijska kromatografija omogućuje dobivanje izolata visoke čistoće koji se mogu koristiti kao standardi u kvantitativnim analizama ili kao referentni spojevi u biološkim/farmakološkim testovima. Pokazala se učinkovitom i u postupcima frakcioniranja i ukoncentriravanja prirodnih produkata od interesa za farmaceutske, prehrambene i kozmetičku industriju. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti dosadašnja teorijska saznanja o centrifugalnoj particijskoj kromatografiji te mogućnostima njezine primjene u domeni prirodnih produkata.



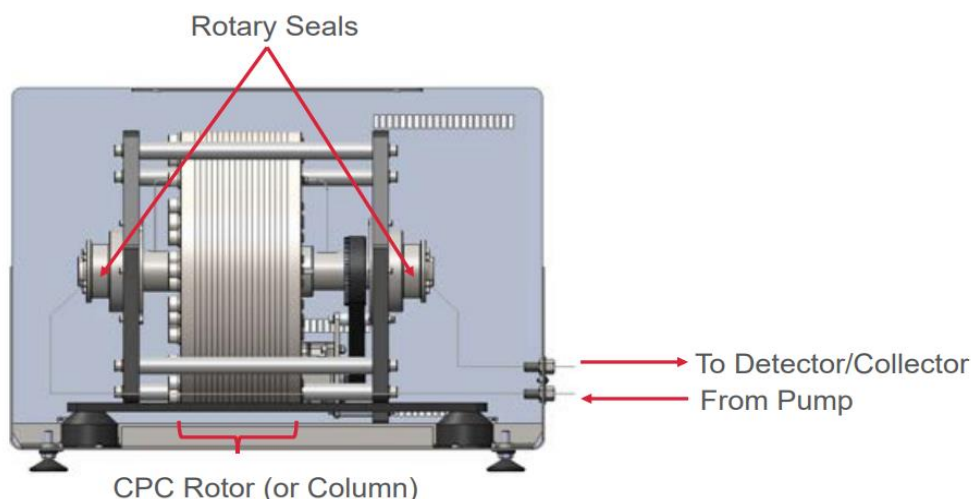
### 3. MATERIJALI I METODE

U svrhu izrade ovog diplomskog rada korištena je stručna i znanstvena literatura koja se bavi tematikom centrifugalne particijske kromatografije. Pretraživane su elektroničke baze podataka PubMed, ScienceDirect, Taylor&Francis Online i Google Scholar kao i mrežne stranice proizvođača CPC uređaja. Prilikom pretraživanja korištene su ključne riječi: *natural products purification, centrifugal partition chromatography, countercurrent chromatography, liquid-liquid chromatography*. Prikupljeni znanstveni članci su detaljno proučeni te su u radu izdvojeni najvažniji rezultati, rasprave i zaključci.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

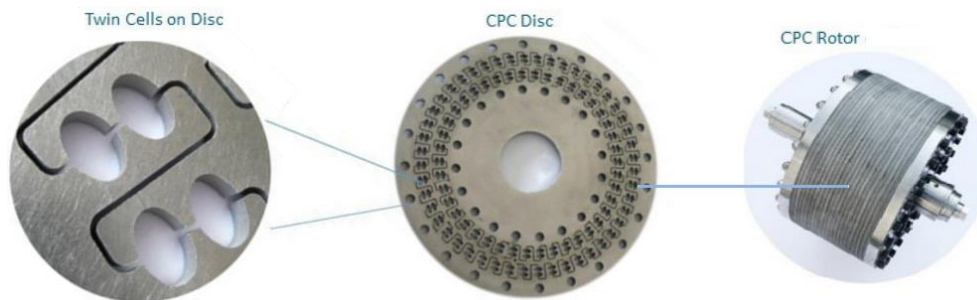
### 4.1. Teorijske osnove CPC tehnike

Najvažniji dio CPC instrumenta je kolona, odnosno rotor koji vrtnjom oko svoje osi stvara konstantno centrifugalno polje koje zajedno sa specifičnom građom kolone omogućuje zadržavanje tekuće stacionarne faze u nepokretnom stanju, dok kroz nju pod utjecajem tlaka pumpe prolazi tekuća mobilna faza (slika 2). Na kraju osi nalaze se rotacijske brtve koje omogućavaju prolaz tekućine iz statičkog u rotirajući dio (Kumar i sur., 2014).



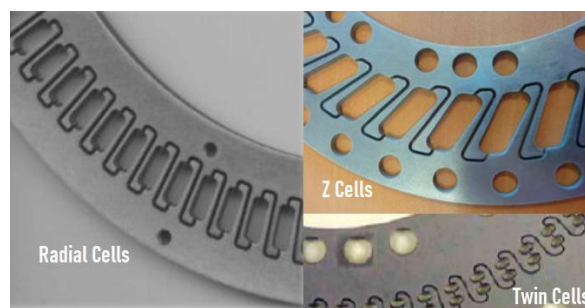
Slika 2. CPC rotor (preuzeto sa [www.gilson.com](http://www.gilson.com))

Kolonu (rotor) čini nekoliko identičnih diskova postavljenih jedan pored drugog (Bojczuk i sur., 2017). Na svakom disku radialno je ugraviran velik broj ćelija međusobno povezanih uskim kanalima (slika 3) (Maciuk i sur., 2004). Geometrija ćelija u stalnom je napretku s ciljem poboljšanja performansi uređaja (slika 4). Trenutno najčešće korišteni dizajn temeljen je na geometriji dvostruke ćelije, gdje su kružne ili eliptične ćelije uparene dvije po nizu tako da su parovi ćelija u izravnom kontaktu (engl. *twin cells*) (Roehrer i Minceva, 2019a).



Slika 3. CPC diskovi s ugraviranim ćelijama spojeni u rotor  
(preuzeto i prilagođeno sa [www.gilson.com](http://www.gilson.com))

Specifični dizajn ovih ćelija doprinosi boljem zadržavanju stacionarne faze u CPC koloni te omogućuje korištenje većih brzina protoka mobilne faze, što dovodi do bržeg odvajanja analita i veće produktivnosti ([www.gilson.com](http://www.gilson.com)).



Slika 4. Različiti dizajni ugraviranih ćelija na CPC disku  
(preuzeto i prilagođeno iz [www.kromaton.com](http://www.kromaton.com))

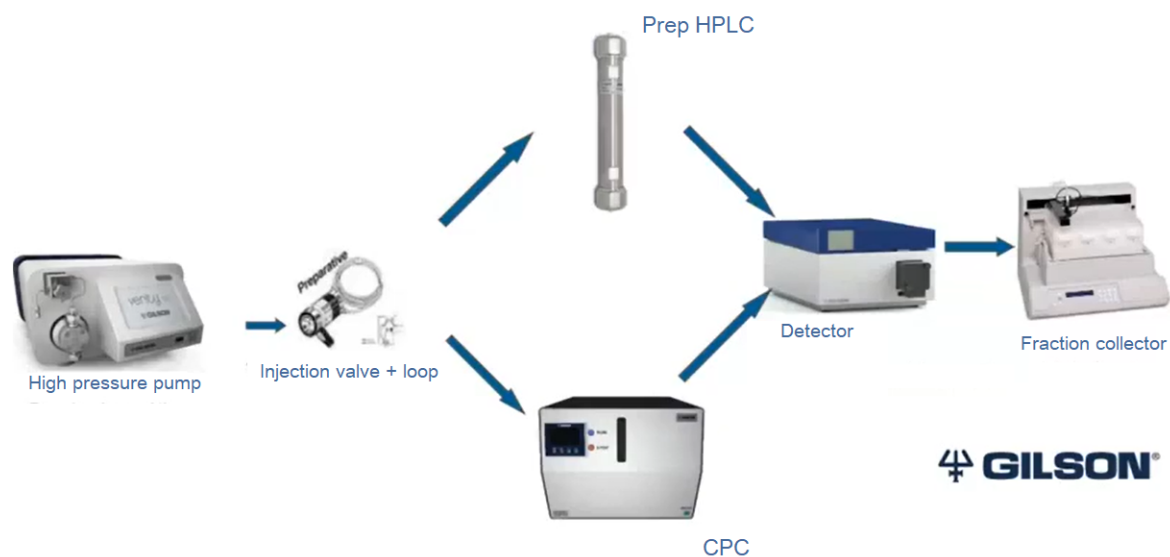
Ekstrakcijske ćelije međusobno su povezane uskim kanalima. Diskovi su odvojeni brtvom od teflona, a posljednja ćelija jednog diska povezana je s prvom ćelijom sljedećeg diska (Roehrer i Minceva, 2019). Kromatografski CPC sustavi dostupni na tržištu razlikuju se u građi rotora, što je vidljivo i iz tablice 1 koja prikazuje modele instrumenata renomiranog proizvođača Gilson zajedno sa njihovim performansama. Neki imaju od nekoliko stotina, a neki i više od 2000 međusobno povezanih ćelija i kanala (Bojczuk i sur., 2017).

CPC je razvijen u svestranu metodu preparativne kromatografije za laboratorijske uvjete, a nedavno je razvijeno i kromatografsko rješenje za industrijske potrebe s brzinama protoka mobilne faze u rasponu od više litara u minuti (Lorantfy i sur., 2020).

Tablica 1. Karakteristike različitih CPC uređaja proizvođača Gilson dostupnih na tržištu (preuzeto i prilagođeno iz [www.gilson.com](http://www.gilson.com))

Uređaj	CPC 100	CPC 250	CPC 250 PRO	CPC 1000	CPC 1000 PRO
<b>Kapacitet kolone (mL)</b>	100	250	250	1000	1000
<b>Maksimalna injektirana masa (g)</b>	1	6	30	30	100
<b>Maksimalan protok (mL/min)</b>	15	15	80	50	350
<b>Maksimalni tlak (bar)</b>	100	100	100	80	80
<b>Brzina rotacije (okr./min)</b>	100 – 3000	100 – 3000	100 – 3000	100 – 1500	100 – 2000

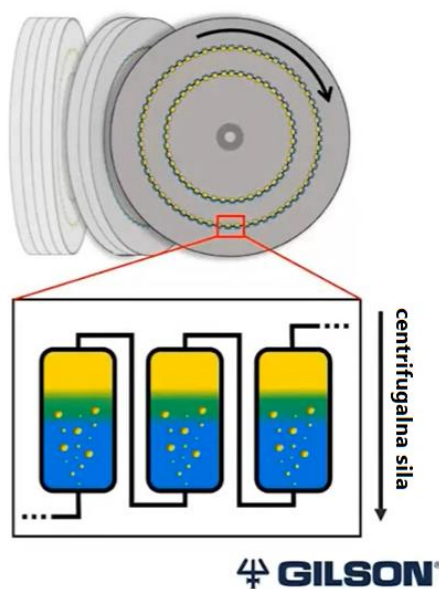
Priključci na koloni, prikazani na slici 2., ukazuju na protok otapala u kolonu radi razdvajanja sastavnica, a priključci iz kolone idu u detektor i sakupljač frakcija ([www.gilson.com](http://www.gilson.com)). CPC sustav zahtjeva identične periferne jedinice kao i sustav preparativne tekućinske kromatografije visokih performansi (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), odnosno potrebni su pumpa, injektor, detektor i sakupljač frakcija (slika 5.).



Slika 5. Usporedba CPC i HPLC sustava (preuzeto iz [www.gilson.com](http://www.gilson.com))

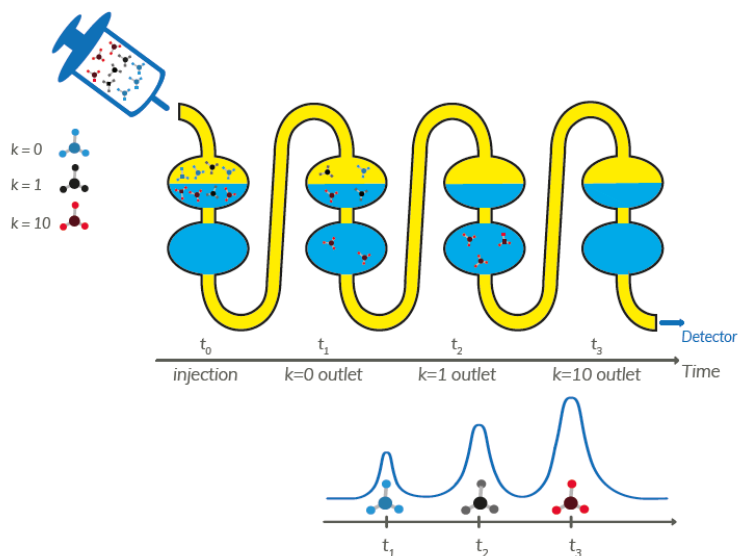
#### 4.1.1. Načelo metode

Odvajanje analita pomoću metode centrifugalne particijske kromatografije temelji se na njihovu ponašanju između dvije tekućine koja se ne miješaju, već ostaju u ravnoteži tvoreći dvofazni sustav, odnosno koriste se kao mobilna i stacionarna faza (Kim i sur., 2006a). Nakon odabira prikladnog sustava otapala, stacionarna faza se pumpa u rotor, dok se on okreće umjerenom brzinom vrtnje. Djelovanjem centrifugalne sile stacionarna faza se zadržava unutar rotora. Mobilna faza dovodi se pod tlakom u rotor i pumpa kroz stacionarnu fazu. Nakon uspostave ravnoteže između faza, injektira se otopljeni uzorak (Kumar i sur., 2014). Dolazi do razmjene analita između dvije faze, a odvajanje otopljenih ciljnih spojeva postiže se ovisno o konstanti distribucije ( $K_D$ ) između mobilne i stacionarne faze. Mobilna faza se dekantira na izlazu iz svake ćelije i tako ulazi u iduću ćeliju (www.kromaton.com).



