



Интегрисане академске студије фармације

Обрада резултата мерења- И16

**П5. Инструменталне хроматографске методе
(теоријске основе, подела).
Израчунавања у гасној и течној
хроматографији.**

Проф. др Недељко Манојловић

Хроматографија

- **Хроматографија** је поступак који омогућава раздвајање, изоловање, идентификацију и одређивање састојака смеше на основу процеса који се дешавају на граници две фазе које се не мешају.
- Идентификација се врши на основу R_f вредности или ретенционог времена (t_R).
- **Стационарна фаза** може бити порозно или гранулисано чврсто тело, течност, танак слој течности апсорбован на чврстом телу.
- **Мобилна фаза** може бити гас или течност.

Врсте хроматографија

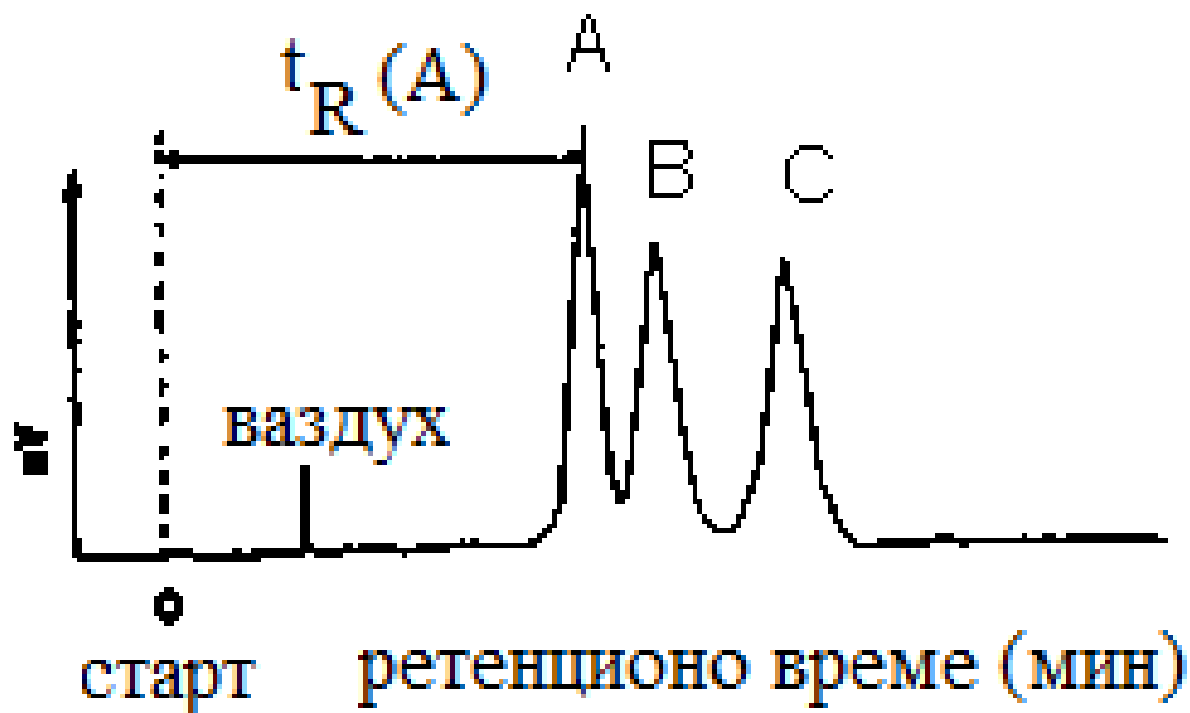
Врсте хроматографија:

- Хроматографија на хартији
- Хроматографија на танком слоју (*thin layer chromatography*, TLC)
- Дензитометријска TLC хроматографија
- Хроматографија на колони (*column chromatography*, CC)
- Гасна хроматографија (*gas chromatography*, GH)
- Течна хроматографија (*high performance liquid chromatography*, HPLC)

