

Министерство науки и высшего образования РФ
ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет»

Химико-технологический факультет

Направление «Химия»

Кафедра неорганической и аналитической химии

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

курсовая работа по дисциплине:

Хроматографический метод анализа

Автор:

Шачнева Кристина Сергеевна

студентка 4 курса, 45 группы

химико-технологического факультета

Научный руководитель:

к.х.н., доцент Баранова Н.В.

Тверь 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИИ	5
2. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	6
2.1. Качественный анализ.....	6
2.2. Количественный анализ	7
3. МЕТОДЫ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	9
3.1. Газожидкостная хроматография.....	10
3.1.1. Методика определения остаточных растворителей в натриевой соли цефазолина.....	11
3.2. Газотвердофазная хроматография.....	12
4. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ	13
4.1. Бумажная хроматография.	13
4.2. Тонкослойная хроматография.	15
4.2.1. Качественный анализ глютаминовой кислоты	15
4.3. Аффинная хроматография, как метод определения стероидсвязывающих белков.....	16
4.4. Лигандная хроматография.	17
4.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	18
4.5.1. Методика определение ибупрофена	19
4.6. Ионнообменная хроматография	20
4.6.1. Количественное определение солей минеральных и органических кислот	21

4.6.2. Количественно определяют соли алкалоидов и азотистые основания с помощью анионитов	22
4.7. Гель-хроматография.	22
4.8. Осадочная хроматография	24
5. ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	27

ВВЕДЕНИЕ

В современной химии одними из актуальных проблем являются хроматографический анализ лекарственных средств, с помощью которого качественно подтверждают подлинность препарата, а также определяют количественное содержание того или иного вещества.

Объектом исследования является хроматографический анализ, предметом – методы и методики газовой и жидкостной хроматографии, применяемых для анализа лекарственных средств.

Целью курсовой работы является ознакомление с методами хроматографии, применяемые в качественном и количественном анализе лекарственных препаратов.

Задачами исследования являются:

1. Обзор научной литературы по изучаемой проблеме.
2. Ознакомление с историей возникновения хроматографии.
3. Изучение классификации газовой хроматографии.
4. Изучение методов жидкостной хроматографии
5. Обзор методик хроматографии, применяемых для качественного и количественного определения подлинности лекарственных веществ.

Методологической основой исследования в курсовой работе явились научные труды выдающихся отечественных педагогов, ученых, деятелей науки, периодические издания, направленные на расширение химического кругозора.

1. ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИИ

21 марта 1903 г. Ассистент кафедры анатомии и физиологии растений Варшавского университета Михаил Семенович Цвет исследовал разделение пигментов зеленых листьев растений на колонке с карбонатом кальция.

М.С. Цвет предложил название открытого им метода – «хроматография» (от греч. *chroma*, Р.п. *chromatos* – цвет, краска), что означает «цветозапись». Он писал: «Если петролейно-эфирный раствор хлорофилла профильтровать через столбик адсорбента, то пигменты по расположению их в адсорбционном ряду отлагаются отдельными окрашенными зонами по столбику сверху вниз благодаря тому, что пигменты с более сильно выраженной адсорбцией вытесняют книзу слабее удерживаемые...»

В 1938 г. М.С. Шрайбер, разработал основы тонкослойной хроматографии. В 1940 г. А. Мартин и Д. Сонж предложил вариант жидкостной распределительной хроматографии. Им удалось разделить ацетильные производные аминокислот на колонке, заполненной силикагелем, насыщенным водой, с использованием хлороформа в качестве элюента. В работе отмечено, что подвижной фазой может быть не только жидкость, но и газ. В 1948 г. Е. Н. Гапон и Т.Б. Гапон удалось разделить смесь веществ с помощью осадочной хроматографии. В 1952 г. А. Мартин и А.Т. Джеймс разработал газожидкостную хроматографию. Создание в 1956 г. М. Голеем варианта капиллярной газовой хроматографии (высокоэффективной газовой хроматографии). Использование высоких давлений (с середины 1970-х гг.) позволило увеличить скорость течения элюента и тем самым создать высокоэффективную жидкостную хроматографию.

Итак, хроматография – физико-химический метод разделения смесей, в котором разделяемые компоненты распределены между двумя фазами. Одна из этих фаз (стационарная фаза) неподвижна – сорбент, а другая (подвижная фаза) – элюент [1, С. 7-10].

2. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

2.1. Качественный анализ

В качественном анализе ГХ решаются задачи по определению групповой принадлежности веществ, содержащихся в анализируемом образце (альдегиды, углеводы, спирты, и т.д.) и идентификации компонентов смеси.

Качественный анализ проводится методом относительных удерживаний ли с помощью веществ свидетелей.

При сохранении в ходе опыта постоянной температуры колонки и скорости газа-носителя основными качественными характеристиками являются время удерживания t_R и удерживаемый объем V_R анализируемого вещества. Если анализ проводится на другом приборе и при других условиях, необходимо вводить поправку на объем газа-носителя, не принимающий участия в вымывании компонентов пробы (использовать приведенный объем удерживания V'_R).

Часто идентификацию проводят по относительному удерживанию (t_R отн., V_R отн.), т.е. по отношению приведенного удерживаемого времени (объема) определяемого компонента к приведенному удерживаемому времени (объему) вещества, принятого за стандарт:

$$t'_R \text{ отн.} = t'_R / t'_R \text{ отн.} \cdot V_R \text{ отн.} = V'_R / V'_R \text{ отн.}$$

Один из вариантов идентификации на основе характеристик удержания состоит в сравнении анализируемой и эталонной смесей в одинаковых условиях. Равенство времен удерживания пиков соответствующих компонентов обеих смесей может служить основанием идентификации.