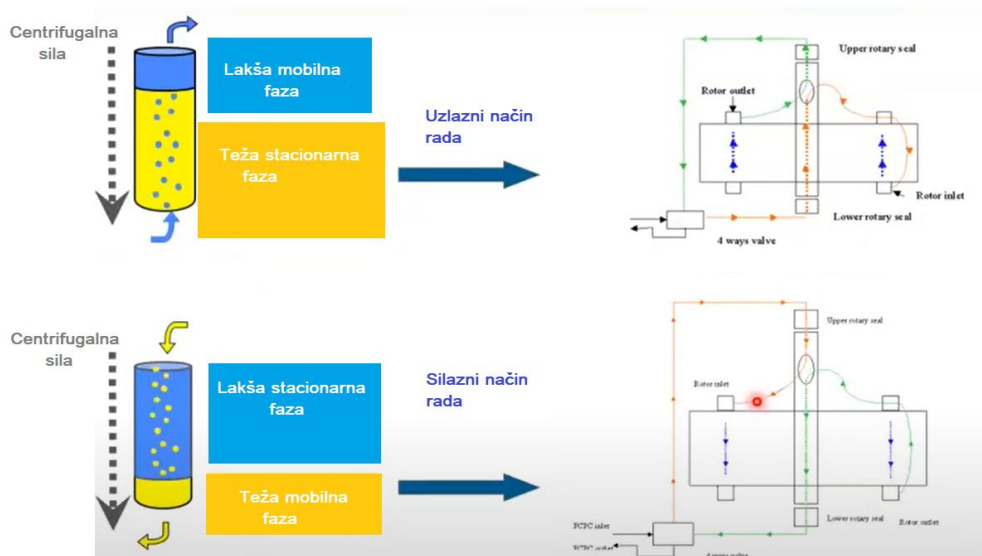
Slika 6. Raspodjela faza unutar ćelija rotora (preuzeto i prilagođeno iz [www.gilson.com](http://www.gilson.com))

Ćelije rotora oponašaju podjelu tekućina – tekućina sličnu onoj izvedenoj u lijevcima za odjeljivanje, ali ponovljenu stotine puta kroz putanju protoka mobilne faze (slika 6). Eluirane frakcije mobilne i stacionarne faze prikupljaju se u razdoblju od nekoliko minuta do nekoliko sati (slika 7) te sadržavaju pojedinačne pročišćene ciljne spojeve (Kumar i sur., 2014).



Slika 7. Načelo odvajanja analita CPC tehnikom (preuzeto iz [www.nomadlabs.eu](http://www.nomadlabs.eu))

Ovisno o gustoći stacionarne i mobilne faze, razlikuju se uzlazni način rada (engl. *ascending mode*) i silazni način rada (engl. *descending mode*) (slika 8.). Preklopni ventil omogućuje odabir između navedenih načina rada. U uzlaznom načinu rada mobilna faza je lakša tekućina, koja prolazi kroz gušću stacionarnu fazu u smjeru suprotnom od centrifugalnog polja tako da ulazi kroz dno ćelije, a izlazi pri vrhu, dok je kod silaznog načina rada situacija obrnuta (Berthod i Faure, 2015).

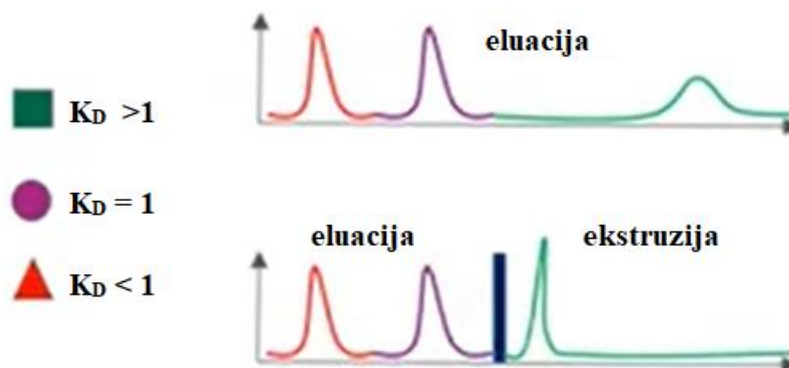


Slika 8. Uzlazni i silazni način rada CPC uređaja (preuzeto i prilagođeno iz [www.gilson.com](http://www.gilson.com))

Analiza metodom centrifugalne particijske kromatografije može se prikazati u nekoliko koraka (www.gilson.com):

- izbor dvofaznog sustava otapala
- odabir uzlaznog ili silaznog načina rada
- punjenje kolone stacionarnom fazom
- uravnotežavanje kolone s mobilnom fazom kako bi se odredio radni tlak sustava i zadržavanje stacionarne faze
- injektiranje uzorka
- raspodjela analita između mobilne i stacionarne faze
- eluirajuća pokretna faza usmjerena je na detektor i/ili sakupljač frakcija
- ekstruzija – čista stacionarna faza se pumpa u kolonu

Postupak elucija – ekstruzija koristi prednosti tekuće prirode stacionarne faze koristeći klasično ispiranje i istiskivanje u jednom ciklusu. Primjenom ovog postupka pokrivena je cijela paleta polariteta analita ( $K_D = 0 - \infty$ ). Tijekom određenog vremenskog razdoblja nakon provedene elucije neeluirani analiti migriraju unutar kolone. Ekstruzija, odnosno pumpanje čiste stacionarne faze u kolonu omogućuje skraćenje postupka analize (vidljivo iz kromatograma prikazanih na slici 9.) i sprječavaju potrošnju velikih količina otapala uz istovremeno dobivanje kolone potpuno napunjene čistom stacionarnom fazom spremnom za iduću analizu (Berthod i Faure, 2015).



Slika 9. Kromatogrami dobiveni postupkom klasične elucije i postupkom elucija – ekstruzija (preuzeto i prilagođeno iz www.gilson.com)

U analizi primjenom CPC sustava većinom se primjenjuje izokratna elucija. Glavna prednost takve elucije u ovoj metodi je stabilnost stacionarne faze jer se nje od trenutka ravnoteže gubi za manje od 2 % po satu. Uz gradijentnu eluciju stacionarna faza se uvijek djelomično gubi, no takva elucija je prikladna alternativa u razdvajanju više komponenata sa značajnim razlikama u konstantama distribucije. Gradijentna elucija se uglavnom koristi za probir novih prirodnih ekstrakata. Ovakav način elucije može se koristiti i kada je potrebno vremenski skratiti postupak razdvajanja. Tijekom elucije mijenja se sastav mobilne faze, a što su pri tome manje promjene stacionarne faze, manji je i njezin gubitak (Bojczuk i sur., 2017). Nisu svi sustavi otapala prikladni za izvođenje gradijentne elucije.

#### 4.1.2. Učinkovitost odjeljivanja

Na učinkovitost odjeljivanja kemijskih sastavnica prirodnih produkata primjenom CPC metode utječu različiti parametri koji se mogu podijeliti u 4 osnovne skupine:

- parametri koji ovise o svojstvu uzorka u određenom sustavu otapala – konstanta distribucije i topljivost uzorka
- parametri koji se odnose na fizikalna svojstva sustava otapala – međufazna napetost, gustoće, viskoznosti
- parametri instrumenta – oblik, veličina, volumen ćelija i kanala
- parametri koji ovise o metodi – način rada, brzina protoka mobilne faze, brzina rotacije rotora, injektirani volumen uzorka

Brzina protoka mobilne faze i brzina rotacije rotora ograničene su maksimalnim radnim tlakom (Bojczuk i sur., 2017). Kao poseban parametar kojim se opisuju promjene volumena tekuće stacionarne faze uvodi se zadržavanje stacionarne faze ( $S_F$ ) koje je dano formulom:

$$S_F = \frac{V_S}{V_C}$$

gdje je  $V_S$  volumen stacionarne faze koji se može zadržati u koloni pri danoj rotaciji i brzini protoka mobilne faze, a  $V_C$  je ukupni volumen kolone (Fumat i sur., 2016). Navedeni parametar se često izražava u postotku. Kako bi se odredilo zadržavanje stacionarne faze, kolona se prvo potpuno napuni stacionarnom fazom, zatim se uključuje rotacija te se mobilna faza pumpa kroz kolonu željenom brzinom protoka. Mobilna faza zamijenit će određeni dio stacionarne faze u



koloni, dok se ne postigne ravnoteža. Na kraju postupka se preostala stacionarna faza eluira iz kolone i odredi se volumen (Bezold i Minceva, 2019). Volumen stacionarne faze može se izračunati tako da se od ukupnog volumena kolone oduzme volumen izbačene stacionarne faze do postizanja dinamičke ravnoteže (Issaadi i sur., 2017). Zadržavanje stacionarne faze u koloni smanjuje se povećanjem brzine protoka mobilne faze, a povećava se i povećanjem brzine rotacije. Idealno odvajanje sastavnica ne može se postići ukoliko se primjenjuje CPC metoda s lošim zadržavanjem stacionarne faze (www.gilson.com). Tlak raste s povećanjem brzine protoka mobilne faze i brzine rotacije, što je i jedan od razloga zašto se izvodi korak uravnotežavanja sustava pri razvoju metode. Promjena sustava otapala, brzine protoka ili brzine rotacije dovodi do promjene radnog tlaka u sustavu. Dobra topljivost uzorka pospješuje prijenos mase između obje faze te povećava produktivnost (Adelmann i Schembecker, 2011).

Zadržavanje bilo kojeg spoja u CPC koloni opisuje se klasičnom kromatografskom jednadžbom:

$$V_r = V_m + K_D V_s$$

gdje je  $V_r$  volumen zadržavanja,  $V_m$  volumen mobilne faze,  $K_D$  konstanta distribucije te  $V_s$  volumen stacionarne faze.

Učinkovitost kolone može se izraziti pomoću broja teorijskih tavana ( $N$ ) prema formuli (Berthod i sur., 2009):

$$N = 16 \left( \frac{V_r}{W_b} \right)^2$$

Razlučivanje ( $R_s$ ) je kromatografski parametar koji opisuje kvalitetu razdvajanja dvaju pikova vidljivih na kromatogramu. Definiira se formulom:

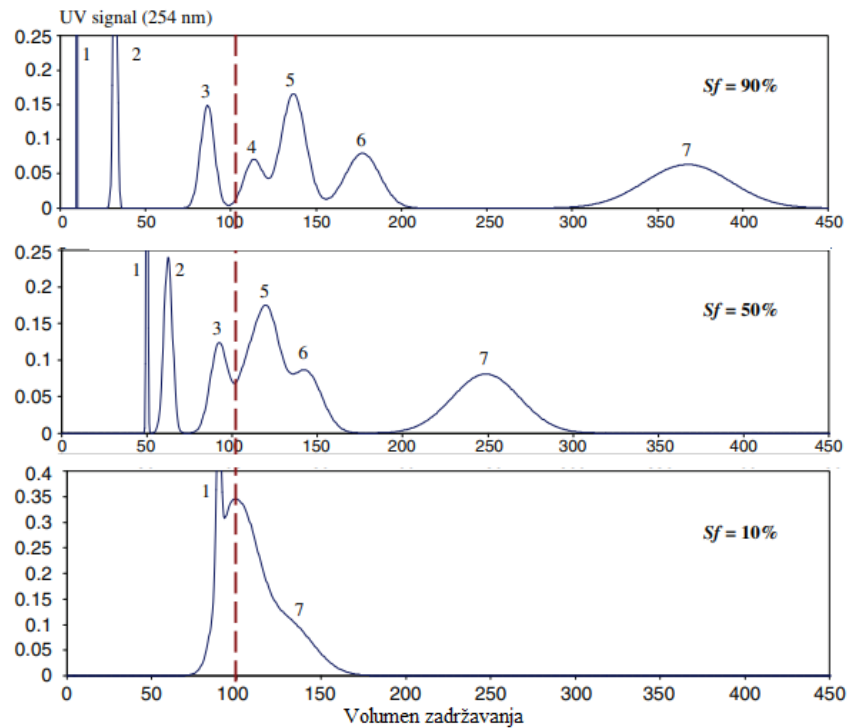
$$R_s = \frac{V_{r2} - V_{r1}}{\frac{W_{b2} + W_{b1}}{2}}$$

gdje su  $V_{r2}$  i  $V_{r1}$  retencijska vremena pikova spojeva 2 i 1, dok su  $W_{b2}$  i  $W_{b1}$  prosječne širine pikova spojeva 2 i 1 na baznoj liniji (Berthod i Faure, 2015).

Koristeći prethodne formule, razlučivanje se može izraziti i kao:

$$R_S = S_f \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{K_{D2} - K_{D1}}{1 - S_f \left(1 - \frac{K_{D2} + K_{D1}}{2}\right)}$$

Razlučivanje dvaju vrhova znatno ovisi o količini stacionarne faze zadržane u CPC koloni. Kromatogrami sa slike 10. prikazuju da visoke vrijednosti  $S_f$  daju dobro razlučivanje između vrhova, a smanjenjem vrijednosti  $S_f$  razlučivanje među vrhovima postaje lošije.



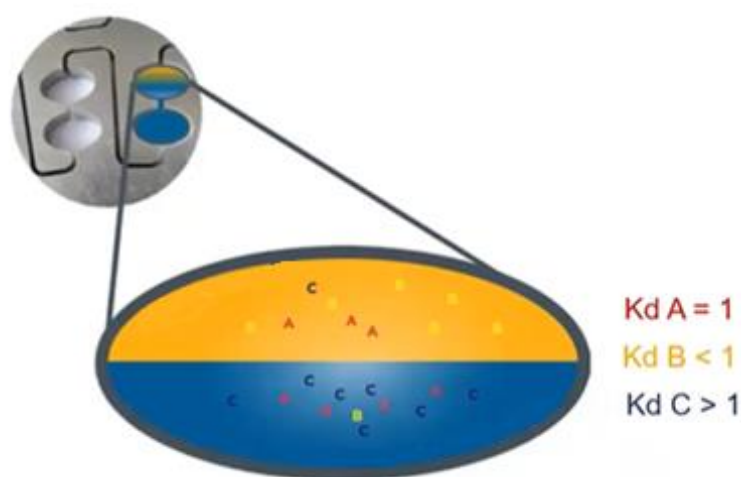
Slika 10. Ovisnost razlučivanja o zadržavanju stacionarne faze  
(preuzeto i prilagođeno iz Berthod i Faure, 2015)

Geometrija ćelija CPC uređaja također doprinosi odgovarajućem zadržavanju stacionarne faze. Dizajn dvostruke ćelije poboljšava prijenos mase i osigurava veće zadržavanje stacionarne faze (Adelmann i Schembecker, 2011).