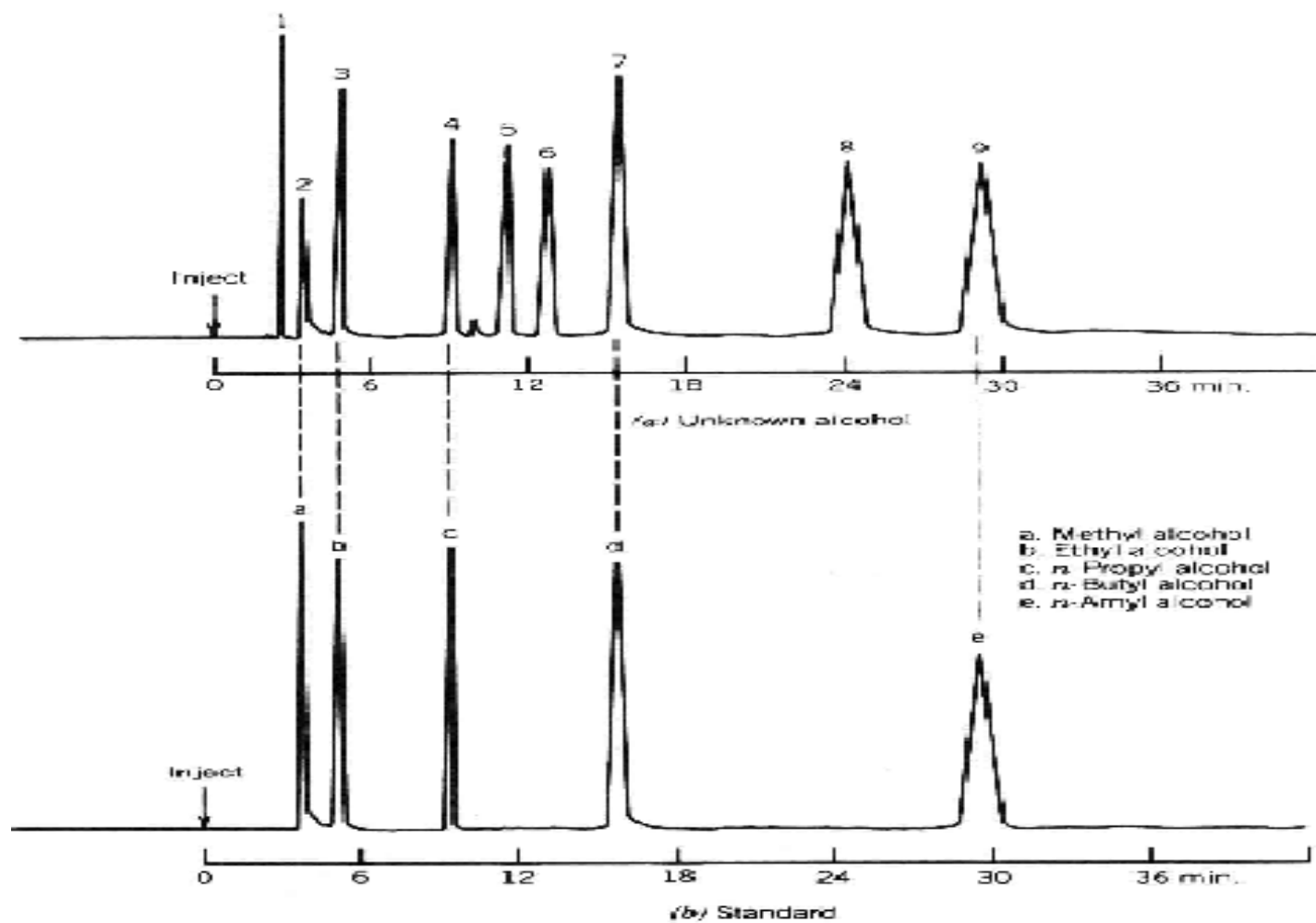
Гасна хроматографија (ГН)

- **Гасна хроматографија (ГН)**
- Гасна хроматографија је техника раздвајања која региструје количину компоненте која је елуирала из хроматографског система. Као **мобилна фаза** користи се гас (носећи гас) који мора да буде инертан, He, H₂, Ar, N₂, док се као **стационарна фаза користи** чврст носач или течност нанета на чврсту инертну подлогу или течни слој равномерно нанесен на зидове колоне (налази се у колони).

