

Методы фармакопейного анализа

Газовая хроматография

ОФС.1.2.1.2.0004.15

Газовая хроматография

Это физический способ разделения летучих соединений, основанный на распределении веществ между двумя фазами, одна из которых является неподвижной (жидкая или твердая), а вторая – подвижна (газ-носитель). Анализируемую пробу вводят в подвижную фазу и она перемещается вдоль неподвижной

Газовая хроматография

Газоадсорбционная хроматография

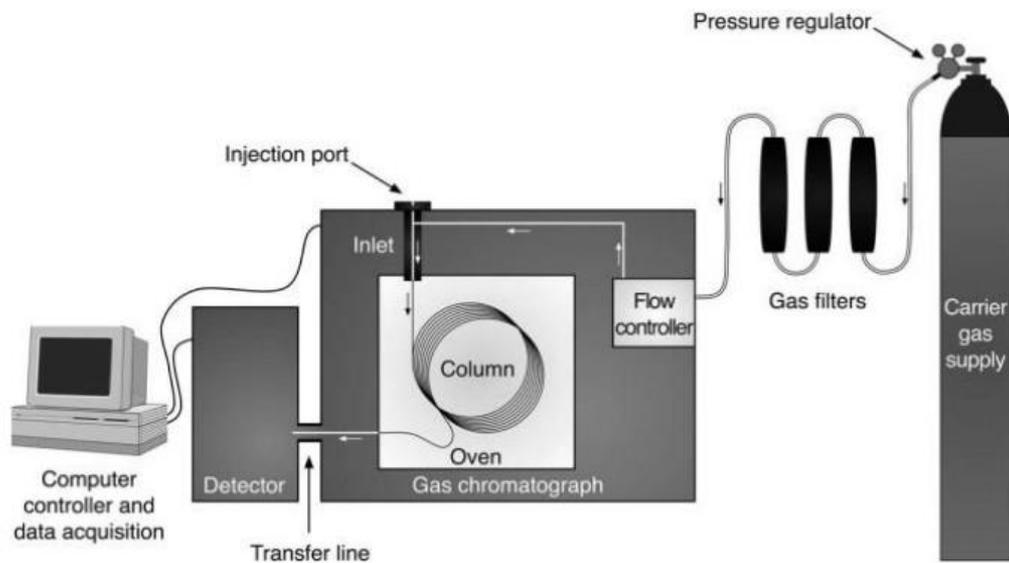
Неподвижная фаза – сорбент (силикагель, графитированная термическая сажа, алюмосиликаты натрия и кальция, полимерные пористые сорбенты)

Газожидкостная хроматография

Неподвижная фаза – слой жидкости, нанесенный на поверхность твердого носителя

Подвижная фаза – газ (азот, гелий, аргон или водород)

Схема газового хроматографа



- Газ-носитель (азот, гелий) из баллона поступает в блок подготовки газов (измеряются давление и скорость потока газа-носителя), проходит через испаритель, хр. колонку, детектор (находятся в термостате) и регистратор

- В испаритель с температурой, достаточной для испарения смеси, с помощью микрошприца вводится проба анализируемого вещества, которая испаряется и потоком газа уносится в хроматографическую колонку. После разделения в колонке компонентов на зоны, они проходят детектор, в котором генерируется электрический сигнал и регистрируется в виде хроматограммы

Устройство ввода пробы



Жидкая проба – с помощью шприца в колонку или испарительную камеру

Газовая фаза – с помощью оборудования для статического или динамического парофазного анализа

Статический парофазный анализ – в термостатируемую камеру помещают герметично закрытый сосуд, содержащий образец, нагревают до достижения равновесия между двумя фазами, отбирается объем газовой фазы и вводится в испаритель хроматографа.

Динамический парофазный анализ – через образец пропускают инертный газ, летучие компоненты концентрируются на сорбенте в ловушке, ловушка нагревается, летучие компоненты переносятся с потоком инертного газа в хроматографическую колонку

Колонки

	Насадочные колонки	Микронасадочные колонки	Капиллярные колонки	Поликапиллярные колонки
Материал	Металл, стекло, фторопласт (спиральная форма)	Металл, стекло, фторопласт (спиральная форма)	Плавленый кварц или металл	Пакеты параллельно работающих капилляров
Внутренний диаметр	2-4 мм	0,5-1 мм	0,1-0,53 мм	40 мкм
Длина	0,5-5 м	0,5-2 м	5-200 м	До 1 м
Скорость потока газа-носителя	10-60 мл/мин	10-60 мл/мин	1-5 мл/мин	1-5 мл/мин

Детекторы

Выбор детектора определяется основными характеристиками (чувствительность, предел детектирования, линейность, быстродействие и селективность), которые соответствуют цели анализа и условиям его проведения.