Princip odvajanja centrifugalnom particijskom kromatografijom temelji se na razlikama u konstantama distribucije analita između dvije tekuće faze koje se međusobno ne miješaju (Boonloed i sur., 2016). Konstanta distribucije za analit, koji se nalazi u dvofaznom sustavu otapala uz konstantnu temperaturu, dana je formulom:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m}$$

pri čemu je  $[A]_m$  koncentracija analita u mobilnoj fazi, a  $[A]_s$  koncentracija analita u stacionarnoj fazi (Kumar i sur., 2014). Analit (A) s vrijednosti  $K_D = 1$  ravnomjerno je raspoređen između obje faze. Analit (C) s vrijednosti  $K_D > 1$  više se zadržava u stacionarnoj fazi, dok se analit (B) s vrijednosti  $K_D < 1$  više zadržava u mobilnoj fazi (slika 11). Analit koji će prvi eluirati je onaj koji se najviše zadržava u mobilnoj fazi, odnosno onaj s najnižom vrijednosti konstante distribucije (Kumar i sur., 2014).



Slika 11. Raspodjela analita između mobilne i stacionarne faze  
(preuzeto i prilagođeno iz [www.gilson.com](http://www.gilson.com))

Temperatura utječe na ravnotežu tekućina – tekućina, odnosno na sastav mobilne i stacionarne faze. Faze se obično pripremaju miješanjem unaprijed definiranih volumnih dijelova pojedinih otapala. Nakon toga, faze se uravnotežuju na sobnoj temperaturi ili na određenoj temperaturi pomoću vodene kupelji te se dijele u dva različita spremnika prije nego se koriste u CPC postupku (Roehrer i Minceva, 2019b). Mnogi dvofazni sustavi pokazuju fenomen gornje kritične temperature otopine (engl. *critical solution temperature*, CST). Za temperature više od CST, dvofazni tekući sustav prelazi u monofazni (Berthod i Armstrong, 1988a). Promjene temperature odražavaju se na gustoću, međufaznu napetost te viskoznost tekućina. Konstanta distribucije analita također ovisi o temperaturi (Berthod i Armstrong, 1988b). Utjecaj temperature različit je za različite sustave otapala, stoga se treba procijenjivati za svaki sustav zasebno. Općenito,

smanjene viskoznosti i povećanje učinkovitosti s povećanjem temperature prisutno je kod većine promatranih sustava (Roehrer i Minceva, 2019b).

#### 4.1.3. Sustavi otapala

Razvoj odgovarajućih sustava otapala najvažniji je korak u centrifugalnoj particijskoj kromatografiji, obzirom da se odabir dvofaznog tekućeg sustava zapravo svodi na odabir stacionarne i mobilne faze te svaka promjena u jednoj fazi izaziva promjenu u drugoj fazi (Berthod i Faure, 2015). Sustavi otapala složene su smjese otapala koja će rezultirati proizvodnjom dviju faza, hidrofilne i hidrofobne faze. Broj potencijalnih dvofaznih sustava otapala je ogroman, a formiraju se miješanjem do četiri različita otapala u različitim omjerima (Marlot i sur., 2020). Otapala i njihovi međusobni omjeri određuju se na način da je potrebno zadovoljiti 3 kriterija:

- formiranje dviju tekućih faza koje se međusobno ne miješaju
- zadržavanje stacionarne faze u CPC koloni
- moguće odjeljivanje uzorka odabranim dvofaznim tekućim sustavom (Kumar i sur., 2014), tj. raspon konstanti distribucija analita povoljan za izvođenje metode

U literaturi se navode različiti optimalni rasponi konstanti distribucija spoja od interesa: 0,2 – 2,0 (Jeon i sur., 2012), 0,2 – 5,0 (Bartnik i Mazurek, 2016), 0,5 – 2,0 (Boonloed i sur., 2016), 0,5 – 2,0 (Issaadi i sur., 2017), 0,5 – 3,0 (www.gilson.com) i 0,5 – 5,0 (Kumar i sur., 2014; Destandav i sur., 2015). Ukoliko je  $K_D$  određenog spoja premalen, vjerojatna je koelucija s drugim spojevima te se pikovi neće dovoljno razdvojiti, dok u slučaju prevelikog  $K_D$  može doći do širenja pika i sam proces elucije dugo traje, što povećava potrošnju otapala i smanjuje produktivnost. Bitno je postići da se  $K_D$  ciljnog spoja dovoljno razlikuje od konstanti distribucija drugih molekula (www.gilson.com).

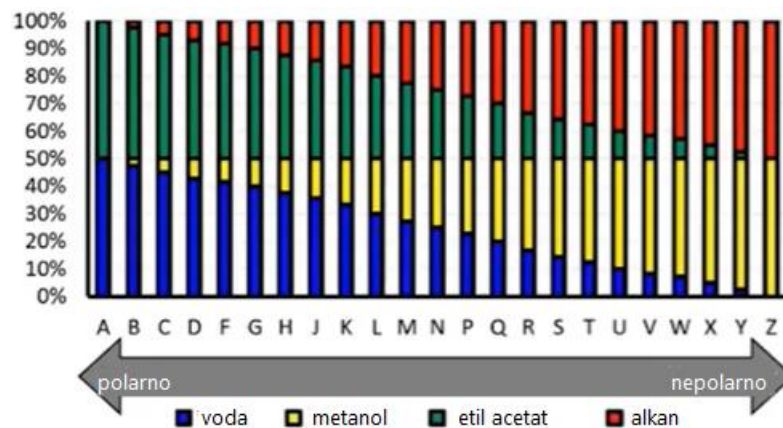
Postoji mnogo otapala koja se međusobno ne miješaju (tablica 2). Kad je poznata priroda organskih tvari koje je potrebno razdvojiti, odgovarajući sustav otapala može se pronaći pretraživanjem literature o sustavima otapala koji su uspješno primijenjeni na slične spojeve (Kumar i sur., 2014).

Za odvajanje anorganskih vrsta obično se koristi stacionarna faza koja sadrži ekstrakcijske reagense različitih vrsta u organskom otapalu, dok se kao mobilna faza najčešće koriste otopine

anorganskih kiselina i njihovih soli. Mobilna faza također može sadržavati kompleksirajuća sredstva (Kumar i sur., 2014).

Vodeni dvofazni sustavi (engl. *aqueous two-phase systems*, ATPS) od posebnog su interesa za proširenje primjene CPC-a na biološke molekule kao što su peptidi, proteini i nukleinske kiseline (Bojczuk i sur., 2017).

Najčešće komponente dvofaznog sustava otapala koji se koristi za odvajanje prirodnih produkata su voda, etil acetat, metanol i heksan. Radi se o ARIZONA sustavu otapala koji pokriva široki spektar polarnosti (slika 12), što ga čini prikladnim za odvajanje raznovrsnih prirodnih produkata (Berthod i Faure, 2015). Dvofazni sustav otapala u tim se slučajevima uglavnom priprema od četiri ili tri komponente (Friesen i sur., 2015).



Slika 12. ARIZONA sustav otapala (preuzeto i prilagođeno iz [www.gilson.com](http://www.gilson.com))

Tablica 2. Opći tipovi sustava otapala s odgovarajućim skupinama ciljnih spojeva (preuzeto i prilagođeno iz Bojczuk i sur., 2017)

Tip sustava otapala	Opći sastav otapala	Primjeri pročišćenih spojeva
<b>Vodeni dvofazni sustavi (ATPS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• polietilen glikol / fosfatni pufer</li> <li>• polietilen glikol / fosfatni pufer s drugim solima</li> <li>• polietilen glikol / dekstran</li> <li>• polietilen glikol / dekstran sa solima</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proteini</li> <li>• neki peptidi</li> <li>• glikani</li> <li>• ciklodekstrini, dekstrini, šećeri</li> </ul>
<b>Hidrofilna organska otapala s vodom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• metil tert-butil eter (mtbe)/ acetonitril / voda sa solima i pufer</li> <li>• etanol / butanol / voda sa solima i puferima</li> <li>• butanol / (m)etanol / voda</li> <li>• etil acetat / (m)etanol/ voda</li> <li>• etil acetat / butanol / voda</li> <li>• mtbe / acetonitril / voda</li> <li>• etil acetat / izopropanol/ voda</li> </ul>	<p>hidrofilne komponente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• neki peptidi</li> <li>• neki glikani</li> <li>• hidrofilni metaboliti (npr. neki hormoni, hidrofilni alkaloidi)</li> <li>• fenolne kiseline (i s metalnim kompleksima)</li> <li>• glikozilirani polifenoli</li> </ul>
<b>Sustavi sa širokim rasponom polariteta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ARIZONA skala: heptan / etil acetat/ metanol / voda</li> <li>• skala bazirana na: heptan / mtbe / acetonitril / voda</li> <li>• sustavi u acetonskoj skali: heptan / aceton / voda</li> <li>• heptan /butanol/ metanol / voda</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• metaboliti srednje polarnosti (npr. steroidi, manje hidrofilni polifenoli, neki alkaloidi, manje hidrofilni ciklopeptidi)</li> <li>• amfipatske tvari (sapuni, biološki lipidi)</li> </ul>
<b>Nevodeni ili „gotovo“ nevodeni sustavi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• heptan / metanol / acetonitril</li> <li>• heptan / acetonitril / aceton</li> </ul>	<p>hidrofobne tvari:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• masti</li> <li>• masne kiseline</li> <li>• voskovi</li> <li>• karotenoidi</li> <li>• izoprenoidi</li> </ul>

Nakon utvrđivanja potencijalnih sustava otapala može se metodom protresivanja tikvice provjeriti jesu li odabrani sustav otapala prikladan za CPC metodu. Najprije se stvori sustav otapala miješanjem odgovarajućih volumnih omjera svakog otapala. Zatim se odabrana stacionarna i mobilna faza prenesu u tikvicu, doda se sirovi ekstrakt koji sadrži željeni analit te sadržaj promiješa. Potom se gornja i donja faza analiziraju metodom tankoslojne kromatografije (eng. *thin-layer chromatography*, TLC) ili HPLC metodom te se odredi  $K_D$  analita (www.gilson.com).

#### **4.1.4. Prednosti i nedostaci CPC tehnike**

Upotreba tekuće stacionarne faze bez nosača jedinstvena je u kromatografskom svijetu te donosi razne prednosti (Berthod i Faure, 2015). Nema nepovratne adsorpcije uzorka, do koje može doći prilikom kromatografije na krutoj fazi, stoga ne dolazi do gubitka uzorka te metoda ima analitički prinos (engl. *recovery*) veći od 90 %. Značajna prednost je nekorištenje silika gela, koji je sam po sebi skup i zapinje u kromatografskim kolonama što zahtjeva njihovu zamjenu, dok se CPC kolone mogu ponovno upotrijebiti ispiranjem (www.gilson.com). Ispiranjem kolone uvijek je moguć oporavak injektiranog uzorka, čak i za one sastavnice koje se zadržavaju isključivo u stacionarnoj fazi, a navedenim postupkom isključuje se i mogućnost kontaminacije kolone (Morley i Minceva, 2020). Moguće je postići visoke protoke mobilne faze u kratkom vremenu rada (Kumar i sur., 2014). CPC se smatra nježnom tehnikom, obzirom da je rizik od razgradnje osjetljivog analita nizak (Morel i sur., 2012). U usporedbi s drugim kromatografskim tehnikama, primjerice vrlo popularnom tekućinskom kromatografijom (eng. *liquid chromatography*, LC), CPC je jeftinija obzirom na manju potrošnju otapala te izostanak potrebe nabavke skupih zamjenskih kolona (Kumar i sur., 2014). Manja potrošnja otapala čini CPC kompatibilnom s kriterijima zelene kemije (Mandova i sur., 2017), a značajan je i podatak da se do 99 % otapala korištenih za CPC analizu može reciklirati (www.gilson.com). Visoka selektivnost postiže se pažljivim odabirom sustava otapala (Boonloed i sur., 2016). Centrifugalna particijska kromatografija ima sposobnost odvajanja molekula širokog raspona molarnih masa, od lijekova, pesticida, prirodnih produkata do proteina. Obzirom na velik volumen stacionarne faze, tehnika je vrlo pogodna za preparativna odjeljivanja ili pročišćavanja (Berthod i Armstrong, 1998). Također, nudi veće kapacitete za injektiranje uzorka od tradicionalnih kromatografija (www.solvscientific.com). Omogućuje izolaciju i pročišćavanje velike količine spojeva čistoće veće od 90 % u jednom koraku (Lee i sur., 2014). U usporedbi s HPLC-om, CPC troši manje

otapala po gramu čistog spoja, stoga se ova tehnika može svrstati u zelene kromatografije (Bojczuk i sur., 2017).

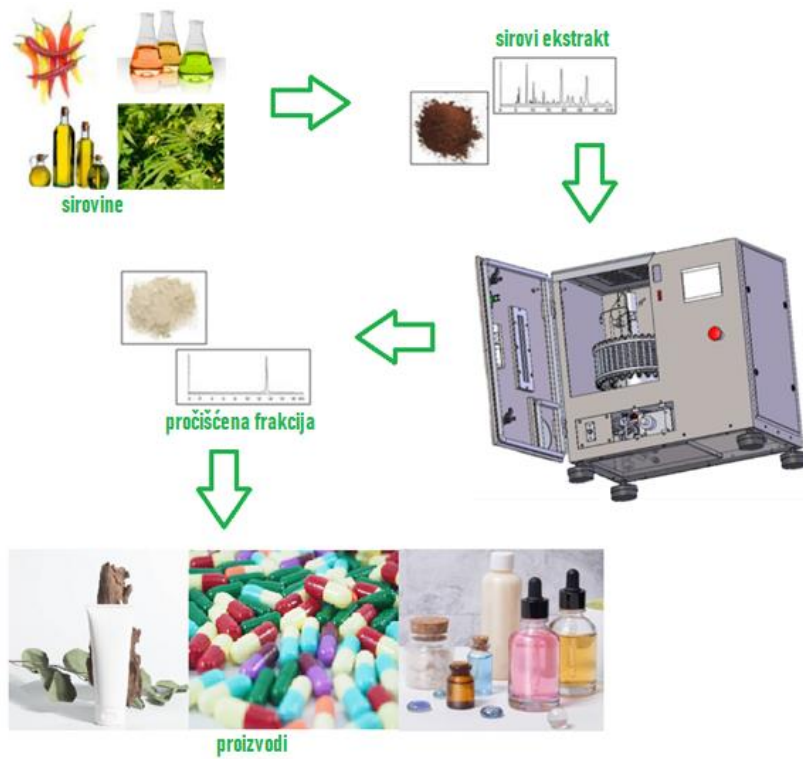
Tehnika je još uvijek relativno nova i relativno slabije korištena u usporedbi s primjerice globalno popularnim i često korištenim HPLC-om, što ujedno implicira i manju dostupnost znanstvenih i stručnih podataka. Kao značajan nedostatak ističe se i neizbježna optimizacija uvjeta za svaki novi uzorak. Određivanje najprikladnijeg sustava otapala često zahtjeva dosta vremena (Bojczuk i sur., 2017). Gradijentna elucije nije toliko jednostavna, kao što je to slučaj u HPLC-u, obzirom da bilo kakve promjene u sastavu mobilne faze dovode i do promjene stacionarne faze (Destandav i sur., 2015).