Другой вариант (метод метки, добавки) заключается в том, что в исследуемую смесь вводят эталонный компонент, наличие которого в этой смеси предполагается.

Эффективным оказалось сочетание газовой хроматографии с ИК спектроскопией и масс-спектрометрией.

Идентификацию веществ методом ВЭЖХ проводят по хроматограмме с учетом параметров удерживания компонентов или по УФ спектрам компонентов.

2.2. Количественный анализ

В ГХ и ВЭЖХ основным параметром хроматограммы, характеризующим количество анализируемого компонента, является площадь пика (S). Упрощенный способ состоит в умножении высоты пика (h) на его ширину, измеренную на расстоянии, равном половине высоты ($w_{0,5}$).

Существуют три основных метода количественного анализа: метод абсолютной градуировки, метод внутренней нормализации и метод внутреннего стандарта.

Метод абсолютной градуировки. Используется для определения одного или двух компонентов в смеси, например, при анализе примесей. Строят градуировочный график, на одной из осей которого откладывают количество введенного вещества (q), а на другой – высоты (или площади) пиков.

Если зависимость линейна, то можно вычислить угловой коэффициент K (градуировочный множитель) и определить содержание i -го вещества (%) в пробе по формуле:

$$W_i = K_i \frac{h_i(S_i)}{q_i} 100,$$

Где W_i = массовая доля определенного компонента q_i – величина пробы, мкл или мкг; K_i – градуировочный множитель; $h_i(S_i)$ – высота (площадь) пика, мм (мм).

Метод внутренней нормализации. Этот метод основан на том предположении, что вещества, взятые в одинаковом количестве, дают одну и ту же площадь пика, независимо от их строения. В этом случае расчет ведут по формуле:

$$W_i(\%) = \frac{S_i \cdot K_i}{\sum_{i=1}^n S_i \cdot K_i} 100,$$

где K_i – градуировочный коэффициент i -го компонента.

Градуировочные коэффициенты определяют для учета различия в чувствительности детектора для каждого компонента. Градуировку проводят по результатам хроматографирования бинарной смеси, составленной из i -го компонента и стандарта, градуировочный коэффициент которого принимают равным 1. Градуировочные коэффициенты рассчитывают по формуле:

$$K_i = \frac{S_{ст}C_i}{S_iC_{ст}} \text{ или } K_i = \frac{h_{ст}C_i}{h_iC_{ст}}.$$

Приводятся поправочные коэффициенты (K_n), т. е. градуировочные K_i хроматографируемых веществ, отнесенные к градуировочному коэффициенту вещества, выбранного за стандарт ($K_{ст}$):

$$K_n = \frac{K_i}{K_{ст}}.$$

Метод внутреннего стандарта. Основан на введении в анализируемую пробу точно известного количества стандартного вещества, не входящего в состав анализируемой смеси и дающего отдельно регистрируемый на хроматограмме последний пик. Строят зависимость отношения площадей пиков от величины количественного соотношения компонента и стандарта в смеси. Массовую долю рассчитывают по формуле:

$$W_i(\%) = \frac{K_i S_i}{K_{ст} S_{ст}} 100r = K \frac{S_i m_{ст}}{S_{ст} m_i} 100,$$

где r – отношение массы внутреннего стандарта в смеси к массе анализируемого вещества [2, С. 161-181]:

$$r = \frac{m_{ст}}{m_i}.$$

3. МЕТОДЫ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Газовая хроматография — физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов анализируемой смеси между двумя несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами, где в качестве подвижной фазы выступает газ-носитель, а в качестве неподвижной фазы — твердый сорбент или жидкость, нанесенная на инертный твердый носитель или внутренние стенки колонки. В элюентной колоночной хроматографии пробу, растворенную в малом объеме в подвижной фазе, помещают на вершину колонки и затем пропускают подвижную фазу до тех пор, пока все компоненты не выйдут из колонки и не будут зарегистрированы на выходе из нее. Вследствие неодинаковой поглощаемости различных веществ происходит их разделение. Определение природы вещества производят или по собственной характерной окраске вещества, или пропуская через хроматографическую колонку раствора реагента-проявителя, образующего с анализируемыми веществами специфически окрашенные соединения [3, С. 429-430]. Газовая хроматография включает газожидкостную, газотвердофазную, газомезофазную. Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе — неподвижной. Принципиальная схема газового хроматографа представлена на Рис.3.1:

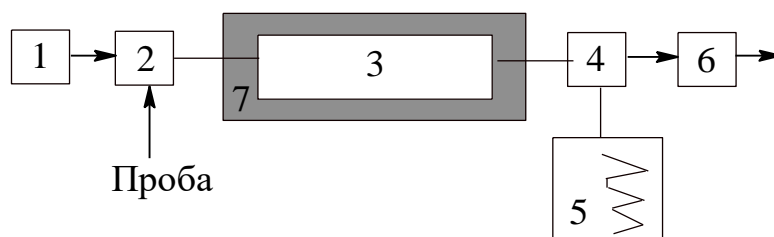


Рис. 3.1. Принципиальная схема газового хроматографа: 1 – газ-носитель, 2 – испаритель, 3 – хроматографическая колонка, 4 – детектор, 5 – самопишущий регистратор, 6 – измеритель скорости потока, 7 – термостат.

3.1. Газожидкостная хроматография

Метод газожидкостной хроматографии используется в фармацевтическом анализе для разделения, идентификации и количественного определения лекарственных веществ и их смесей.