Типы детекторов:

1. Пламенно-ионизационный детектор
2. Детектор по теплопроводности
3. Термоионный детектор
4. Электронно-захватный детектор
5. Масс-спектрометрический детектор

Нормы при работе на газовом хроматографе



- эксплуатация хроматографа осуществляется в закрытых лабораторных помещениях, в которых горючие газы и легковоспламеняющиеся жидкости могут быть в количествах, недостаточных для создания взрывопожароопасной смеси
- помещения должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, средствами пожаротушения, индивидуальными средствами защиты
- для размещения одного комплекса глубина рабочего стола должна быть не менее 80 см, ширина не менее 180 см
- компрессор, во избежание влияния его вибраций на работу хроматографа, рекомендуется размещать вне рабочего стола



Режимы хроматографирования

- ❑ Изократический режим – на протяжении всего хроматографического процесса состав подвижной фазы и параметры хроматографирования остаются постоянными
- ❑ Градиентный режим – состав подвижной фазы и параметры хроматографирования меняются в ходе анализа

Применение в фармакопейном анализе

- определение остаточных органических растворителей
- количественное определение
- посторонние примеси
- однородность дозирования
- растворение

Остаточные органические растворители

ОФС.1.1.0008.15

Остаточные органические растворители

Летучие растворители, которые используются или образуются на любой стадии производства фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ, или лекарственного препарата и полностью не удаляются после завершения технологического процесса.

Классификация

Класс	Описание	Примеры	Определение
1 класс Высокотоксичные растворители (генотоксичные канцерогены)	Применяют в исключительных случаях	Бензол, 1,1 – дихлорэтан, 1,2 – дихлорэтан, 1,1,1 – трихлорэтан, четыреххлористый углерод	Каждый должен быть идентифицирован и определен количественно
2 класс Негенотоксичные растворители	Нормирование обусловлено максимально допустимым количеством	Ацетонитрил, гексан, диметилформамид, метанол, метиленхлорид, пиридин, толуол, хлорбензол, хлороформ, циклогексан, этиленгликоль	Каждый должен быть идентифицирован и определен количественно
3 класс Растворители низкой токсичности	Содержание до 0,5 % не требует подтверждения	Ацетон, бутанол, бутилацетат, гептан, диметилсульфоксид, диэтиловый эфир, изобутилацетат, изопропилацетат, муравьиная кислота, метилацетат	Если суммарное содержание не превышает 0,5 % - потеря в массе при высушивании, если больше 0,5 % - каждый должен быть идентифицирован и определен количественно

Количественный хроматографический анализ

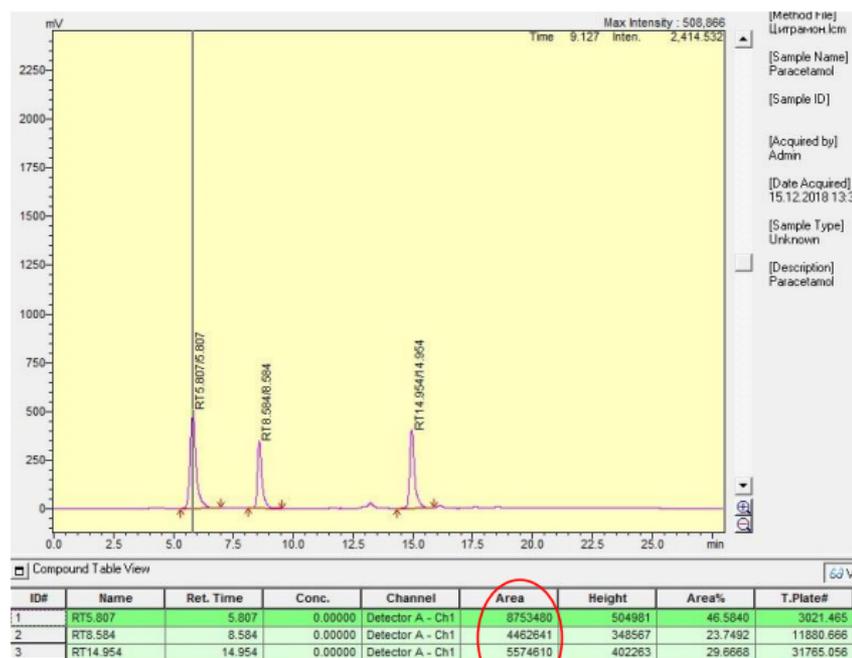
Основан на допущении, что площадь пика на хроматограмме, соответствующая данному компоненту, прямо пропорциональна его количеству