#### **4.2. Mogućnost primjene CPC tehnike u području prirodnih produkata**

Centrifugalna particijska kromatografija je tehnika pročišćavanja farmaceutskih i prirodnih produkata, koja svoju primjenu uspješno nalazi ne samo na laboratorijskoj razini već i u pilot proizvodnji, a nedavno je dosegla i rješenja u industrijskim razmjerima. Ova preparativna kromatografska tehnika obećavajuća je alternativa klasičnim tehnikama pročišćavanja kao što su preparativna HPLC ili *flash* kromatografija. Može se koristiti za pročišćavanje molekula dobivenih iz prirodnih ekstrakata, sintetičkih smjesa ili bioloških matrica (tablica 2), kao i za frakcioniranje ili predfrakcioniranje vrlo složenih ekstrakata (Bojczuk i sur., 2017). Pruža mogućnost proizvodnje obogaćenih ekstrakata i čistih molekula koje se mogu koristiti u raznim istraživanjima ili u industrijskoj proizvodnji (slika 13).

CPC se pokazala vrlo učinkovitom tehnikom za frakcioniranje, izolaciju i pročišćavanje bioaktivnih prirodnih produkata iz biljnih sirovina. Jedna od prednosti njene primjene u izolaciji bioaktivnih biljnih sastavnica proizlazi iz činjenice da su one često u biljnim sirovinama prisutne u vrlo malim količinama te se zbog nepovratne adsorpcije kod tradicionalnih kromatografija mogu izgubiti. Kod CPC tehnike to nije slučaj, obzirom da je teorijski moguće doći do sastavnica injektiranog uzorka bez gubitaka (Yoon i sur., 2010). Centrifugalna particijska kromatografija dosad je uspješno korištena u izolaciji i pročišćavanju različitih skupina biljnih sastavnica, kao što su fenoli, lignani, kumarini, antocijani, flavonoidi, stilbeni, ksantoni, monoterpeni, seskviterpeni, saponini, alkaloidi i pigmenti (Yoon i sur., 2010). U daljnjem tekstu bit će prikazana odabrana istraživanja koja potvrđuju široke mogućnosti i perspektive primjenjuje centrifugalnu particijsku kromatografiju u izolaciji bioaktivnih prirodnih produkata.





Slika 13. Mogućnosti primjene CPC sustava

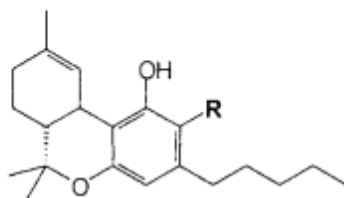
#### 4.2.1. Izolacija kanabinoida iz *Cannabis sativa* primjenom CPC tehnike

U novije vrijeme raste interes za fitopreparate i farmakološki aktivne sastavnice medicinske konoplje, *Cannabis sativa* L. Biljka producira oko 120 fitokanabinoida koji su u svježem materijalu uglavnom prisutni u obliku soli karboksilne kiseline, tj. kao kiseli kanabinoidi (Popp i sur., 2019; Hazekamp i sur., 2004). Kiseli kanabinoidi poznati su kao biogenetski prekursori odgovarajućih neutralnih kanabinoida. U prisustvu topline dekarboksilacijom kiselih kanabinoida nastaju neutralni kanabinoidi (Popp i sur., 2019). Glavni neutralni kanabinoidi su  $\Delta^9$  – tetrahidrokanabinol (THC) i kanabidiol (CBD). Poznato je da ova dva fitokanabinoida najpotentnija i da svoje farmakološko djelovanje ostvaruju preko dva tipa endokanabinoidnih receptora. Endokanabinoidni receptori tipa 1 (CB1) nalaze se u središnjem živčanom sustavu, odnosu u područjima odgovornima za pamćenje, koncentraciju, raspoloženje, bol, koordinaciju pokreta i apetit, dok su endokanabinoidni receptori tipa 2 (CB2) uglavnom vezani za stanice imunosnog sustava. Ekstrakti medicinske konoplje indicirani su za primjenu kod malignih bolesti, multiple skleroze, Dravetovog sindroma te u liječenju kaheksije/anoreksije u HIV/AIDS bolesnika (Duraković, 2016).

Hazenkamp i suradnici su 2004. godine predstavili jednostavnu metodu za preparativnu izolaciju 7 glavnih kanabinoida iz biljnog materijala *Cannabis sativa* L. Primjenom CPC metode uz dva različita dvofazna sustava otapala dobili su pročišćene uzorke kanabinoida prikazanih na slici 14.

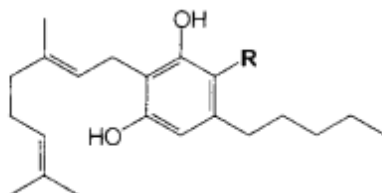
Kao početni biljni materijal za izolaciju kanabinoida korišteni su cvatući vršne dijelove ženske biljke sorte SIMM02 i sorte Kompolti, prethodno osušeni na zraku u mraku pri sobnoj temperaturi i vlažnosti tijekom 4 tjedna. Osušeni vršni dijelovi sorte SIMM02 (50 grama) i sorte Kompolti (100 grama) ekstrahirani su tri puta maceracijom s 1,25 l n – heksana nekoliko sati. N – heksan odabran je kao otapalo za ekstrakciju jer lako isprava, relativno je netoksičan i ne ekstrahira klorofil. Svaka ekstrakcija započela je s pet-minutnom primjenom ultrazvuka. Na kraju su sva tri ekstrakta sjedinjena i filtrirana preko staklenog filtra.

Stakleni filer (veličina mreže 2 mm) promjera oko 5 cm i visine 7 cm napunjen je do 2/3 s morskim pijeskom prethodno ispranim kiselinom te potom prekriven staklenim perlama (promjer  $\pm 1$  mm). Prije upotrebe pijesak je uzastopno ispiran s 200 ml heksana, etanola i vode. Ekstrakt dobiven maceracijom stavljen je kap po kap na pijesak u filtru i isparen pomoću puhalo na vrući



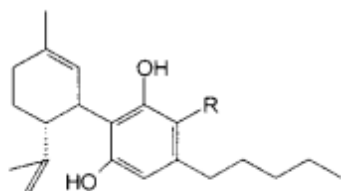
R=H  $\Delta^9$  – tetrahidrokanabinol (THC)

R=COOH  $\Delta^9$  – tetrahidrokanabinolna kiselina A (THCA)



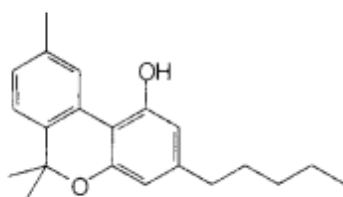
R=H Kanabigerol (CBG)

R=COOH Kanabigerolna kiselina (CBGA)



R=H Kanabidiol (CBD)

R=COOH Kanabidiolna kiselina (CBDA)



Kanabinol (CBN)

Slika 14. Kemijske strukture kanabinoida

(preuzeto i prilagođeno iz Hazekamp i sur., 2004)

zrak. Zatim je filter spojen na odsisni Erlenmeyer, a kiseli kanabinoidi su eluirani ispiranjem pješčanog filtra s 0,1 M otopinom NaOH pod vakuumom. Postupak je nastavljen sve dok eluat nije promijenio boju iz tamno narančaste u svijetlu. Neutralni kanabinoidi i druge sastavnice su zatim eluirane etanolom (200 ml), a onda heksanom (200 ml). Kiseli kanabinoidi taloženi su u

vodenom eluatu dodavanjem HCl dok pH nije dosegao vrijednost 2, a potom filtrirani kroz pješčani filter. Talog koji je zaostao na filtru eluiran je etanolom (200 ml). Neutralne i kisele kanabinoidne frakcije koncentrirane su u malom volumenu isparavanjem pod sniženim tlakom i podvrgnute GC i HPLC analizama. Dobivena kisela frakcija kanabinoida bila je poželjniji materijal za izolaciju kanabinoida jer ne sadrži interferirajuće komponente poput lipida i terpenoida.

Korišteni su Sanki (Kyoto, Japan) centrifugalni particijski kromatograf (tip LLB-M) spojen na Shimadzu LC-10Advp pumpu, Rheodyne (Cotati, CA) ručni injektor i Pharmacia (Roosendaal, Nizozemska) FRAC-100 sakupljač frakcija. Tlak je bio ograničen na 100 bara.

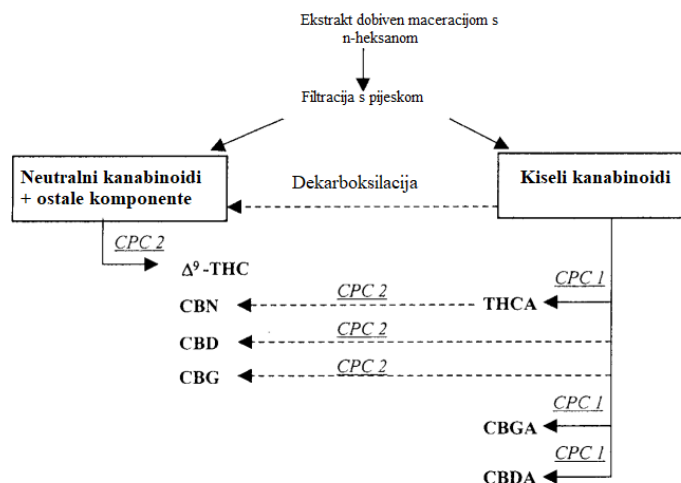
Za izolaciju kiselih kanabinoida Hazekamp i suradnici (2004) koristili su dvofazni sustav otapala heksan/metanol/voda 5:3:2 (V/V/V, sustav otapala 1). Vodena faza sustava otapala zakiseljena je s 25 mM mravlje kiseline. Tijekom CPC postupka omjer metanol/voda mobilne faze se linearno povećavao s 3:2 na približno 4,5:0,5 dodavanjem metanola u svrhu bržeg ispiranja zadržanih spojeva. Korišten je silazni način rada, a heksan je bio stacionarna faza. Brzina protoka mobilne faze bila je 4 ml/min, a brzina rotacije 500 okr./min. Volumen stacionarne faze nakon uspostave ravnoteže među fazama iznosio je 70 ml.

Uzorak (2,5 grama kisele frakcije kanabinoida SIMM02) otopljen je u heksanu do konačnog volumena 5 ml za injektiranje. Sakupljane su frakcije od 10 ml te ih je sakupljeno 50. Frakcije su analizirane metodom TLC-a, a odabrane frakcije su dalje analizirane HPLC metodom. Frakcije s udjelom pojedinačnog kanabinoida (THCA ili CBGA) većim od 90 % spojene su i uparene do suha. Konačan uzorak otopljen je u 5 ml etanola i pohranjen na -20 °C radi kvalitativne analize. CBDA izolirana je iz kisele frakcije kanabinoida Kompolti na isti način kao i THCA i CBGA.

Izolaciju neutralnih kanabinoida proveli su koristeći drugi dvofazni sustav otapala. Za izolaciju CBN korišteno je 600 mg prethodno izolirane THCA koja je dekarboksilirana zagrijavanjem. Uzorak je stavljen u otvorenu staklenu bočicu otpornu na toplinu i etanol je uparen u struji dušika. Bočica je nakon toga ostavljena preko noći u pećnici zagrijanoj na 135 °C. Boja ekstrakta tijekom zagrijavanja je znatno potamnila. HPLC analizom potvrđena je potpuna dekarboksilacija THCA. Smjesa koja se sastojala od CBN-a,  $\Delta^9$ -THC-a i  $\Delta^8$ -THC-a frakcionirana je primjenom CPC instrumenta. Za izolaciju CBD-a korištena je kisela frakcija kanabinoida Kompolti. Nakon

uparavanja otapala, 600 mg uzorka zagrijano je 10 minuta u otvorenoj staklenoj posudi. Potpuna dekarboksilacija CBDA potvrđena je HPLC nalizom. Dobivena smjesa CBD-a i manjih količina ostalih neutralnih kanabinoida frakcionirana je pomoću CPC instrumenta. Izolacija CBG-a provedena je istim postupkom koristeći 1 g kisele frakcije kanabinoida SIMM02. Izolacija  $\Delta^9$ -THC izvedena je i iz neutralne frakcije kanabinoida SIMM02.

Frakcioniranje neutralnih kanabinoida CPC-om provedeno je korištenjem dvofaznog sustava otapala heksan/aceton/acetonitril/ 5:2:3 (V/V/V, sustav otapala 2). Uređaj je radio u uzlaznom načinu, a heksan je bio mobilna faza. Brzina protoka mobilne faze bila je 5 ml/min, a brzina rotacije 600 okr./min. Volumen stacionarne faze nakon uspostave ravnoteže među fazama iznosio je 65 ml. Uzorak je otopljen u heksanu do konačnog volumena 5 ml i injektiran. Sakupljane je 50 frakcija od po 10 ml. Svaka frakcija analizirana je TLC metodom, a odabrane frakcije dalje su analizirane HPLC metodom. Frakcije koje su sadržavale visoki udio željenog spoja (> 90 %) su spojene i uparene pod sniženim tlakom. Konačan uzorak je otopljen u 5 ml etanola i čuvan na -20 °C u svrhu kvalitativne analize.



Slika 15. Shematski pregled izolacije kanabinoida (preuzeto i prilagođeno iz Hazekamp i sur., 2004)

Hazekamp i suradnici su identitet izoliranih kanabinoida potvrdili usporedbom vremena zadržavanja (HPLC i GC) i spektroskopskih podataka (UV, MS) s referentnim spojevima i podacima iz literature. Čistoća kanabinoida određena je primjenom GC-FID metode (engl. *gas chromatography with flame ionization detection*) i prikazana u tablici 3.