Ретенционо време (t_R)



Гасни хроматограм трокомпонентне смеше (А, В и С)



Пример употребе методе поређења

Обрада резултата мерења

Квантитативна гасно-хроматографска анализа

- **Квантитативна гасно-хроматографска анализа** заснива се на зависности површине апсорпционих максимума од њихове концентрације.
- Уколико не би било неких ограничења, прецизним мерењем површина испод максимума, могло би методом интерне нормализације површина без тешкоћа да се израчуна процентни састав смеше.
- Пошто постоје бројна ограничења, да би се компензовале грешке до којих долази из наведених разлога, развијене су следеће квантитативне методе: примена корекционих фактора, метода интерног стандарда, метода стандардног додатка и метода директне калибрације.

Метода нормализације површина

Процентни састав анализиране смеше одређује се деобом површине сваког максимума сумом свих површина и множењем са 100:

На пример, за компоненту А, проценат се израчунава према следећем изразу:

$$\% A = PA / PA+PB+PC+PD * 100$$

Метода нормализације површина

- Метода је веома брза и једноставнија у поређењу са осталим квантитативним методама и погодна је и због тога што није неопходно да се води рачуна о запремини узорка који се убризгава.
- Најтачнији резултати се добијају код анализе смеше сродних једињења блиских тачака кључања, пошто су у тим случајевима задовољене основне претпоставке на којима се заснива овај поступак: приближно једнака осетљивост детектора у односу на све компоненте и елуирање и детекција свих једињења.

Примена корекционих фактора

- Површине максимума у гасном хроматограму нису директно пропорционалне процентном саставу, па је неопходно да се за свако једињење (за сваку врсту детектора) одреде корекциони фактори.
- За то је потребно да се предходно припреме стандардни раствори који садржи познате, приближно једнаке тежинске концентрације ових једињења и неког једињења које се користи као стандард.
- Корекциони фактори се одређују у односу на стандард, при чему се када се користи пламено-јонизациони детектор, као стандард користи бензен.

- Следећа фаза је хроматографисање тачно одмерене запремине стандардног раствора. На тај начин су познате тежине (T_i) свих убризганих једињења.
- У хроматограму ове смеше измере се површине свих максимума (P_i), а затим се свака од њих дели одговарајућом тежином.
- Корекциони фактори (F_i) израчунавају се деобом ових количника (за свако једињење) количником за стандард:

$$F_i = (P_i / T_i) / (P_s / T_s)$$

Тежина (Ti)

- Тежина (Ti) било које компоненте израчунава се из израза:

$$T_i = (P_i / F_i) * (T_s / P_s)$$

- Када се ово уврсти у израз за израчунавање тежинског процента, на пример, компоненте А у четворокомпонентној смеси А+В+С+D, након скраћивања величине (Ts/Ps) добија се:

$$\text{Теж. \% A} = \frac{P_A / F_A}{P_A/F_A + P_B/F_B + P_C/F_C + P_D/F_A} * 100$$