В газожидкостной хроматографии неподвижная фаза (абсорбент) представляет собой жидкость, нанесенную на твердый носитель. Носитель – относительно инертный адсорбент с низкой удельной поверхностью, на которой должна удерживаться неподвижная фаза в виде пленки равномерной толщины. Применяют минеральные и полимерные носители. Большинство минеральных носителей представляют собой переработанные диатомиты. Обычно используются носители с размерами частиц в интервалах от 125 до 150 мкм или от 150 до 180 мкм.

В качестве подвижной фазы используются водород, азот, гелий, аргон. Эти газы-носители могут подаваться в систему либо из баллонов, либо из газогенераторов.[4].

ГЖХ применяется в фармацевтическом анализе не очень широко, так как многие лекарственные вещества разлагаются при высокой температуре. Метод используется главным образом в анализе эфирных масел, летучих лекарственных веществ, таких как, этиловый спирт, ментол, тимол, терпингидрат, камфора, хлоралгидрат, и т.д. Данным методом устанавливают подлинность, определяют содержание действующего вещества и посторонние примеси в субстанциях и лекарственных препаратах, содержащих летучие компоненты. В последние годы метод ГЖХ стал широко применяться для определения остаточных органических растворителей в фармацевтических субстанциях, поскольку такие растворители обладают свойством летучести.

3.1.1. Методика определения остаточных растворителей в натриевой соли цефазолина

В данном лекарственном веществе нормируется содержание таких растворителей, как ацетон не более 0,05 %, метанол не более 0,05 %, хлористый метилен не более 0,05 %, ацетонитрил не более 0,03 %.

Определение проводят на газо-жидкостном хроматографе с автоматизированной системой обработки хроматографической информации, в качестве которой используют персональный компьютер. Разделение проводят на капиллярной колонке с жидкой фазой – 20 цианпропилметилфенилсилоксан. В качестве детектора используют пламенноионизационный детектор. Готовят два раствора: 1) испытуемый раствор, содержащий натриевую соль цефазолина около 2 г в 4 мл воды; 2) раствор, содержащий смесь рабочих стандартных образцов метанола, хлористого метилена, ацетона, ацетонитрила в 100 мл воды. Выбор воды в качестве растворителя объясняется тем, что лекарственный препарат и остаточные органические растворители растворяются в воде, а пламенноионизационный детектор не чувствителен к воде и не дает пиков. Растворы попеременно хроматографируют в выбранном режиме, получая по три хроматограммы для каждого раствора [5, С.19-20]. Содержание ацетона и ацетонитрила рассчитывают по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_{\text{ст}} p V_2 100}{S_{\text{ст}} V_1 Q},$$

где: S – средние значения площадей пиков ацетона и ацетонитрила;

$S_{\text{ст}}$ – средние значения площадей пиков РСО ацетона и ацетонитрила;

p – плотность растворителей, г/см³;

$V_{\text{ст}}$ – объемы РСО ацетона и ацетонитрила, взятые для приготовления стандартного раствора;

V_1 – объем воды, взятый для приготовления стандартного раствора;

V_2 – объем воды, взятый для приготовления испытуемого раствора;

Q – навеска препарата.

3.2. Газотвердофазная хроматография

Газотвердофазная хроматография – это метод разделения летучих компонентов, при котором элюентом служит поток инертного газа-носителя (водород, гелий, аргон, азот углекислый газ), а сорбентом — частицы твёрдого тела (адсорбенты с высокой удельной поверхностью — активные угли, оксид алюминия, пористое стекло, силикагели). Наиболее широко метод газотвердофазной хроматографии применяют для анализа смесей газов и низкокипящих углеводородов, не содержащих активных функциональных групп. В фармацевтическом анализе применяется редко. Основные узлы газоадсорбционного хроматографа следующие (Рис. 3.2):

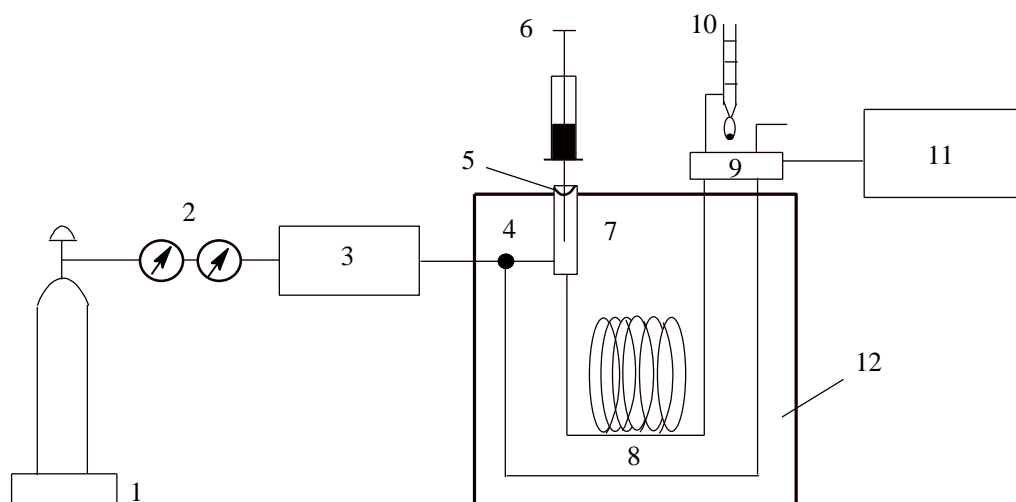


Рис. 3.2. Схема газоадсорбционного хроматографа: 1 – газ-носитель, 2 – редукторы давления, 3 – регулятор потока газа, 4 – делитель, 5 – прокладка, 6 – шприц для ввода пробы, 7 – блок ввода и испарения пробы, 8 – колонка, 9 – детектор, 10 – измеритель скорости потока, 11 – система регистрации, 12 – термостат.

4. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

В жидкостной хроматографии характер протекающих процессов в хроматографической колонке в общем случае идентичен с процессами в газовой хроматографии. Отличие состоит в применении в качестве подвижной фазы жидкости, т.е.. жидкостная хроматография – это метод разделения смесей веществ в потоке жидкости на поверхности твердого вещества. Подвижной фазой является жидкость, а неподвижной фазой является либо тонко измельченная твердая основа, либо жидкость, нанесенная на твердую подложку, либо твердый носитель, химически модифицированный путем введения органических групп. В связи с высокой плотностью жидких подвижных фаз и большим сопротивлением колонок ЖХ сильно отличается по аппаратному оформлению ГХ.

4.1. Бумажная хроматография.

Распределительная бумажная хроматография основана на различии в скорости перемещения компонентов анализируемой смеси на бумаге в элюенте. Хроматограммой называют картину расположения хроматографических зон на бумаге после завершения разделения. Схема распределительной бумажной хроматографии на Рис 4.1:

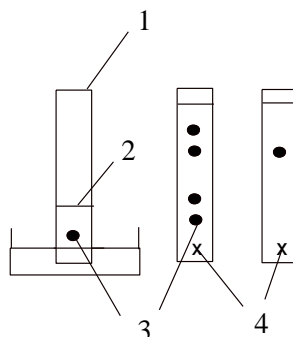


Рис. 4.1. Схема распределительной бумажной хроматографии: 1 – фильтровальная бумага (сорбент), 2 – фронт элюента, 3 – пятна, 4 – начальное положение пятен.

Хроматография является общей методикой отделения химических веществ. В этом исследовании использована хроматография для разделения и идентификации, строительных блоков белков, аминокислот. Относительная степень перемещения растворенных молекул в хроматографическом эксперименте обозначены значениями R_f . Значение R_f для компонента определяется как отношение расстояние, перемещенное этим конкретным компонентом, деленное на расстояние, перемещенный растворитель [6, С. 331-333]:

$$R_f = \frac{l}{L},$$

где L – расстояние от линии старта до линии финиша, l – расстояние от линии старта до центра пятна.

Разделительная способность R_s показывает разделение центров соседних пятен, зависит от селективности и от факторов:

$$R_s = \frac{2\Delta x}{y_1 + y_2}.$$

Если $R_s = 1$, то происходит полное разделение, если $R_s = 0,8$ – удовлетворительное, если $R_s < 0,8$ – начинается пересечение.

ВЭТТ – высота, эквивалентная теоретической тарелке:

$$ВЭТТ = \frac{y^2}{16x}.$$

Чем меньше ВЭТТ, тем эффективнее проходит хроматографический процесс.

4.2. Тонкослойная хроматография.

В методе ТСХ разделение веществ происходит в тонком слое стационарной фазы, нанесенной на носитель (подложка). В зависимости от состава слоя и применения реакции разделения веществ ТСХ может быть основана на механизмах: адсорбция, распределения, ионного обмена и т.д. В ТСХ адсорбент наносят на пластинку в виде тонкого слоя (0,1-1 мм). В качестве слоя адсорбента используются: силикагель, оксид алюминия, некоторые соединения ароматического ряда, целлюлоза. Подложка помещается в хроматографическую камеру с элюентом. Метод ТСХ дает возможность разделять смеси лекарственных веществ, идентифицировать их, устанавливать чистоту и осуществлять количественное определение компонентов. ТСХ имеет то преимущество, что позволяет разделять сложные лекарственные смеси на отдельные компоненты, близкие по химической структуре и свойствам, например смеси аминокислот, алкалоидов, барбитуратов, сульфаниламидов и др.

4.2.1. Качественный анализ глютаминовой кислоты

Для этого готовят тонкую пластинку из силикагеля, элюент, состоящий из 1 мл н-бутанола. 1 мл ледяной уксусной кислоты. 4 мл этанола. Далее капилляром наносят на линию старта пластинки раствор глютаминовой кислоты и помещают в хроматографическую камеру с элюентом. После достижения линии финиша пластинку опрыскивают раствором нингидрина для проявления пятен и измеряют величину R_f [7, С.14-15].

4.3. Аффинная хроматография, как метод определения стероидсвязывающих белков

Аффинная хроматография – это разновидность адсорбционной хроматографии. Разделение данным методом основано на различного специфических взаимодействиях, таких как связывание антигена с антителом, гормона с рецептором, фермента с его сорбентом. На практике применяют как иммобилизацию антигена на матрице, так и присоединение к матрице антител (Рис. 4.2):

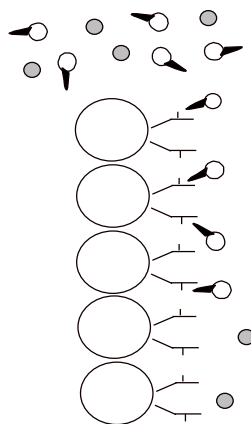


Рис. 4.2. Иммобилизация антигена на матрице.

Разделение по аффинной методике основано на специфических взаимодействиях: между гормоном и рецептором, ферментом и ингибитором и так далее. Для выделения фиксированных на адсорбентах аффинного типа (ААФТ) разнообразных стероидсвязывающих белков (в виде лигандбелкового комплекса) элюирование проводили восстановителями, например $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, количественно разрушающих азосвязи на ААФТ. Данный принцип выделения таких лигандбелковых комплексов был назван позже вариантом ковалентной АФХ. В дальнейшем в зонах разрыва появились и другие функциональные группы, и фрагменты молекул, например дигидроксифрагмент, дисульфидная связь.. Со временем, в методе КАФХ в качестве лигандов оказались задействованы и другие типы лекарственных средств: катехоламины, кортикостероиды, алкалоиды (тубокурарин) [8, С. 16-18].