Tablica 3. Izolirani kanabinoidi i njihova čistoća (preuzeto i prilagođeno iz Hazekamp i sur., 2004)

Izolirani kanbinoid	Izolirano u studiji (mg)	Čistoća (%)
1. $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC)	90,0	93,1
2. $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinolna kiselina A (THCA)	1590	94,0
3. Kanabidiol (CBD)	232	92,7
4. Kanabidiolna kiselina (CBDA)	326	90,2
5. Kanabigerol (CBG)	40,3	92,2
6. Kanabigerolna kiselina (CBGA)	37,9	92,9
7. Kanabinol (CBN)	99,4	95,0

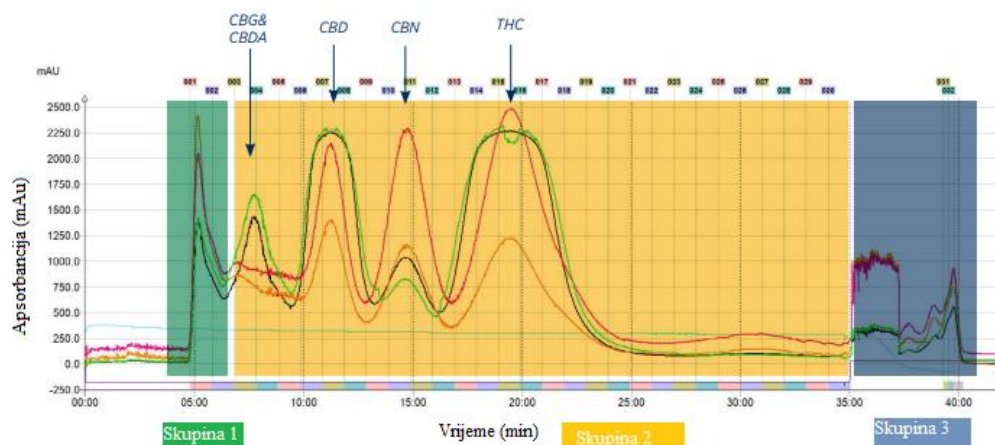
Primjenom CPC sustava kao jedinstvene tehnike s dva različita dvofazna sustava otapala uspješno je izolirano sedam kanabinoida visoke čistoće (> 90 %). Izolirani kanabinoidi prikladni su za korištenje kao standardi u postupcima kvantifikacije ili kao referentni spojevi u biološkim i farmakološkim istraživanjima.

CPC je već ranije prepoznata kao metoda izbora za dobivanje kanabidiola (CBD) i tetrahidrokanabinola (THC) visoke čistoće za tržišta lijekova i dodataka prehrani. S razvojem tržišta kanabinoida, fokus se seli i na ostale kanabinoide poput kanabigerola (CBG), kanabinola (CBN), kanabihromena (CBC), kanabihromevarina (CBCV) i kanabidivarina (CBDV).

Audo i suradnici su 2021. godine objavili članak o pročišćavanju THC-a, CBD-a, CBG-a, CBN-a i manje zastupljenih kanabinoida u jednom koraku primjenom CPC metode. U svom istraživanju koristili su Gilson VERITY® CPC Lab sustav sastavljen od CPC 250 i PLC 2050 instrumenata konfiguriranih s kvaternarnom gradijentnom pumpom protoka 50 ml/min, UV/Vis detektorom i sakupljačem frakcija. Potonja analiza provedena je metodom tekućinske kromatografije korištenjem UPLC – Thermo Fisher sistema konfiguriranog s PDA detektorom (200 – 800 nm). Kao uzorak korišteno je 100 mg sirovog ekstrakta dobivenog od osušenog biljnog materijala *Cannabis sativa* L. Korišten je postupak elucija – ekstruzija. Brzina protoka elucije bila je 12 ml/min, brzina ekstruzijskog protoka bila je 50 ml/min, a brzina rotacije 2000 okr./min.

Ekstruzija je započela nakon 35 minuta eluacije. Detekcija je provedena na 220 nm, 263nm i 280 nm te skeniranje 200 – 400 nm.

Odvajanje sirovog ekstrakta rezultiralo je frakcioniranjem uzorka u jednom koraku, a na kromatogramu prikazanom na slici 16. razlikuju se 3 skupine spojeva.



Slika 16. CPC kromatogram (preuzeto i prilagođeno iz Audo i sur., 2021)

Skupina 1 predstavlja smjesu polarnih spojeva, skupina 2 je podijeljena na podfrakcije čistih kanabinoida: THC, CBN, CBD i smjesu kanabinoida, dok se skupina 3 odnosi na smjesu nepolarnih spojeva. Podfrakcije iz skupine 2 analizirane su HPLC metodom u svrhu određivanja čistoće kanabinoida, koja je prikazana u tablici 4.

Dodatno, manje zastupljeni kanabinoidi obogaćeni su u ovom CPC ciklusu. Mogućim dodatnim pročišćavanjem frakcija F3, F6, F11 i F15 postigla bi se veća čistoća manje zastupljenih kanabinoida (CBG, CBDV, CBCV i CBC).

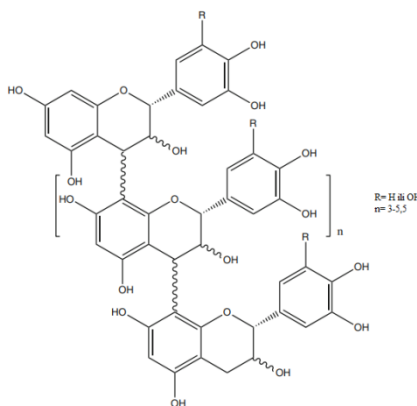
Tablica 4. Izolirani kanabinoidi i njihova čistoća (preuzeto i prilagođeno iz Audo i sur., 2021)

Frakcija	Izolirani kanabinoidi	Čistoća (%)
F3	CBG/CBDA	53,9/3,09
F6	CBD/CBDV	95,3/3,1
F7	CBD	100
F11	CBN/CBCV	90/1,2
F15	THC/CBC	98,9/0,4

Objavljeni članak dokazuje da se primjenom CPC metode u jednom koraku mogu izolirati tri kanabinoida čistoće od 90 % do 100 % (CBD, THC i CBN) uz istovremeno obogaćivanje ostalih kanabinoida prisutnih u ekstraktu (CBG, CBDV, CBCV i CBC).

#### 4.2.2. Pročišćavanje proantocijanidina iz biljne vrste *Vitis vinifera* primjenom CPC metode

Proantocijanidini (PAC) nalaze široku primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Karakterizira ih izraženo antioksidativno i protuupalno djelovanje (Phansalkar i sur., 2018). Krofelemer je oligomerni proantocijanidin (slika 17) izoliran iz lateksa kore vrste *Croton lechleri* L., a koristi se za ublažavanje simptoma neinfektivnog proljeva u odraslih pacijenata s HIV/AIDS-om (Frampton, 2013).

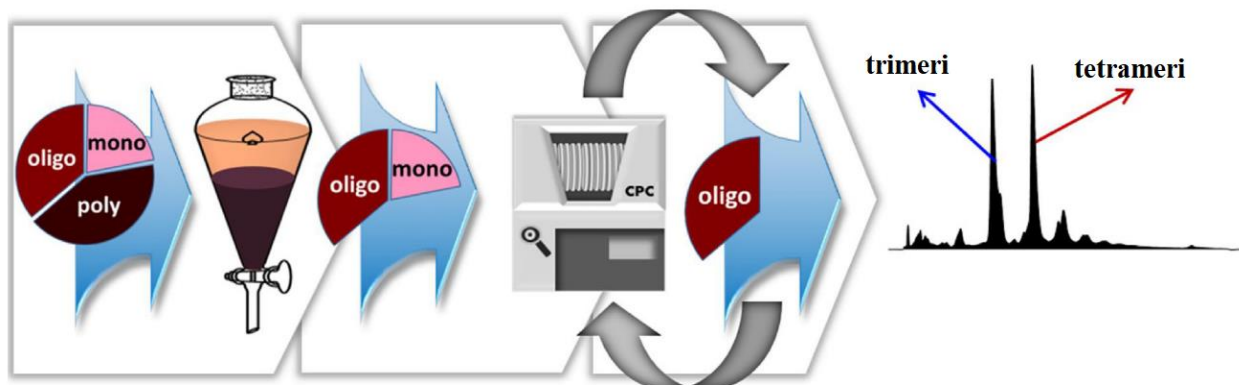


Slika 17. Kemijska struktura krofelemera (preuzeto i prilagođeno iz Frampton, 2013)

Phansalkar i suradnici su 2018. godine primijenili DESIGNER pristup (engl. *depletion and enrichment of select ingredients generating normalized extract resources*) za selektivno



obogaćivanje trimernih i tetramernih PAC-a pomoću centrifugalne particijske kromatografije s ciljem razvoja biomaterijala na temelju PAC-a za primjenu u obnavljanju i popravku tvrdog zubnog tkiva. Opća shema DESIGNER pristupa prikazana je na slici 18., a započinje iscrpljivanjem polimernih PAC, potom slijedi uklanjanje monomernih flavan-3-ola te na kraju obogaćivanje trimernih i tetramernih PAC frakcija. Kromatogrami dobiveni nakon svakog koraka prikazani su na slici 19.



Slika 18. Opća shema DESIGNER pristupa (preuzeto i prilagođeno iz Phansalkar i sur., 2018)

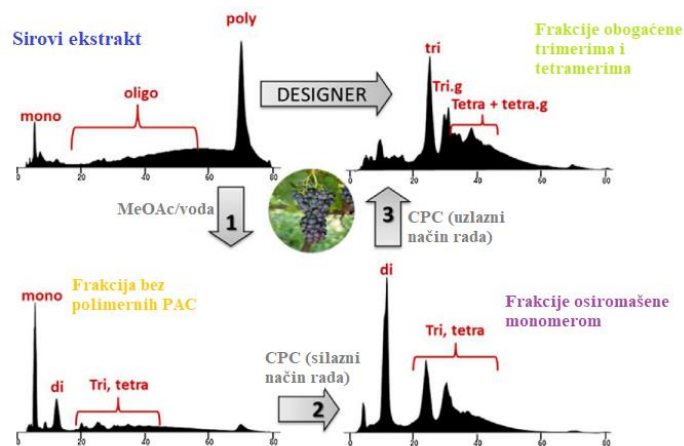
DESIGNER pristup su Phansalkar i suradnici uspješno primijenili na četiri biljna izvora bogata fenolima (sjemenke grožđa, kora kineskog crvenog bora, kora cimeta i sjemenke kakaovca), a u nastavku je prikazan postupak za sjemenke grožđa.

Odvajanje sastavnica ekstrakta sjemenki grožđa pomoću HSCCC metode daje relativno slabu rezoluciju dimera i dovodi do koelucije svih oligomera, stoga su se Phansalkar i suradnici odlučili za CPC metodu. Istraživanje je provedeno na doniranom uzorku Polyphenolics Mega Natural Gold Grape Seed Extrat (Kalifornija, SAD), korištenjem CPC instrumenta SCPC 250 – B (Armen Instrument Gilson Inc., SAS, Francuska). Brzina protoka mobilne faze bila je 35 ml/min, a brzina rotacije 2500 okr./min. CPC odvajanja izvedena su na sobnoj temperaturi bez dodatne kontrole temperature, a za praćenje frakcija korištena je analitička HPLC kolona.

U prvom koraku sirovi ekstrakt sjemenki grožđa razdijeljen je između metil acetata i vode kako bi se postiglo odvajanje polimernih PAC, čime je dobivena frakcija bez polimernih PAC koja je podvrgnuta odjeljivanju na CPC instrumentu. Korišten je dvofazni sustav otapala koji se sastojao od heksana, etil acetata, metil acetata i vode (HEMaWat) 0,8:4:1:4 (V/V/V/V). Uređaj je radio u

silaznom načinu rada te je zadržavanje stacionarne faze prije injekcije uzorka iznosilo 80 %. Svrha drugog koraka CPC postupka bila je dobiti frakcije osiromašene monomerom. Dobivene frakcije su u trećem koraku ponovno bile podvrgnute CPC odjeljivanju kako bi se iscrpili dimerni PAC te dobile frakcije obogaćene trimerima i tetramerima. Za ovaj korak korišteni dvofazni sustav otapala bio je HEMaWat u volumni omjerima 0,4:4:1:4. Uređaj je radio u uzlaznom načinu rada te je zadržavanje stacionarne faze prije injekcije uzorka iznosilo 76 %.

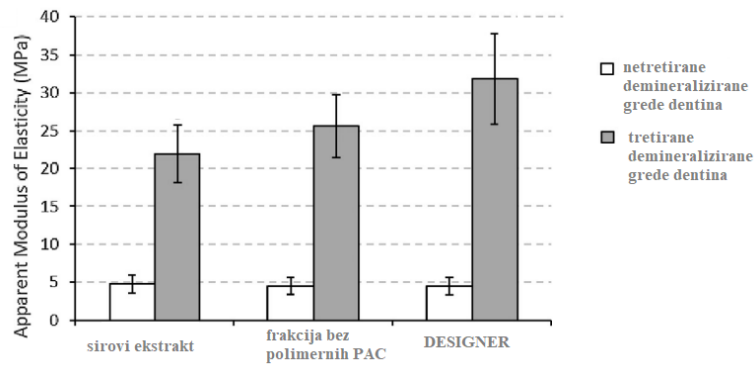
Ključni korak u razvoj CPC metode je izbor dvofaznog sustava otapala. Phansalkar i suradnici su u užu izbor potencijalnih sustava otapala uvrstili sustave etil acetat/metil acetat/voda 3:2:4 (EmaWat), HEMaWat 0,4:4:1:4 te HEMaWat 0,8:4:1:4. Navedeni sustavi su procijenjeni pokusima razdijele i TLC-om. Oligomerni PAC su spojevi koji zahtijevaju dvofazne sustave otapala visokog polariteta. U ekstraktu sjemenki grožđa prisutni su i galoilirani PAC zbog čega je i metanol iz klasičnih HEMWat sustava zamijenjen s metil acetatom kako bi se osiguralo bolje odvajanje.