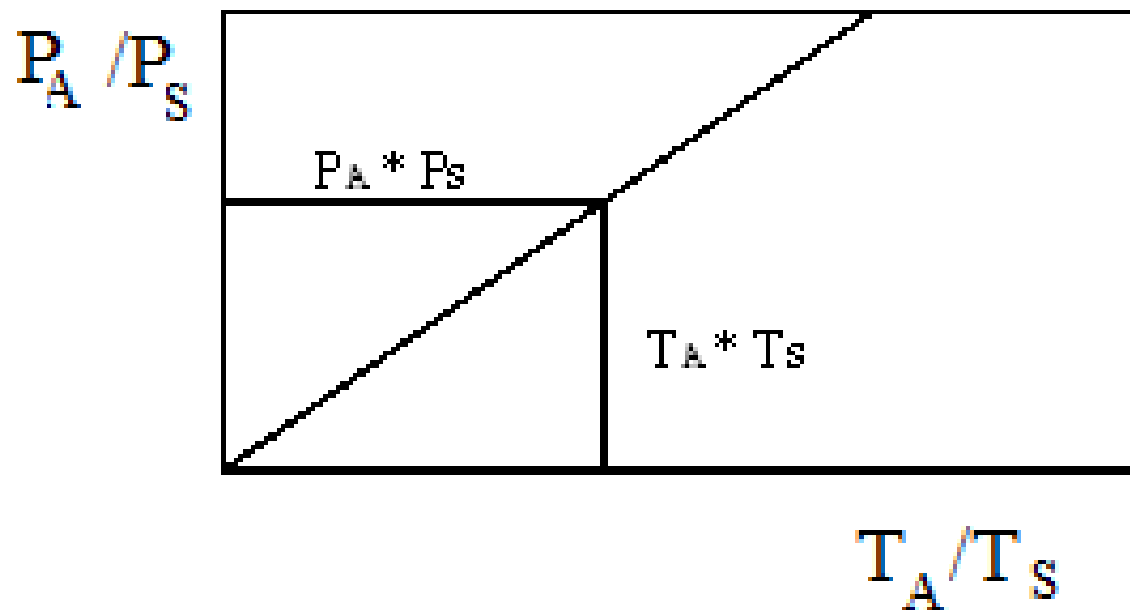
- Неопходно је да детектор увек ради под истим условима, да би овако одређени фактори могли да се користе дуже времена, То су, код термопроводљивог детектора температура, брзина протока носећег гаса и струја кроз влакна отпорника.
- Када се примењује пламено-јонизациони детектор, основно је да брзина протока водоника и ваздуха остану непроменљиве у свим анализама.
- Деобом површина одговарајућим корекционим факторима компензују се само грешке до којих долази услед различитих осетљивости детектора у односу на различита једињења.

Метода интерног стандарда (релативна или индиректна калибрација)

- Ова метода даје најтачније резултате и обухвата предходну припрему калибрационих криви за свако једињење чија се концентрација одређује. Интерни стандард је потребно да задовољи више услова, од којих су најважнији:
- Добра растворљивост у анализираној смеши – најбоље је да буде хемијски сличан компонентама које се одређују хемијска инертност у односу на састојке смеше
- Његов R_N максимум не сме да се преклапа ни са једним из анализиране смеше, међутим пожељно је да има ретенционо време блиско ретенционим временима компоненти

Метода интерног стандарда

- Припреми се више раствора који садрже различите тежинске односе – компоненте према стандарду.
- Обично се подешава да сви раствори садрже исту количину стандарда.
- Ови раствори се хроматографишу, одређују се површине под максимумима (P_A и P_s), а калибрациона крива конструише наношењем количника P_A/P_s у зависности од T_A/T_s .