4.4. Лигандная хроматография.

Лигандообменная хроматография основана на образовании координационных связей между сорбентом и разделяемыми ионами или молекулами. Лигандообменная хроматография применима только для разделения соединений, содержащих донорные гетероатомы или кратные связи. Ионы переходных металлов, находящиеся в неподвижной фазе, являются акцепторами электронов и легко вступают в координационное взаимодействие с электронодонорными атомами функциональных групп разделяемого соединения. Для проведения лигандного разделения необходимо наличие склонных к координации комплексообразующего катиона металла и органических соединений.

Лигандообменную хроматографию применяют для разделения в водной среде соединений, представляющих большой интерес для органической химии и биохимии: углеводов, белков, аминов, аминокислот, нуклеотидов, пептидов. При этом в качестве комплексообразующих используют ионы меди, цинка, кадмия, никеля, серебра и железа. Разделение рацематов α -аминокислот методом лигандообменной хроматографии показано на Рис. 4.3 [9, С. 78-80].

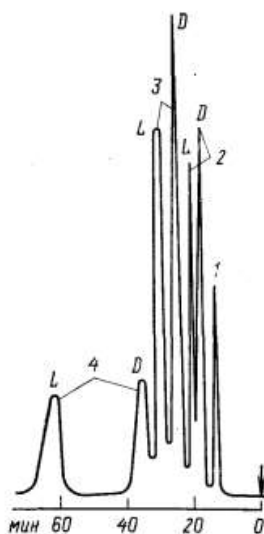


Рис. 4.3. Хроматограмма рацематов аминокислот, полученная на колонке размером 100 мм (стекло) с асимметрическим полистирольным сорбентом.

анионитом (7,5 мкм), подвижная фаза — 0,25 М ацетат натрия и $1,5 \cdot 10^{-3}$ М ацетат меди, рН=5,2, детектор—УФ (260 нм): 1 — лизин; 2 — аланин; 3 — серин; 4 — лейцин

4.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВЭЖХ – серийный метод определения органических соединений многих классов; его широко используют при анализе смесей аминокислот, белков, различных лекарственных средств с целью установления их подлинности, чистоты и количественного содержания. ВЭЖХ выполняется под повышенным давлением жидкости до 666,5 кПа (500 атм.).

Разделение смеси достигается за счет различия в сродстве компонентов смеси к неподвижной и подвижной фазам.

По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делятся на адсорбционную, распределительную, ионообменную и эксклюзивную.

В адсорбционной хроматографии разделение веществ, входящих в смесь и движущихся по колонке в потоке растворителя, происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться на поверхности адсорбента с развитой поверхностью, например SiO_2 .

В распределительной ВЭЖХ разделение происходит за счет различия в растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе, как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя, и подвижная фаза – растворителе.

4.5.1. Методика определение ибупрофена

Измерения проводятся в системе высокоэффективной жидкостной хроматографии ВЭЖХ, которая состоит из системного контролера, УФ-визионерского детектора и двух насосов.

Разрешающая способность рацемата ибупрофена изучалась с помощью термодинамических параметров. Подход Вант-Гоффа был использован для получения изменения энтальпии (ΔH) и изменения энтропии (ΔS). Аналогичный подход был использован для расчета разности изменения энтальпии ($\Delta\Delta H$) и изменения энтропии ($\Delta\Delta S$) для рацемического ибупрофена соответственно. Эти значения важны для получения изоэнантиоселективной температуры (T_{iso}). Определение этих параметров может быть основано на хроматографических параметрах, таких как селективность (a) и коэффициент удержания (k_i), который показывает отношение между числом аналитов в стационарной фазе и числом молекул в подвижной фазе. Для получения изоэнантиоселективной температуры необходимо знать пористость (ε), которая была определена методом моментного анализа.

Этот параметр записывается в терминах времени удержания аналита (t_{Ri}) и мертвого времени столбца (t_0):

$$k_i = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0} = \phi K_{D,i},$$

где ϕ представляет собой объемное фазовое отношение между объемом стационарной фазы и подвижной фазы, также равно $(1 - \varepsilon_i)/\varepsilon_i$.

Селективность (a) разделения двух компонентов определяется путем деления их коэффициентов удержания:

$$a = \frac{k_j}{k_i} = \frac{t_{Rj} - t_0}{t_{Ri} - t_0}.$$

Разрешение хроматографии (R_s) и количество пластин (N_i) являются другими важными параметрами для установления условия разделения:

$$R_s = \frac{\sqrt{N_i}}{4} \left(\frac{k_i}{k_i+1} \right) \left(\frac{a-1}{a} \right) = 1.177 \frac{t_{Rj}-t_{Ri}}{w_i+w_j},$$

$$N_i = 5.545 \left(\frac{t_{Ri}}{w_i} \right)^2,$$

где w_i находится ширина пика на половине высоты. Таким образом, на Рис. 3.6.6, первый пик — это R(-)-ибупрофен, а второй пик-S-(+) – ибупрофен [10, С. 3-9].