Slika 19. Kromatogrami dobiveni u svakom koraku pročišćavanja (preuzeto i prilagođeno iz Phansalkar i sur., 2018)

Biološka evaluacija dobivenih frakcija obogaćenih trimerima i tetramerima provedena je s obzirom na biomehanička svojstva dentina. Dio dentina ljudskih kutnjaka izrezan je u tanke grede dimenzija 1,7 mm x 0,5 mm x 6,0 mm koje su demineralizirane fosfornom kiselinom. Zatim je slijedio tretman dentina sa sirovim ekstraktom i frakcijama dobivenim u svakom koraku. Modul elastičnosti (mjera mehaničke čvrstoće) procijenjen je prije i nakon tretmana i uspoređen s kontrolom (dentin bez tretmana). Slika 20 pokazuje da se biomehanička aktivnost dentina

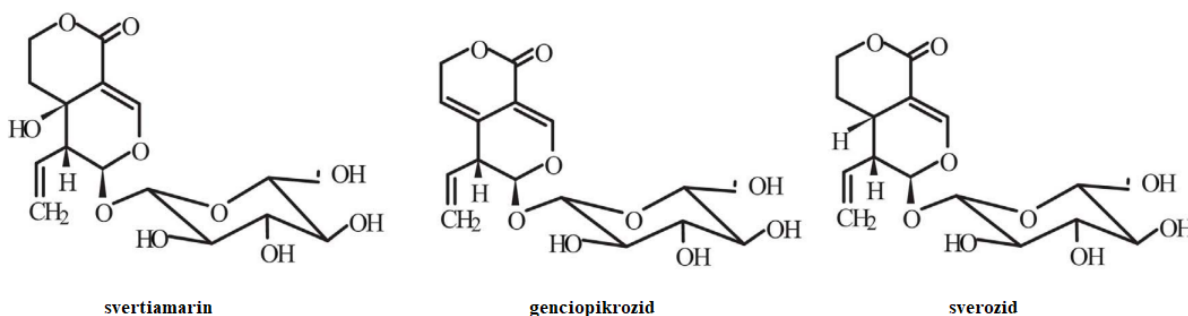
(mjerena u smislu povećanja modula elastičnosti) postupno povećava tretiranjem frakcijama dobivenim sa svakim idućim korakom pročišćavanja. Phansalkar i suradnici pokazali su da CPC može biti vrlo učinkovita metoda za dobivanje frakcija obogaćenih trimetnih i tetramernih PAC, odnosno proizvodnju dentalnih biomaterijala.



Slika 20. Podaci mehaničkog biotestiranja dentina (preuzeto i prilagođeno iz Phansalkar i sur., 2018)

#### 4.2.3. Pročišćavanje sekoiridoidnog glikozida svertiamarina iz *Centaurium erythraea* centrifugalnom particijskom kromatografijom – usporedba dvaju različitih CPC uređaja

*Centaurium erythraea* Rafn. je zeljasta biljka iz porodice Gentianaceae čiji se nadzemni dijelovi koriste u narodnoj medicini za liječenje gastrointestinalnih tegoba uključujući i privremeni gubitak apetita (El Menyiy i sur., 2021). Osim korištenja u medicinske svrhe, navedena biljka predstavlja sirovinu u proizvodnji alkoholnih i bezalkoholnih pića s gorkim toničnim svojstvima, uglavnom radi prisutnosti sekoiridoidnih glikozida čije su strukture prikazane na slici 21. (Mandova i sur., 2017).



Slika 21. Kemijske strukture sekoiridoidnih glikozida prisutnih u *Centaurium erythraea* Rafn. (preuzeto i prilagođeno iz Mandova i sur., 2017)

Mandova i suradnici su 2017. godine primjenili CPC metodu u svrhu pročišćavanja svertiamarina iz metanolnog ekstrakta nadzemnih dijelova vrste *Centaurium erythraea*, koristeći pritom dva različita uređaja kako bi usporedili njihove parametre.

Biljna droga *Centaurii herba* nabavljena je u Francuskoj u specijaliziranoj biljnoj ljekarni. Biljni materijal (100 g) maceriran je u 1 l metanola kroz 24 sata. Nakon filtracije i uparavanja dobiveno je 15,8 g sirovog ekstrakta. HPLC-DAD-MS analiza metanolnog ekstrakta potvrdila je prisutnost svertiamarina, genciopikrozida i sverozida. Kvantitativna analiza sirovog ekstrakta pokazala je da svertiamarin čini 75,9 mg/g te su ga Mandova i suradnici odredili kao spoj od interesa, dok genciopikrozid i sverozid nisu kvantitativno određeni.

Korišteni su CPC uređaji Spot CPC 250 (SCPC) s ugrađenom kvartarnom visokotlačnom gradijentnom pumpom i 1953 ovalnih *Twin* ćelija (Armen instrument, Francuska) i Quantum CPC 250 (QCPC) (Armen instrument, Francuska) s 196 sfernih ćelija ukupnog volumena 250 ml, volumena kanala 11 ml, s kolonom ukupna volumena 261 ml. Maksimalna brzina rotacije

iznosila je 4000 okr./min. CPC uređaji spojeni su na PLC prepHPLC sistem (Gilson) opremljen s pumpom koja daje brzinu protoka 250 ml/min, PDA UV-Vis detektor (200-600 nm) i sakupljač frakcija. Usporedba korištenih CPC uređaja dana je u tablici 5.

Dvofazni sustav otapala za CPC odabran je prema procijeni koeficijenta distribucije ( $K_D$ ) pokusom protresanja tikvice. Smjese otapala pripremljene su u epruvetama, epruvete su protresene i ostavljene dok se nije postigla ravnoteža među fazama. Zatim je u svaku epruvetu dodano 1,0-1,5 mg metanolnog ekstrakta *Centaurii herba* te su epruvete potresene. Nakon razdvajanja dviju faza, gornje faze su prebačene u druge epruvete. Uzeto je 10  $\mu$ l svake faze te je nanoseno na TLC ploču. Na kraju je između raznih kombinacija sustava otapala odabran sustav EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O 7,5:3:5 (V/V/V).

CPC postupak započeo je punjenjem rotora sa stacionarnom fazom pri brzini protoka 20 ml/min za SCPC te 40 ml/min za QCPC te brzini rotacije 500 okr./min. Uređaji su radili u uzlaznom načinu rada. Zatim je brzina rotacije povećana na 1600 okr./min za SCPC i 3000 okr./min za QCPC. Kolona je pinjena mobilnom fazom pri brzini protoka 20 ml/min za SCPC i 40 ml/min za QCPC. Kod izokratnog načina rada mobilna faza je gornja faza odabranog sustava otapala, dok se kod gradijentnog načina rada na početku kao mobilna faza pumpa čisti etil acetat, a nakon toga se postupno doseže 100%-tna gornja faza odabranog sustava otapala kao mobilna faza. Uzet je 1 g metanolnog ekstrakta *Centaurii herba* i otopljen u 10 ml smjese 1:1 (V/V) obje faze odabranog sustava otapala. Uzorak je injektiran kroz injekcijsku petlju volumena 20 ml, preostali volumen petlje činila je mobilna faza. Prikupljane su frakcije volumena 20 ml.

TLC analiza frakcija dobivenih s SCPC uređajem u izokratnom načinu rada pokazala je dvije frakcije bogate svertiamarinom, navedene frakcije kvantificirane su pomoću HPLC-DAD. Kao glavna nečistoća, pomoću HPLC-DAD-MS, identificiran je sverozid. Nisu identificirani ksantoni, što potvrđuje da su smjese otapala sastavljene od vode, etil acetata i alkohola kratkih lanaca prikladne za pročišćavanje polarnih ekstrakata i izolaciju glikozida. SCPC uređaj u gradijentnom načinu rada također je dao frakciju obogaćenu sa svertiamarinom.

TLC analiza frakcija dobivenih s QCPC uređajem u izokratnom načinu rada pokazala je tri frakcije bogate svertiamarinom. Dobivene frakcije su analizirane HPLC-om. Gradijentnim načinom rada QCPC dobivena je frakcija obogaćena s ciljnim spojem. TLC analizom otkriveno

je onečišćenje, a pomoću  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara otkriveno je da se radi o sekologanin dimetilacetalu, za koji se smatra da je nastao za vrijeme maceracije metanolom. Također je dobivena i frakcija koja sadrži sverozid, što je potvrđeno TLC i  $^1\text{H}$  NMR analizom.

Tablica 5. Usporedba parametara SCPC i QCPC uređaja (preuzeto i prilagođeno iz Mandova i sur., 2017)

	SCPC izokratni način rada	SCPC gradijentni način rada	QCPC izokratni način rada	QCPC gradijentni način rada
<b>Potrošnja gornje faze</b>	510 ml (105 ml uravnotežavanje sustava + 405 ml)	1103 ml (85 ml EtOAc + 270 ml EtOAc + 200ml EtOAc (gradijent) + 200 ml gornje faze odabranog sustava otapala (gradijent) + 350 ml gornje faze odabranog sustava otapala)	699 ml (99 ml uravnotežavanje sustava + 600 ml)	1195 ml (175 ml EtOAc uravnotežavanje sustava + 270 ml EtOAc + 200ml EtOAc (gradijent) + 200 ml gornje faze odabranog sustava otapala (gradijent) + 350 ml gornje faze odabranog sustava otapala)
<b>Potošnja donje faze</b>	250 ml (punjenje rotora)	250 ml (punjenje rotora)	261 ml (punjenje rotora)	261 ml (punjenje rotora)
<b>Ukupno vrijeme odvajanja</b>	27 min	51 min	15 min	27 min
<b>Brzina protoka mobilne faze</b>	15 ml/min	20 ml/min	40 ml/min	40 ml/min
<b>Masa i čistoća izoliranog svertiamarina</b>	64 mg, 68,8 %	72 mg, 77,0 %	67 mg, 66,5 %	86 mg, 48,9 %
<b>Zadržavanje stacionarne faze</b>	58 %	67 %	62 %	30 %

Dizajn QCPC omogućuje veće brzine protoka mobilne faze, stoga je i ukupno vrijeme potrebno za odvajanje sastavnica kraće u odnosu na SCPC. Gradijentan način rada SCPC uređaja omogućio je dobivanje svertiamarina veće čistoće nego SPCPC koji je radio u izokratnom načinu. Gradijentan način rada QCPC uređaja dao je svertiamarin manje čistoće nego QCPC koji

je radio u izokratnom načinu, ali je, osim ciljanog spoja svertiamarina, postigao odvajanje sekologanin dimetilacetala i sverozida.

Čistoće obogaćenih frakcija su niže od 90 %, a zadržavanje stacionarne faze manje je od 70 %. Mandova i suradnici su pokazali da je CPC pogodna metoda za izolaciju prirodnih proizvoda iz polarnog ekstrakta, no potrebno je optimizirati uvjete CPC sustava (dalje razvijati metodu) kako bi se postiglo bolje zadržavanje stacionarne faze, što onda omogućuje bolje odvajanje sastavnica.

#### 4.2.4. Ostali primjeri primjene CPC tehnike u izolaciji i pročišćavanju prirodnih produkata

Centrifugalna particijska kromatografija je metoda preparativne kromatografije koja je do sada korištena za pročišćavanje i izolaciju širokog spektra bioaktivnih prirodnih produkata. U tablici 6. su sažeto prikazani odabrani primjeri iz proučene literature. Vidljivo je da je najčešće korišteni sustav otapala heksan/etil acetat/metanol/voda jer se može koristiti za širok raspon polarnosti ciljanih spojeva. Pri izboru odgovarajućeg sustava otapala provedena su preliminarna ispitivanja tako što se uzorak stavio u epruvetu s potencijalnim sustavom otapala te se epruveta protresla. Nakon odvajanja gornje i donje faze analizirana je koncentracija ciljnog spoja u svakoj od faza kako bi se ustvrdilo je li  $K_D$  ciljnog spoja prikladan. Razvoj dvofaznog sustava otapala za odvajanje ksilindeina bio je posebno izazovan za Boonloeda i njegove suradnike (2016), obzirom da taj pigment pokazuje nisku topljivost i u vodenim sustavima i u najčešćim organskim otapalima što je i glavna prepreka u analizi toga spoja. Topljivost ksilindeina ispitana je u različitim čistim otapalima kako bi se došlo do osnovnog skupa komponenti za sastavljanje dvofaznog sustava otapala. Utvrdilo se da heptan i voda određuju gornju i donju granicu hidrofobnosti. Tetrahidrofuran (THF) i MEK (metiletilketon) su izabrani radni njihove sposobnosti otapanja ksilindeina i miješanja s heptanom, a acetonitril i octena kiselina su dodani radi miješanja s vodom. Ta dodana otapala osigurala su poboljšanu topljivost ksilindeina i u organskoj i u vodenoj fazi te je  $K_D$  ksilindeina za navedeni sustav otapala bilo blizu 1, što je omogućilo pročišćavanje navedenog pigmenta CPC-om.

Niti jedan od CPC postupaka navedenih u tablici 6 nije trajao duže od 200 min, a izolacija O-tigloiciklorobukseina- B postignuta je u 2 CPC koraka u roku 15 minuta. Gotovo sve dobivene sastavnice od interesa bile su čistoće veće od 90 %, što ih čini pogodnima za korištenje u daljnjim istraživanjima.

U posljednja tri primjera iz tablice 6, CPC je bio suspregnut s ESI (engl. *electrospray ionization*) masenom spektrometrijom. Navedeno je korišteno za optimizaciju parametara razdjeljivanja te za istovremenu identifikaciju ciljnih spojeva. Time se kombiniraju prednosti CPC-a kao što je velika moć razdjeljivanja i prednosti MS u detekciji ciljnih spojeva.