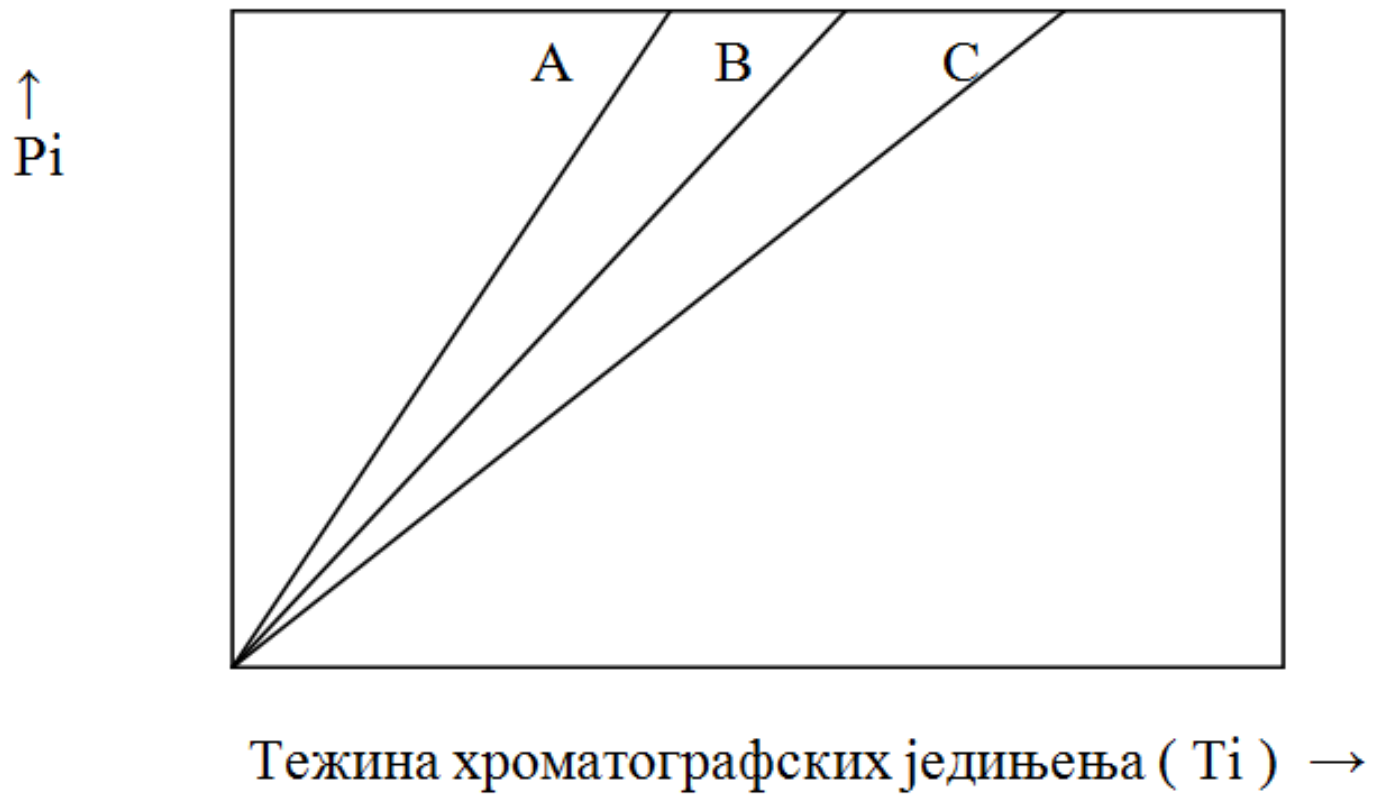


Метода интерног стандарда

- Након прављења калибрационе криве (за свако једињење које се одређује), непознате концентрације се мере тако што се у узорак дода одмерена количина стандарда. Узорак се затим хроматографише на исти начин као и стандардни раствори.
- Измере се површине ГН максимума, а на основу њиховог односа, добија се из калибрационе криве одговарајућа вредност количника непознате тежине компоненте А и познате тежине додатог стандарда.
- Добра страна методе је велика тачност, као и чињеница да није неопходно да се у гасни хроматограф увек убризгају исте запремине.
- Поред тога, промена услова хроматографисања (температуре колоне, детектора и испаривача, као и проток носећег гаса) не утиче битније на тачност резултата.

Метода апсолутне калибрације

- И ова метода захтева припрему калибрационих криви за сваку компоненту која се квантитативно одређује. Калибрационе криве се припремају тако што се познате количине свих једињења која се мере хроматографишу, а затим се измерене површине испод максимума графички представљају у зависности од тежина.