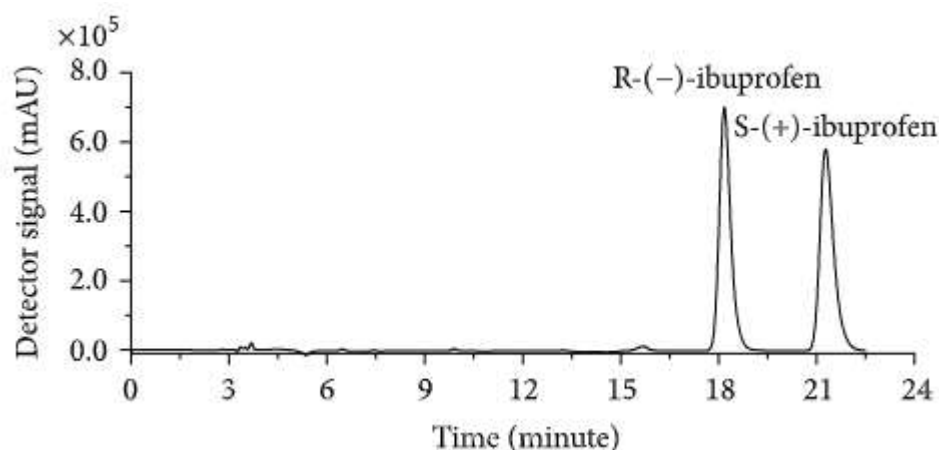


Рис. 4.4. Хроматограммы ибупрофена энантиомерного разрешения при 308,18 К.

4.6. Ионнообменная хроматография

Ионообменная хроматография – метод разделения, анализа и физико-химического исследования веществ, основой которого является эквивалентный обмен ионами раствора на ионы твердой фазы (ионообменная смола – ионообменник). Заряженные молекулы обратимо адсорбируются ионообменниками, так что молекулы могут связываться и элюироваться в зависимости от рН и ионного состава среды.

Неподвижная фаза представляет трехмерную структуру (матрицу), содержащую ковалентно связанные с ней заряженные группы. Применяются декстран, целлюлоза, сополимер стирола и дивинилбензола и силикагель.

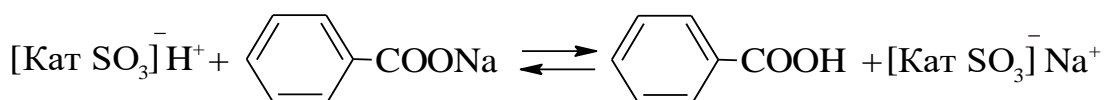
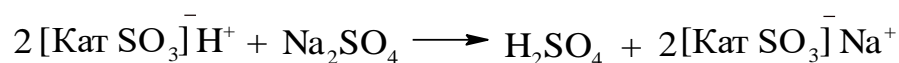
В фармацевтическом анализе ионообменная хроматография широко используется для количественного определения солей органических и

минеральных кислот, азотистых оснований и солей алкалоидов и других групп лекарственных веществ.

4.6.1. Количественное определение солей минеральных и органических кислот

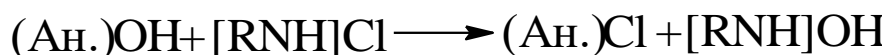
Точную навеску препарата (0,3-0,5 г) растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл и доводят водой до метки. 5 мл полученного раствора пропускают через колонку с катионитом со скоростью 20 капель в 1 мин, промывают водой (а при анализе солей органических кислот, например бензоата и салицилата натрия, - спиртом) до нейтральной реакции промывных вод и титруют выделившееся эквивалентное количество кислоты 0,1 н. раствором гидроксида натрия в присутствии соответствующего индикатора.

Катионный обмен протекает по реакции:



4.6.2. Количественно определяют соли алкалоидов и азотистые основания с помощью анионитов

Точную навеску исследуемой соли алкалоида (0,03-0,05 г) растворяют в 5 мл воды или спирта, подкисляют калей разведенной соляной кислотой, и раствор медленно пропускают через колонку с анионитом. При этом выделяется основание исследуемого алкалоида:



где Ан. – анионит; [RNH] – основание алкалоида.

Так как большинство оснований алкалоидов трудно растворимы в воде, для достижения полноты вымывания таких оснований обрабатывают анионит 5-6 раз 5мл 95% спирта, а затем 1-2 раза 5-10 мл воды до отрицательной реакции на основание анализируемой соли алкалоида. Для этого 3-4 мл последнего фильтрата упаривают до 2-3 капель и к остатку добавляют соответствующий реактив на исследуемое основание. После чего его определяют в фильтрате одним из аналитических методов [11, С. 58-59].

4.7. Гель-хроматография.

Принцип гель-хроматографии – разделение молекул в соответствии с их размерами. Молекулы с размерами, большими, чем размер пор не задерживаются частицами неподвижной фазы (эффект молекулярной эксклюзии или исключения). Молекулы же с меньшими размерами проникают в поры неподвижной фазы, и таким образом их движение по хроматографической колонке замедляется (Рис. 4.5).

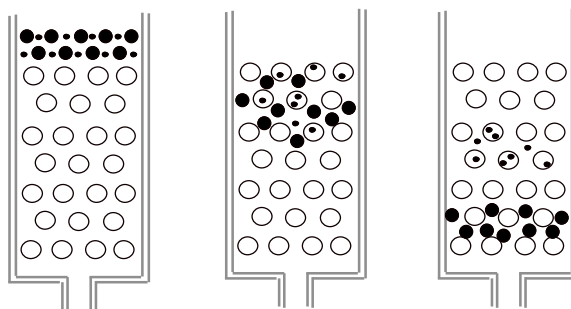


Рис. 4.5. Разделение двух типов молекул при прохождении через колонку, содержащую частицы пористого геля.

Молекулярную массу и ее распределение можно определить эксклюзивной хроматографией. Принцип метода заключается в том, что молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. Таким методом определяется молекулярно-массовое распределение декстранов и других полисахаридов [12, С. 3-5].