Tablica 6. Primjeri izolacije i pročišćavanja odabranih bioaktivnih spojeva centrifugalnom particijskom kromatografijom

Sastavnice od interesa	Skupina spojeva	Prirodni izvor	Sustav otapala	Brzina protoka mobilne faze i brzina rotacije	Način rada	CPC uređaj	Autori
O-tigloiciklorobuksein-B (čistoća 91,1 %)	alkaloid	list vrste <i>Buxus sempervirens</i> (Buxaceae)	heksan/EtOAc/MeOH/voda (7:3:7:3) heksan/CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10:7:3)	3 ml/min 1200 okr./min 2,5 ml/min 1300 okr./min	uzlazni	CPC 250 (Glison)	Szabo i Schmidt, 2020
Dakrihainansteron (čistoća 93 %) Kalonisteron (čistoća 96%)	fitoekdisteroidei	korijen vrste <i>Cyanotis arachnoidea</i> (Commelinaceae)	n-heksan/ EtOAc/MeOH/voda (1:5:1:5)	10 ml/min 2400 okr./min	uzlazni	SCPC 250 (Armen Instrument)	Issaadi i sur., 2017
Ksilindein	pigment	gljive <i>Chlorociboria aeruginosa</i> (Chlorociboriaceae)	heptan/THF/MEK/acetonitril/octena kiselina/voda (2:5:2:2:0,1:2)	2 ml/min 1800 okr./min	uzlazni	FCPC 50 (Kromaton Technologies)	Boonloed i sur., 2016
Mangiferin (čistoća 96 %)	glukozil kasnton	podanak vrste <i>Anemarrhena asphodeloides</i> (Asparagaceae)	etil acetat/isopropanol/voda (3:2:5)	2 ml/min 1000 okr./min	silazni	CPC LLB-M volumen 230ml (Sanki Engineering Ltd.)	Kim i sur., 2006b
6,8 – diprenilorobol (čistoća 95 %) 6,8 – diprenilgenistein (čistoća 85 %)	prenilirani izoflavonoidi	plodovi vrste <i>Cudrania tricuspidata</i> (Moraceae)	n-heksan/ EtOAc/MeOH/voda (7:3:6:4)	2 ml/min 800 okr./min	uzlazni	CPC LLB-M volumen 240ml (Sanki Engineering Ltd.)	Jeon i sur., 2012
Genipozid (čistoća 95 %)	iridoidni glikozid	plodovi vrste <i>Gardenia jasminoides</i> (Rubiaceae)	etil acetat/isopropanol/voda (3:2:5)	2 ml/min 1200 okr./min	silazni	CPC LLB-M volumen 230ml (Sanki Engineering Ltd.)	Kim i Kim, 2007
Sargakromanol E		smeđa alga <i>Sargassum siliquastrum</i> (Sargassaceae)	n-heksan/ EtOAc/MeOH/voda (5:5:7:3)	2 ml/min 1000 okr./min	silazni	CPC LLB-M volumen 240ml (Sanki Engineering Ltd.)	Lee i sur., 2013
Diekol Florofukofuroekol A	florotanini	smeđa alga <i>Ecklonia cava</i> (Lessoniaceae)	n-heksan/ EtOAc/MeOH/voda (2:7:3:7)	2 ml/min 1000 okr./min	silazni	CPC LLB-M volumen 240ml (Sanki Engineering Ltd.)	Lee i sur., 2014

Ksantotoksin (čistoća 98,7 %) Izopimpinelin (čistoća 100 %)	furanokumarin	plodovi vrste <i>Ammi majus</i> (Apiaceae)	n-heksan/ EtOAc/MeOH/voda (10:8:10:9)	3 ml/min 1600 okr./min	uzlazni	SCPC 250 (Armen Instrument Inc.)	Bartnik i Mazurek, 2016
Arktigenin Matairezol	lignani	stabljika vrste <i>Forsythia koreana</i> (Oleaceae)	n-heksan/ EtOAc/MeOH/voda (5:5:5:5)	2 ml/min 800 okr./min	silazni	CPC LLB-M volumen 230ml (Sanki Engineering Ltd.)	Kim i sur., 2006a
Naringin (čistoća 90 %) Neoponcirin (čistoća 93 %) Poncirin (čistoća 95,5 %)	flavonoidni glikozidi	plodovi vrste <i>Poncirus trifoliata</i> (Rutaceae)	etil acetat/isopropanol/voda (3:2:5)	2 ml/min 1200 okr./min	silazni	CPC LLB-M volumen 230ml (Sanki Engineering Ltd.)	Kim i sur, 2007
Klorofil	pigment	list vrste <i>Epimedium sagittatum</i> (Berberidaceae) list vrste <i>Senna alexandrina</i> (Fabaceae) nadzemni dijelovi vrste <i>Trifolium pratense</i> (Fabaceae)	heksan/ EtOAc/MeOH/voda (5:5:5:5)	25 ml/min 2500 okr./min	silazni	SCPC (Gilson-Armen Instrument Inc.)	Kim i sur., 2020
Palmatin (čistoća 93%)	alkaloid	korijen vrste <i>Berberis sibirica</i> (Berberidaceae)	EtOAc/1-butanol/EtOH/ voda (3:1:1:6)	6 ml/min 1800 okr./min	uzlazni	SCPC 250 (Armen Instrument Inc.)	Gawel i sur., 2020
Resveratrol Viniferin Vitisin C (čistoća sva 3 spoja > 90 %)	hidroksistilbeni	korijen hibridne vrste <i>Vitis riparia x Vitis berlandieri</i> (Vitaceae)	heptan/EtOAc/MeOH/voda (1:2:1:2)	4 ml/min 1300 okr./min	silazni	FCPC 200 (Kromaton Technologies)	Bisson i sur., 2011
3 – izomangostin Gartanin Deoksigartanin $\alpha$ – mangostin hidroksikalabaksanton $\beta$ – mangostin	ksantoni	plod vrste <i>Garcinia mangostana</i> (Clusiaceae)	heptan/EtOAc/MeOH/voda (2:1:2:1)	3 ml/min 1200 okr./min 1 ml/min 2000 okr./min	silazni	FCPC 200 (Kromaton Technologies) FCPC 50 (Kromaton Technologies)	Destandau i sur., 2009
Rutin Kvercetin Guajaverin Avicularin	flavonol glikozidi	kora vrste <i>Malus sp</i> (Rosaceae)	etil acetat/etanol/voda (4,5:1:4,5)	4 ml/min 2000 okr./min	silazni	FCPC 200 (Kromaton Technologies)	Toribio i sur., 2009

## 5. ZAKLJUČCI

U novije se vrijeme kromatografija tekuće – tekuće bez čvrstog nosača sve više koristi u postupcima izolacije, odjeljivanja i pročišćavanja ciljanih spojeva. Činjenica da su obje faze tekuće je prednost jer širok raspon potencijalnih dvofaznih sustava otapala omogućuje svestranost primjene ovih vrsta kromatografija pa tako i centrifugalne particijske kromatografije. No, to je ujedno i nedostatak jer izbor optimalnog dvofaznog sustava otapala zna biti dugotrajan proces. Primjena centrifugalne particijske kromatografije se većinom bazira na prirodne produkte. Obzirom da su ekstrakti dobiveni iz biljnih sirovina kemijski složene smjese, odvajanje sastavnica iz takvih smjesa izazovan je proces. Preparativna HPLC nije idealna metoda izbora za pročišćavanje ovakvih vrsta spojeva radi duljeg vremena i višestrukih koraka pročišćavanja te mogućnosti adsorpcije na materijal čvrste faze. Centrifugalna particijska kromatografija javlja se kao alternativna metoda koju karakterizira kraće vrijeme pročišćavanja i mogućnost injektiranja veće količine uzorka, kao i dobivanje veće količine spojeva visoke čistoće (> 90 %). Najčešće korišten dvofazni sustav otapala u izolaciji i pročišćavanju prirodnih produkata je heksan/etil acetat/ metanol/ voda. Pri izboru prikladnog dvofaznog sustava otapala uglavnom se određuje  $K_D$  spoja od interesa pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Prilikom razvoja metode potrebno je voditi brigu o zadržavanju stacionarne faze unutar kolone. Ukoliko se pokušava upravljati CPC postupkom s lošim zadržavanjem stacionarne faze, neće se postići željeno učinkovito odvajanje sastavnica. Centrifugalna particijska kromatografija je glavna metoda izbora za izolaciju i pročišćavanje kanabinoida. Također, metoda je uspješno korištena u izolaciji različitih skupina prirodnih spojeva kao što su lignani, kumarini, antocijani, alkaloidi, flavonoidi, stilbeni, ksantoni, monoterpeni, seskviterpeni, saponini i različiti pigmenti. Obzirom na učinkovitost preparativnog pročišćavanja, ova bi vrsta kromatografije mogla zadovoljiti potražnju za velikim količinama čistih prirodnih spojeva potrebnim za daljnja farmakološka i klinička istraživanja ili za dobivanje standarda za potrebe kemijskih analiza.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

[A]<sub>m</sub> koncentracija analita u mobilnoj fazi

[A]<sub>s</sub> koncentracija analita u stacionarnoj fazi

AIDS sindrom stečene imunodeficijencije

CB endokanabinoidni receptori

CBCV kanabihromevarin

CBD kanabidiol

CBD kanabihromen

CBDA kanabidiolna kiselina

CBDV kanabidivarin

CBG kanabigerol

CBGA kanabigerolna kiselina

CBN kanabinol

CCC protustrujna kromatografija

CPC centrifugalna particijska kromatografija

CST kritična temperature otopine

DAD diode array UV detektor

ESI ionizacija elektrosprejom

EtOAc etil acetat

GC plinska kromatografija

FID plamenoionizacijski detektor

HCl klorovodična kiselina

HIV virus humane imunodeficijencije

HPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HSCCC protustrujna kromatografija velike brzine

$K_D$  konstanta distribucije

MEK metiletilketon

MS masena spektrometrija

MtBE metil tert-butil eter

N broj teorijskih tavana

NaOH natrijev hidroksid

NMR nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija

PAC proantocijanidini

$R_s$  razlučivanje

$S_f$  zadržavanje stacionarne faze

THC  $\Delta^9$  – terahidrokanabinol

THCA  $\Delta^9$  – terahidrokanabinolna kiselina A

THF tetrahidrofuran

TLC tankoslojna kromatografija

UHPLC tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

UV-Vis ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija

$V_c$  ukupni volumen kolone

$V_m$  volumen mobilne faze

$V_r$  volumen zadržavanja

$V_s$  volumen stacionarne faze

$W_b$  širina pika na baznoj liniji

## 7. LITERATURA

Adelmann S, Schembecker G. Influence of physical properties and operating parameters on hydrodynamics in centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(32), 5401-5413.

Audo G, Lequemener, Perry Leigenbaum R, Nir Y. Single – step purification of THC, CBD, CBN, CBG and minor cannabinoids by centrifugal partition chromatography (CPC). Application Note AN1036. Gilson, Inc. 2021

Bartnik M, Mazurek AK. Isolation of methoxyfuranocoumarins from *Ammi majus* by centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(1), 10-16.

Berthod A, Armstrong D. Centrifugal partition chromatography. I. general features. *J Liq Chromatogr*, 1988, 11, 547-566.

Berthod A, Armstrong D. Centrifugal partition chromatography. VI. temperature effects. *J Liq Chromatogr*, 1988, 11, 1457-1474.

Berthod A, Faure K. Separation with a liquid stationary phase: countercurrent chromatography or centrifugal partition chromatography. U: Analytical separation science. Anderson JL, Berthod A, Pino V, Stalcup AM, Weinheim Wiley VCH, 2015, str. 1177-1205.

Berthod A, Maryutina T, Spivakov B, Shpigun O, Sutherland IA. Countercurrent chromatography in analytical chemistry. *Pure Appl Chem*, 2009, 81(2), 355-387.

Bezold F, Minceva M. A water-free solvent system containing an L-menthol-based deep eutectic solvent for centrifugal partition chromatography applications. *J Chromatogr A*, 2019, 1587, 166-171.

Bisson J, Poupard P, Pawlus AD, Pons A, Darriet P, Merillon JM, Teguo PW. Development of hybrid elution systems for efficient purifications of stilbenoids using centrifugal partition chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2011, 1218, 6079-6084.

Bojczuk M, Żyżelewicz D, Hodurek P. Centrifugal partition chromatography - A review of recent applications and some classic references. *J Sep Sci*, 2017, 40(7), 1597-1609.

Boonloed A, Weber GL, Ramzy KM, Dias VR, Remcho VT. Centrifugal partition chromatography: A preparative tool for isolation and purification of xylindein from *Chlorociboria aeruginosa*. *J Chromatogr A*, 2016, 1478, 19-25.

Cavalcanti RN, Forster-Carneiro T, Gomes MTMS, Rostagno MA, Prado JM, Meireles MAA. Uses and applications of extracts from natural sources. U: Natural product extraction: principles and applications. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge, 2013, str. 1-57.

Centrifugal partition chromatography: Isolation of monoaromatic compounds from oxidatively depolymerized lignin, 2022., <https://www.gilson.com>, pristupljeno 17.5.2022.

Centrifugal partition chromatography: The key to green preparative chromatography, 2021, <https://www.gilson.com>, pristupljeno 17.5.2022.



Cromatografia de particion centrifuga (CPC) para la purificacion y extraccion de compuestos, 2020., <https://www.gilson.com>, pristupljeno 26.8.2021.

Destandau E, Boukhris MA, Zubrzycki S, Akssira M, Rhaffari LE, Elfakir C. Centrifugal partition chromatography elution gradient for isolation of sesquiterpene lactones and flavonoids from *Anvillea radiata*. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2015, 985, 29-37.

Destandau E, Toribio A, Lafosse M, Pecher V, Lamy C, Andre P. Centrifugal partition chromatography directly interfaced with mass spectrometry for the fast screening and fractionation of major xanthenes in *Garcinia mangostana*. *J Chromatogr A*, 2009, 1216, 1390-1394.

Duraković D. Medicinska marihuana. *Jahr*, 2016, 7 (2), 331-342.

El Menyiy N, Guaouguaou FE, El Baaboua A, El Omari N, Taha D, Salhi N, Shariati MA, Aanniz T, Benali T, Zengin G, El Shazly M, Chamkhi I, Bouyahya A. Phytochemical properties, biological activities and medicinal use of *Centaurium erythraea* Rafn. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276, 114171.

Fast Centrifugal Partition Chromatograph, <http://www.kromaton.com>, pristupljeno 26.8.2021.

Frampton JE. Crofelemer: a review of its use in the management of non-infectious diarrhoea in adult patients with HIV/AIDS on antiretroviral therapy. *Drugs*, 2013, 73(10), 1121-1129.

Friesen JB, McAlpine JB, Chen SN, Pauli GF. Countercurrent separation of natural products: An update. *J Nat Prod*, 2015, 78, 1765-1796.

Fumat N, Berthod A, Faure K. Effect of operating parameters on a centrifugal partition chromatography separation. *J Chromatogr A*, 2016, 1474, 47-58.

Gawel K, Kukula – Koch W, Nieoczym D, Stepnik K, Van der Ent W, Banono NS, Tarabasz D, Turski WA, Esguerra CV. The influence of palmatine isolated from *Berberis sibirica* radix on pentylenetetrazole – induced seizures in zebrafish. *Cells*, 2020, 9(5), 1233.

Hazekamp A, Simons R, Sengers M, Van Zweden R, Verpoorte R. Preparative isolation of cannabinoids from *Cannabis sativa* by centrifugal partition chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2004, 27, 2421-2439.

Hubert J, Ple K, Hamzaoui M, Renault JH. Polyphenol purification by solid support-free liquid–liquid chromatography (CCC, CPC). U: Natural products. Ramawat KG, Merillon, urednici, Springer Berlin Heidelberg, 2013, str. 2145-2172.