- Анализа се састоји у хроматографисању тачно одмерене количине узорка, мерењу површина испод сигнала и одређивању непознатих тежина из дијаграма.
- Тежински проценти се израчунавају на једноставан начин деобом нађених тежина укупном тежином убризганог узорка (* 100).
- Мана ове методе је сто је неопходна потпуна репродукција услова под којима је прављена калибрациона крива (температуре детектора, брзина протока носећег гаса и јачина струје кроз влакна отпорника код термопроводљивог детектора, односно брзина протока носећег гаса, водоника и ваздуха код пламено-јонизационог детектора).
- Поред тога, за разлику од методе интерног стандарда неопходно је да се убризга увек прецизно измерена позната количина узорка.

ВИСОКОЕФИКАСНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА (HPLC)

Одређивање морфина и кодеина у сировом опијуму, *Opium crudum*, методом HPLC

- *Раствор за испитивање.* 1,00 g сировог опијума, исеченог на танке кришке, меша се са 50 ml алкохола (50%, V/V) на ултразвучном купатилу 1 час, остави да се охлади и разблажи до 100,0 ml истим растварачем. Остави се да стоји.
- У 10,0 ml супернатанта дода се 5 ml амонијум-хлорид пуфер раствора рН 9,5, разблажи до 25,0 ml водом и измеша.

- 20,0 ml раствора стави се на колону дугу око 150 mm и унутрашњег дијаметра око 30 mm начињену од 15 g силикагела за хроматографију. Остави се да стоји 15 min. Елуира се два пута са по 40 ml смесе од 15 запремина 2-пропанола и 85 запремина метилен-хлорида. Елуат се упари до сува у вакууму на 40°-C. Остатак се пребаци у нормални суд помоћу мобилне фазе и разблажи мобилном фазом до 25,0 ml.
- *Раствор за поређење.* 0,100 g морфин-хидрохлорида и 25,0 mg кодеина раствори се у мобилној фази и мобилном фазом разблажи до 2,0 ml. 10,0 ml раствора разблажи се мобилном фазом до 100,0 ml.

Хроматографски услови

Хроматографски услови:

- колона дуга 0,25 m и унутрашњег дијаметра 4,6 mm пуњена октисилил-силикагелом за хроматографију (5 μ m), опремљена са претколоном дугом 40 mm и унутрашњег дијаметра 4,6 mm, пуњена октисилил-силикагелом за хроматографију (5 μ m),
- проток мобилне фазе 1,5 ml у минути; мобилна фаза: 1,0 g натријумхептансулфонатмонохидрата раствори се у 420 ml воде, подеси рН на 3,2 помоћу фосфорне киселине (4,9 g/l H_3PO_4) (око 5 ml) и дода 180 ml ацетонитрила,
- детекција се врши на 280 nm,
- ињектор у виду петље

- Инјектирати одговарајуће запремине оба раствора.
- Одређивање није валидно уколико резолуција између пикова који одговарају морфину и кодеину није најмање 2,5. Ако је потребно, уведе се ацетонитрил у мобилну фазу.
- Раствор за поређење се инјектира шест пута.
- Испитивање није валидно уколико релативна стандардна девијација површине пика морфина не износи максимално 1,0 %.
- Наизменично се инјектирају раствор за испитивање и раствор за поређење.
- Процентуални садржај сваког алкалоида израчунава се према изразу:

$$\frac{m_1 \times A_2 \times 625}{m_2 \times A_1 \times 5} \quad \times \quad \frac{100}{100 - h}$$

- m_1 = маса алкалоида у грамима употребљена за израду раствора за поређење
- m_2 = маса анализиране дроге у грамима употребљена за израду раствора за испитивање
- A_1 = површина пика одговарајућег алкалоида у хроматограму раствора за поређење
- A_2 = површина пика одговарајућег алкалоида у хроматограму раствора за испитивање
- h = губитак сушењем (проценат)

- 1 mg морфин-хидрохлорида одговара 0,759 mg морфина; 1 mg кодеина одговара 0,943 mg кодеина. Амонијум-хлорид-пуфер раствор рН 9,5: 33,5 g амонијум-хлорида раствори се у 150 ml воде, дода 42,0 ml концентрованог амонијака и разблажи водом до 250,0 ml.