4.8. Осадочная хроматография

Осадочная хроматография – метод хроматографии, основанный на способности разделяемых веществ образовывать малорастворимые соединения с различными ПР. В качестве неподвижной фазы выступает инертный носитель, покрытый слоем осадителя; разделяемые вещества, находящиеся в подвижной фазе, вступают во взаимодействие с осадителем и образуют малорастворимые вещества – осадки. При дальнейшем пропускании растворителя происходят поочередно: растворение этих осадков, перенос вещества по слою неподвижной фазы, снова осаждение и т.д.

Различают колоночную и плоскостную осадочную хроматографию. В первом случае анализируемый раствор вводят в колонку, наполненную смесью носителя и осадителя. Капилляр, заполненный смесью носителя и осадителя, погружают в анализируемый раствор. К плоскостной осадочной хроматографии относят бумажную и тонкослойную хроматографию.

Основным применением осадочной хроматографии является анализ смесей неорганических соединений [13, С. 61-63].

5. ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Различные методы хроматографии за последние пять лет широко применяют в фармацевтическом анализе для идентификации и количественного определения лекарственных средств.

К примеру, для идентификации флавоноидов, содержащихся в экстракте лабазника вязолистного, используют хроматографию в тонком слое. 0,02 мл жидкого экстракта наносят на линию старта, затем помещают в камеру с со смесью растворителей хлороформа – этилового спирта 8:2, и хроматографируют восходящим способом. После пластинку сушат при комнатной температуре, опрыскивают 5% раствором хлорида алюминия в 95% растворе этилового спирта и нагревают в сушильном шкафу 5-10 мин при температуре 100 – 105 °С. На хроматограмме в видимом и УФ-свете при длине волны 360 нм должны обнаруживаться зоны адсорбции лимонно-желтого цвета с R_f около 0,20 (спиреозид), 0,25 (изокверцитрин) и 0,55 (авикулярин). На хроматограмме испытуемого раствора, кроме основных зон адсорбции, допускаются наличие дополнительных зон адсорбции, в том числе желтого цвета с R_f около 0,75 (кверцетин). Таким образом, разработаны унифицированная методика качественного анализа флавоноидов в экстракте лабазника вязолистного [14, С.42-43].

Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах проводят методом газожидкостной хроматографией. В работе используют хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, автоматическим пробоотборником, программируемым термостатом колонки, вводом проб с делением потока. В качестве фазы колонки используют полиэтиленгликоль, 5%-фенил – 95% метилсилоксан [15, С. 60-62].

Также проводят идентификацию и одновременное определение четвертичных аммониевых соединений с другими действующими веществами (бензокаин, грамицидин С, тиротрицин, фенотерол,

оксибупрокаин,) в лекарственных препаратах методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии. В работе используют ультравысокоэффективный жидкостной хроматограф в сочетании с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором и электрораспылительную ионизацию. Разделение проводят на колонке в режиме градиентного элюирования. Низкие значения pH подвижной фазы исключают возможность перехода аналитов в основную форму. Таким способом получают ионные соединения, которые обладают различной полярностью. Впоследствии эти соединения разделяются методом обращенно-фазовой УВЭЖХ в градиентном режиме элюирования. Варьированием содержания органической составляющей в системе подвижных фаз можно эффективно регулировать время удерживания, которое зависит от сродства гидрофобных и гидрофильных групп молекул определяемых компонентов к сорбенту неподвижной фазы. В качестве неподвижной фазы используют растворы 0,1% муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Идентификацию определяемых соединений в анализируемых лекарственных препаратах проводили по полученным хроматограммам. Идентификационными параметрами служили точность моноизотопной массы иона (m/z) (± 5 ppm), времена удерживания ($\pm 0,2$ мин), и $mSigma$ (<20). Параметр $mSigma$ характеризует соответствии теоретического изотопного распределения практическому. Таким образом, возможно использовать метод УВЭЖХ в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения для идентификации и одновременного определения четвертичных аммониевых соединений [16, С. 56-60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важнейшей задачей современной химии являются хроматографический анализ лекарственных средств, подтверждающий качественно подлинность и количественно определяющий содержание того или иного препарата. В исследуемую группу хроматографического анализа попадают виды газовой и жидкостной хроматографии.

В процессе написания курсовой работы были выполнены все задачи, поставленные в начале изучения объекта и предмета исследования. Было обнаружено в современных условиях разнообразие методов газовой и жидкостной хроматографии для определения лекарственных препаратов.

Можно сделать вывод, что изучение классификации методов газовой и жидкостной хроматографии должно войти в перспективные изучаемые области современной химии. Хроматографический анализ имеют важную роль в различных областях. Дальнейшее развитие определение подлинности лекарственных средств при помощи хроматографии позволит совершить современной науке прорыв.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ

1. Конюхов В.Ю. Хроматография [Электронный ресурс]: учебник для бакалавриата, магистратуры, специалитета / В.Ю. Конюхов. – СПб.: ЛАНЬ, 2012. – 224 с. – Режим доступа к учебнику: <https://e.lanbook.com/reader/book/4044/#10> – 21.11.2020.
2. Пахомов П.М. Физические методы исследования Учебное пособие / П.М. Пахомов, С.Д. Хижняк, Я.В. Андрианова – Тверь.: ТвГУ, 2020 – 292 с.
3. Литвинова Т.Н. Химия. Основы химии для студентов медицинских вузов [Электронный ресурс]: учебник для вузов/ Т.Н.Литвинова, В.В. Хорунжий – СПб.: ЛАНЬ, 2020. – 524 с. – Режим доступа к учебнику: <https://e.lanbook.com/reader/book/152648/#430> – 21.11.2020.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1-3. М.; 2015.– . – Режим доступа к учебнику: <https://pharmасороеia.ru/ofs-1-2-1-2-0004-15-gazovaya-hromatografiya/> – 23.11.2020.
5. Тыжигирова В.В. Газовая хроматография. Краткая характеристика метода и его применение в фармацевтическом анализе [Электронный ресурс]: Учебное пособие/ В. В. Тыжигирова. – ИРКУТСК: ИГМУ, 2016.– 32 с. – Режим доступа к учебному пособию https://mir.ismu.baikal.ru/src/downloads/0c969d9cgazovaya_hromatografiya_2016.pdf – 23.11.2020.
6. Шекеева К.К. Технология определения аминокислот бумажной хроматографией [Электронный ресурс]: Журнал Вестник КазНМУ / К.К. Шекеева – КАЗАНЬ.: КазНМУ, 2018. – №1. – 3 С. – Режим доступа к статье: <https://cyberleninka.ru/article/n/tehnologiya-otdeleniya-aminokislot-bumazhnoy-hromatografiye/viewer> – 24.11.2020.
7. Вергун О.М. Хроматографические методы анализа [Электронный ресурс]: практикум для студентов фармацевтического факультета/ О.М. Вергун, Н.Д. Яранцева – МИНСК: БГМУ, 2018. – 30 с. – Режим доступа к

практикуму: <http://rep.bsmu.by/bitstream/handle/BSMU/20068/978-985-567-956-2.Image.Marked.pdf?sequence=1&isAllowed=y> – 25.11.2020.

8. Кузнецов П.В. К проблеме современного применения лекарственной аффинной хроматографии в медицине и фармации [Электронный ресурс]: Журнал Медицина в Кузбассе Т13 / П.В. Кузнецов, Л.С. Теслов – СПб.: СПХФА, 2014. – №3. – С. 20. – Режим доступа к статье: <https://cyberleninka.ru/article/n/k-probleme-sovremennogo-primeneniya-lekarstvennoy-affinnoy-hromatografii-drug-affinite-chromatography-v-meditseini-farmatsii/viewer> – 26.11.2020.

9. Стыскин Е.Л. Практическая Высокоэффективная жидкостная хроматография [Электронный ресурс]: Учебник/ Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде – М.: Химия, 1986. – 85 с. – Режим доступа к практикуму: <http://www.hplc.ru/hplcbook.pdf> – 26.11.2020.

10. Thermodynamic Study of Racemic Ibuprofen Separation by Liquid Chromatography Using Cellulose-Based Stationary Phase [Электронный ресурс]: журнал международных исследований хроматографии / Wilson M. Ferrari, Ana C. Nascimento, Jean V. Moreira, and Marco A. Cremasco – М.: Chemical Engineering School, University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein 500, Zip Code 13083-852, Campinas, SP, Brazil, 2016. – 10 с. – Режим доступа к статье: <https://www.hindawi.com/journals/cr/2016/7484731/> – 27.11.2020

11. Малентьева Г.А. О.М. Фармацевтическая химия [Электронный ресурс]: Учебник для фармацевтического факультета/ Г.А. Малентьева, Л.А. Антонова – М.: Медицина, 1985. – 480 с. – Режим доступа к учебнику: <https://www.chem21.info/page/122025116214044075003089148009007228015215197190/> – 25.11.2020.

12. Р.С. Смирнов Методические особенности определения молекулярно-массового распределения декстранов методом гель-проникающей (эксклюзивной) хроматографии в нормативной документации на лекарственные средства различных групп [Электронный ресурс]: Журнал Методология экспертизы средств медицинского применения /Смирнов Р.С.,

Иванайнен Е.В., Лутцева А.И., Ваганова О.А., Орлов Д.А. – 2017. – №1. – 8 С. – Режим доступа к статье: <https://cyberleninka.ru/article/n/metodicheskie-osobennosti-opredeleniya-molekulyarno-massovogo-raspredeleniya-dekstranov-metodom-gel-pronikayuschey-eksklyuzionnoy/viewer> – 27.11.2020.

13. Белявская Т.А. Хроматографический анализ неорганических веществ [Электронный ресурс]: Практикум по хроматографическому анализу / Т.А. Белявская, Т.А. Большова – М.: МГУ, 1970. – 240 с. – Режим доступа к практикуму: – <https://www.chem21.info/page/085049177016193166194166187168151184139008145034/> – 28.11.2020.

14. Шилова И.В. Технология и стандартизация экстрактов лабазника вязолистного [Электронный ресурс]: Журнал Химико-фармацевтический / И.В. Шилова, Т.Г. Хоружая, И.А. Самылина – 2015. – №5. – 5 С. – Режим доступа к статье: <http://chem.folium.ru/index.php/chem/article/view/949/2292> – 30.11.2020.

15. Колесникова О.Н. Разработка и валидация методики количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах [Электронный ресурс] Журнал Химико-фармацевтический / О.Н. Колесникова, О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова – 2018. – №5 – 5 С. – Режим доступа к статье: <http://chem.folium.ru/index.php/chem/article/view/4480/2929> – 30.11.2020.

16. Амелин В.Г. Идентификация и одновременное определение четвертичных аммониевых соединений с другими действующими веществами в лекарственных препаратах методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии [Электронный ресурс]: Журнал Химико-фармацевтический / В.Г. Амелин, Д.С. Большаков – 2020. – №1 – 7 С. – Режим доступа к статье: <http://chem.folium.ru/index.php/chem/article/view/4911/3266> – 30.11.2020.