Способы измерения площади пика:

1. Проводят касательные к тылу и фронту пика и соединяют их линией, параллельной нулевой линии

Площадь полученного треугольника составляет 96% от истинной и пропорциональна количеству вещества в пробе

2. Для расчета площади симметричных пиков находят произведение высоты пика на его полуширину (84% площади пика)



Способы расчета концентрации

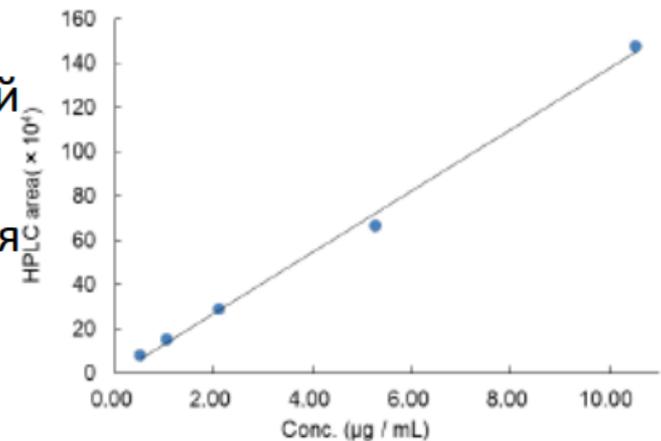
1. Метод абсолютной калибровки (градуировки)

Готовится серия эталонных растворов с известной массой определяемого компонента

Каждый эталонный раствор хроматографируется и определяется площадь пика

Строится график S_x — m компонента

Хроматографируется раствор с неизвестной концентрацией, определяется площадь пика и по графику находится масса анализируемого компонента



Способы расчета концентрации

2. Метод внутренней нормализации

На одной и той же хроматограмме измеряют площади всех пиков и находят их сумму

Основан на предположении, что на хроматограмме зарегистрированы все вещества, входящие в состав анализируемой смеси, и что доля площади каждого пика от суммы площадей всех пиков соответствует содержанию вещества в массовых процентах.

$$X_i = \frac{S_i \cdot 100}{\sum_{i=1}^n S_i},$$

Способы расчета концентрации

3. Метод внутреннего стандарта

Готовят эталонную смесь (включает массу определяемого компонента и точно известную массу стандарта). Смесь хроматографируют и сравнивают площади пиков определяемого вещества и стандарта

Т.к. площадь пика пропорциональна массе вещества:

$$C_x = f_x \cdot \frac{C_{st} \cdot S_x}{S_{st}}$$

C_x – концентрация анализируемого раствора

f_x – коэффициент пропорциональности

C_{st} – концентрация стандартного раствора

S_{st} – площадь пика стандартного раствора

Способы расчета концентрации

4. Метод внешнего стандарта. Концентрацию испытуемого вещества определяют путем сравнения сигнала (пика), полученного на хроматограммах испытуемого раствора, сигнала, полученного на хроматограммах раствора стандартного образца.

$$C_x = \frac{C_{st} \cdot S_x}{S_{st}}$$

Задача

Хроматографированию подвергнут образец мятного масла. На хроматограмме имеются следующие пики: 1-й (не идентифицирован) площадью 113 мм^2 , 2-й (не идентифицирован) - 225 мм^2 , 3-й (ментон) - 246 мм^2 , 4-й (ментилацетат) - 384 мм^2 , 5-й (ментол) - 1130 мм^2 . Рассчитайте содержание свободного ментола в образце.

Решение

$$w(\text{menthol}), \% = \frac{S_5}{S_1 + S_2 + S_3 + S_4 + S_5} \cdot 100$$

$$\begin{aligned} w(\text{menthol}), \% &= \frac{1130}{113 + 225 + 246 + 384 + 1130} \cdot 100 \\ &= 53,86\% \end{aligned}$$

Задача

Для хроматографирования была взята смесь 0,1098 г камфоры и 0,1188 г нафталина - внутреннего стандарта. Площади полученных пиков: 5010 мм² - камфора, 58740 мм² - нафталин. Рассчитайте содержание камфоры в образце, если коэффициент пропорциональности равен 1,063.

Решение

$$w(\text{camphor}), \% = f_x \cdot \frac{mst \cdot Sx}{Sst \cdot ax} \cdot 100$$

$$\begin{aligned} w(\text{camphor}), \% &= 1.063 \cdot \frac{0.1188 \cdot 5010}{58740 \cdot 0.1098} \cdot 100 \\ &= 9.81\% \end{aligned}$$