Issaadi HM, Tsai YC, Chang FR, Hunyadi A. Centrifugal partition chromatography in the isolation of minor ecdysteroids from *Cyanotis arachnoidea*. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1054, 44-49.

Jeon JS, Kim SM, Lee HJ, Um ABH, Kim HK, Kim CY. preparative isolation and purification of prenylated isoflavonoids from *Cudrania tricuspidata* fruits using centrifugal partition chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2012, 35, 1607-1615.

Kedzierski B, Kukula – Koch W, Glowniak K. Application of CPC and related methods for the isolation of natural substances – a review. *Acta Pol Pharm*, 2014, 71(2), 223-227.

Kim CY, Ahn MJ, Kim J. A preparative isolation and purification of arctigenin and matairesinol from *Forsythia koreana* by centrifugal partition chromatography. *J Sep Sci*, 2006, 29(5), 656-659.

Kim CY, Ahn MJ, Kim J. Preparative isolation of mangiferin from *Anemarrhena asphodeloides* rhizomes by centrifugal partition chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2006, 29, 869-875.

Kim CY, Kim J. Preparative isolation and purification of geniposide from gardenia fruits by centrifugal partition chromatography. *Phytochem Anal*, 2007, 18(2), 115-117.

Kim CY, Lee HJ, Lee MK, Ahn MJ, Kim J. One step purification of flavanone glycosides from *Poncirus trifoliata* by centrifugal partition chromatography. *J Sep Sci*, 2007, 30(16), 2693-2697.

Kim SB, Bisson J, Friesen JB, Pauli GF, Simmler C. Selective chlorophyll removal method to degreen botanical extracts. *J Nat Prod*, 2020, 83 (6), 1846-1858.

Kromaton cannabis extraction systems, <https://nomadlabs.eu>, pristupljeno 26.8.2021.

Kumar GM, Neelam I, Ajitha A, Uma V, Rao M. Centrifugal partition chromatography: An overview. *Int J Pharm Res Anal*, 2014, 4, 353-360.

Lee JH, Ko JY, Oh JY, Kim CY, Lee HJ, Kim J, Jeon YJ. Preparative isolation and purification of phlorotannins from *Ecklonia cava* using centrifugal partition chromatography by one-step. *Food Chem*, 2014, 158, 433-437.

Lee JH, Ko JY, Samarakoon K, Oh JY, Heo SJ, Kim CY, Nac JW, Jang MK, Lee JS, Jeon YJ. Preparative isolation of sargachromanol E from *Sargassum siliquastrum* by centrifugal partition chromatography and its anti-inflammatory activity. *Food Chem Toxicol*, 2013, 62, 54-60.

Lorantfy L, Rutterschmid D, Orkenyi R, Bakonyi D, Farago J, Dargo G, Konczol A. Continuous industrial – scale centrifugal partition chromatography with automatic solvent system handling: concept and instrumentation. *Org Process Res Dev*, 2020, 24, 2676-2688.

Maciuk A, Renault JH, Margraff R, Trébuchet P, Zèches-Hanrot M, Nuzillard JM. Anion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *Anal Chem*, 2004, 76(21), 6179-6186.

Mandova T, Audo G, Michel S, Grougnet R. Assessment of two centrifugal partition chromatography devices. Application to the purification of *Centaureum erythraea* methanolic extract. *Phytochem Lett*, 2017, 20, 401-405.

Marchal L, Legrand J, Foucault A. Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *Chem Rec*, 2003, 3(3), 133-143.

Marlot L, Batteau M, Faure K. Classification of biphasic solvent systems according to Abraham descriptors for countercurrent chromatography. *J Chromatogr A*, 2020, 1617, 460820.

Morel S, Landreau A, Nguyen VH, Derbre S, Grellier P, Le Pape P, Pagniez F, Litaudon M, Richomme P. Preparative isolation, fast centrifugal partition chromatography purification and biological activity of cajanflavanone from *Derris ferruginea* stems. *Phytochem Anal*, 2012, 23(2), 152-158.

Morley R, Minceva M. Operating mode and parameter selection in liquid – liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2020, 1617, 460479.

Natural product purification by centrifugal partition chromatography (CPC), 2019., <https://www.gilson.com>, pristupljeno 26.8.2021.

Natural product purification by centrifugal partition chromatography (CPC), <https://www.solvscientific.com>, pristupljeno 17.5.2022.

Phansalkar RS, Nam JW, Chen SN, McAlpine JB, Leme AA, Aydin B, Bedran Russo AK, Pauli GF. Centrifugal partition chromatography enables selective enrichment of trimeric and tetrameric proanthocyanidins for biomaterial development. *J Chromatogr A*, 2018, 1535, 55-62.

Popp JR, Petrakis EA, Angelis A, Halabalaki M, Bonn GK, Stuppner H, Skaltsounis LA. Rapid isolation of acidic cannabinoids from *Cannabis sativa* L. using pH-zone-refining centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A*, 2019, 1599, 196-202.

Roehrer S, Minceva M. Characterization of a centrifugal partition chromatographic column with spherical cell design. *Chem Eng Res Des*, 2019, 143, 180-189.

Roehrer S, Minceva M. Influence of temperature on the separation performance in solid support-free liquid-liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2019, 1594, 129-139.

Rostagno MA, Prado JM. Preface U: Natural product extraction: principles and applications. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge, 2013

Spinu S, Ortan A, Ionescu D, Moraru I. Centrifugal partition chromatography (CPC) – a novel method of separation and purification of natural products – a short review. *Curr Trends Nat Sci*, 2020, 9, 6-11.

Szabó LU, Schmidt TJ. Target-Guided Isolation of *O*-tigloylcyclovirobuxeine-B from *Buxus sempervirens* L. by centrifugal partition chromatography. *Molecules*, 2020, 25(20), 4804.

Toribio A, Destandau E, Elfakir C, Lafosse M. Hyphenation of centrifugal partition chromatography with electrospray ionization mass spectrometry using an active flow – splitter device for characterization of flavonol glycosides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23, 1863-1870.

Xiao W, Lei F, Hengqiang Z, Xiaojing L. Isolation and purification of natural products. U: Natural product extraction: principles and applications. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge, 2013, str. 314-362.

Yoon KD, Chin YW, Kim J. Centrifugal partition chromatography: application to natural products in 1994-2009. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2010, 33, 1208-1254.

## 8. SAŽETAK

Centrifugalna particijska kromatografija (CPC) je novija preparativna tehnika koja se sve više uspješno koristi u izolaciji, pročišćavanju i ukoncentriravanju prirodnih produkata. U okviru ovog diplomskog rada prikazana su dosadašnja teorijska saznanja o tom tipu tekućinske kromatografije bez čvrstog nosača te mogućnostima njezine primjene u području prirodnih produkata. Obzirom da su ekstrakti dobiveni iz biljnih sirovina kompleksne smjese, odjeljivanje njihovih bioaktivnih sastavnica složen je i dugotrajan proces. CPC metoda kombinira načela ekstrakcije i kromatografije i može se koristiti za izolaciju tvari sa širokim rasponom polarnosti. Značajka ovog sustava su tekuće stacionarne i mobilne faze pa se analiza i odjeljivanje sastavnica prirodnih produkata zasniva na raspodjeli otopljenih tvari između te dvije nemješljive tekuće faze. Najčešće korišten dvofazni sustav otapala koji se koristi u tu svrhu je heksan/etil acetat/metanol/ voda. Tehnika se pokazala kao učinkovita alternativa konvencionalnim preparativnim kromatografskim tehnikama, a karakterizira ju kraće vrijeme pročišćavanja i mogućnost injektiranja veće količine uzorka, kao i dobivanje veće količine spojeva visoke čistoće (> 90 %). Znanstvena istraživanja dokazuju uspješnost primjene u izolaciji i pročišćavanje različitih skupina prirodnih spojeva kao što su kanabinoidi, lignani, kumarini, antocijani, alkaloidi, flavonoidi, stilbeni, ksantoni, monoterpeni, seskviterpeni, saponini i različiti pigmenti. Obzirom na učinkovitost preparativnog pročišćavanja, ova bi vrsta kromatografije mogla zadovoljiti potražnju za velikim količinama čistih prirodnih spojeva potrebnim za daljnja biološka, farmakološka i klinička istraživanja odnosno za proizvodnju standarda za potrebe kemijskih analiza ili pak za dobivanje frakcioniranih i ukoncentriranih prirodnih produkata od interesa za farmaceutsku, prehrambenu i kozmetičku industriju.

## 8. SUMMARY

Centrifugal partition chromatography (CPC) is a recent preparative technique that is increasingly used in isolation, purification and concentration of natural products. In this thesis, the theoretical finding about this type of liquid chromatography without a solid support and the possibilities of its application in the field of natural products are presented. Since extracts obtained from plant raw material are quite complex mixtures, the separation of their bioactive components is a complex process. The CPC method combines extraction and chromatography principles and it can be used to isolate substances with a wide range of polarity. The characteristics of this system are liquid stationary and mobile phases, so analysis and separation of the components of natural products are based on the distribution of solutes between two immiscible liquid phases. The most commonly used two phase solvent system for this purpose is hexane / ethyl acetate / methanol / water. The technique has proven to be an effective alternative to conventional preparative chromatographic techniques and it is characterized by a shorter purification time and possibility of injecting a larger quantity of samples, as well as by obtaining a higher quantity of high purity compounds (> 90 %). Scientific researches prove the success of application in the isolation and purification of various group of natural compounds such as cannabinoids, lignans, coumarins, anthocyanins, alkaloids, flavonoids, stilbenes, xanthones, monoterpenes, sesquiterpenes, saponins and various pigments. Given the efficiency of preparative purification, this type of chromatography could satisfy the demand for large quantities of pure natural compounds necessary for further biological, pharmacological and clinical research, of for the production of standards for the purposes of chemical analyses or for the production of fractionated and concentrated natural products of interest for pharmaceutical, food and cosmetic industry.



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognoziju  
Izolacija bioaktivnih prirodnih produkata  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### CENTRIFUGALNA PARTICIJSKA KROMATOGRAFIJA U IZOLACIJI PRIRODNIH PRODUKATA

Tea Raos

#### SAŽETAK

Centrifugalna particijska kromatografija (CPC) je novija preparativna tehnika koja se sve više uspješno koristi u izolaciji, pročišćavanju i ukoncentriravanju prirodnih produkata. U okviru ovog diplomskog rada prikazana su dosadašnja teorijska saznanja o tom tipu tekućinske kromatografiji bez čvrstog nosača te mogućnostima njezine primjene u području prirodnih produkata. Obzirom da su ekstrakti dobiveni iz biljnih sirovina kompleksne smjese, odjeljivanje njihovih bioaktivnih sastavnica složen je i dugotrajan proces. CPC metoda kombinira načela ekstrakcije i kromatografije i može se koristiti za izolaciju tvari sa širokim rasponom polarnosti. Značajka ovog sustava su tekuće stacionarne i mobilne faze pa se analiza i odjeljivanje sastavnica prirodnih produkata zasniva na raspodjeli otopljenih tvari između te dvije nemješljive tekuće faze. Najčešće korišten dvofazni sustav otapala koji se koristi u području prirodnih produkata je heksan/etil acetat/ metanol/ voda. Tehnika se pokazala kao učinkovita alternativa konvencionalnim preparativnim kromatografskim tehnikama, a karakterizira ju kraće vrijeme pročišćavanja i mogućnost injektiranja veće količine uzorka, kao i dobivanje veće količine spojeva visoke čistoće (> 90 %). Znanstvena istraživanja dokazuju uspješnost primjene u izolaciji i pročišćavanje različitih skupina prirodnih spojeva kao što su kanabinoidi, lignani, kumarini, antocijani, alkaloidi, flavonoidi, stilbeni, ksantoni, monoterpeni, seskviterpeni, saponini i različiti pigmenti. Obzirom na učinkovitost preparativnog pročišćavanja, ova bi vrsta kromatografije mogla zadovoljiti potražnju za velikim količinama čistih prirodnih spojeva potrebnim za daljnja biološka, farmakološka i klinička istraživanja odnosno za proizvodnju standarda za potrebe kemijskih analiza ili pak za dobivanje frakcioniranih i ukoncentriranih prirodnih produkata od interesa za farmaceutsku, prehrambenu i kozmetičku industriju.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranice, 21 grafički prikaz, 6 tablica i 56 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: natural products purification, centrifugal partition chromatography, countercurrent chromatography, liquid-liquid chromatography

Mentor: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ivana Perković**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marijan Marijan**, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: 27. lipnja 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### CENTRIFUGAL PARTITION CHROMATOGRAPHY IN ISOLATION OF NATURAL PRODUCTS

Tea Raos

#### SUMMARY

Centrifugal partition chromatography (CPC) is a recent preparative technique that is increasingly used in isolation, purification and concentration of natural products. In this thesis, the theoretical finding about this type of liquid chromatography without a solid support and the possibilities of its application in the field of natural products are presented. Since extracts obtained from plant raw material are quite complex mixtures, the separation of their bioactive components is a complex process. The CPC method combines extraction and chromatography principles and it can be used to isolate substances with a wide range of polarity. The characteristics of this system are liquid stationary and mobile phases, so analysis and separation of the components of natural products are based on the distribution of solutes between two immiscible liquid phases. The most commonly used two phase solvent system for this purpose is hexane / ethyl acetate / methanol / water. The technique has proven to be an effective alternative to conventional preparative chromatographic techniques and it is characterized by a shorter purification time and possibility of injecting a larger quantity of samples, as well as by obtaining a higher quantity of high purity compounds (> 90 %). Scientific researches prove the success of application in the isolation and purification of various group of natural compounds such as cannabinoids, lignans, coumarins, anthocyanins, alkaloids, flavonoids, stilbenes, xanthenes, monoterpenes, sesquiterpenes, saponins and various pigments. Given the efficiency of preparative purification, this type of chromatography could satisfy the demand for large quantities of pure natural compounds necessary for further biological, pharmacological and clinical research, of for the production of standards for the purposes of chemical analyses or for the production of fractionated and concentrated natural products of interest for pharmaceutical, food and cosmetic industry.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 21 figures, 6 tables and 56 references. Original is in Croatian language.

Keywords: natural products purification, centrifugal partition chromatography, countercurrent chromatography, liquid-liquid chromatography

Mentor: **Biljana Blažeković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Blažeković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivana Perkočić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marijan Marijan, Ph.D.** *postdoctorand*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 27th June 2022.