

6. Практические работы

Работа 1. Газохроматографический метод определения содержания керосина в почвах и водах.

Важной экологической проблемой является контроль загрязнения почвы, поверхностных вод и воздуха различными видами топлива. Поскольку топлива представляют собой сложные смеси углеводородов для их разделения необходимо использовать капиллярные колонки, обладающие высокой эффективностью. Метод газожидкостной хроматографии на капиллярных колонках с пламенно-ионизационным детектором позволяет, как идентифицировать тип топлива, загрязняющего почву и воды, так и оценить его содержание.

Прежде всего, необходимо установить тип нефтепродукта, поскольку их состав может быть очень разным. Задачу идентификации топлив для установления источника загрязнения объектов окружающей среды можно решать, используя прием, названный методом “отпечатков пальцев”. При этом в качестве индивидуальных компонентов более рационально выбирать члены гомологического ряда *n*-парафинов, а группы компонентов - это нафтеновые и ароматические углеводороды, пики которых регистрируются между пиками *n*-парафинов (C_7-C_{10}). Для обнаружения того или иного топлива важно как общее количество пиков на хроматограмме, так и их расположение относительно пиков *n*-парафинов, и, кроме того, соотношение высот пиков различных компонентов.

После установления типа топлива по общему виду хроматограммы проводится оценка содержания топлива, для этого готовятся градуировочные смеси, наиболее целесообразно использовать смеси *n*-парафинов(C_7-C_{12}) в гексане, и по отношению суммы площадей *n*-парафинов(либо площади пика *n*-парафина выбранного в качестве

эталона) на хроматограммах исследуемого образца и стандартной смеси рассчитывают содержание топлива в анализируемом объекте.

Важной проблемой является правильность отбора проб образцов почвы, воды и, главное, возможность изменения состава отобранных проб при хранении. Для точной оценки содержания топлива в почвах и водах необходима их предварительная экстракция гексаном и хроматографический анализ полученного экстракта с использованием капиллярной газовой хроматографии в режиме программирования температуры в интервале от 90⁰С до 120⁰С.

Приборы и реактивы

Газовый хроматограф GC-17 фирмы «Шимадзу» с пламенно-ионизационным детектором.

Колонка капиллярная 30x0,32 мм, толщина пленки 1 мкм неподвижная фаза –95% полисилоксан и 5% фенилполисилоксан.

Температурный режим работы колонки:

начальная 60⁰С в течение 5 мин,

программирование 15⁰С/мин,

конечная 120⁰С в течение 10 мин.

Газ-носитель азот, скорость потока 2,0 мл/мин.

Температура детектора 150⁰С.

Температура испарителя 120⁰С.

Регистрирующая система – програмно-аппаратный комплекс «МультиХром».

Гексан, х.ч..

Гептан, для хроматографии.

Октан, для хроматографии.

Нонан, для хроматографии.

Декан, для хроматографии;

Додекан, для хроматографии.

Образцы керосинов Т-1, РГ-1 и бензина А95.

Стандартные образцы почвы, содержащие топлива Т-1, РГ-1 и бензин.

Механический вибратор.

Выполнение определения. Предварительно готовят раствор смеси предельных углеводородов (C₈-C₁₂) в гексане, с содержанием углеводородов: C₈ – 0,01 C₉-C₁₂ - 0,03 %об. соответственно.

2 мкл раствора водят в испаритель хроматографа, регистрируют хроматограмму, и определяют времена удерживания предельных углеводородов (t_R). По хроматограмме смеси углеводородов рассчитывают для них число теоретических тарелок (N), коэффициенты селективности (α), разрешение (R_S). Полученные результаты вносят в табл.27.

Таблица 27. Хроматографические параметры углеводородов

Углеводород	t _R , мин	N	α	R _S
Октан				
Нонан				
Декан				
Ундекан				
Додекан				

Готовят образцы почвы с содержанием определенного топлива (Т-1, РГ-1 или бензина) (3-4) мг/г: для чего 4 г почвы помещают в пенициллиновый пузырек с плотной пробкой и добавляют дозатором 100 мкл топлива.

К приготовленному образцу добавляют 10 мл гексана и экстрагируют углеводороды в течение 30 мин, встряхивая на механическом вибраторе. После отстаивания образец фильтруют через бумажный фильтр и трижды хроматографируют по 2 мкл экстракта.

Получают хроматограмму экстракта контрольного образца почвы, содержащего определяемое топливо. Продолжительность анализа 25 мин. Заполняют табл.28 с временами удерживания пиков на хроматограммах, полученных для исследуемого топлива.

Таблица 28. Времена удерживания хроматографических пиков (мин), зарегистрированных на хроматограмме образца топлива.

Номер пика	Время удерживания, мин	Соединение

Берут навеску ~ 4 г исследуемого образца почвы, и извлекают из него углеводороды экстракцией, как описано для контрольного образца почвы.

Получают хроматограмму экстракта, и, после идентификации на хроматограмме пиков предельных углеводородов, проводят количественную оценку содержания топлива в почве, сопоставляя сумму площадей пиков гептана, октана, нонана, декана и додекана на хроматограммах исследуемой почвы и контрольного образца почвы.

Содержание топлива в почве рассчитывают по формуле:

$$c_x \text{ (мг/г)} = c_{ст} \text{ (мг/г)} \times S_x/S_{ст} \text{ (мВ)},$$

где $c_{ст}$ – суммарная концентрация предельных углеводородов в контрольном образце, $S_{ст}$ – суммарная площадь пиков предельных углеводородов на хроматограмме контрольного образца, S_x – суммарная площадь пиков предельных углеводородов на хроматограмме анализируемой почвы.

Работа 2. Определение неорганических ионов в водах методом двухколоночной ионной хроматографии

Одним из параметров, по которому оценивается качество воды, является содержание в ней анионов. Ионная хроматография – наиболее экспрессный и чувствительный метод определения анионов. Порядок элюирования анионов зависит от их заряда и размера гидратированного

иона. Время удерживания анионов возрастает в ряду $F^- < Cl^- < NO_2^- < H_2PO_4^- < Br^- < NO_3^- < SO_4^{2-}$.

Приборы и реактивы

Ионный хроматограф с кондуктометрическим детектором.

Шприц медицинский.

Стандартные растворы фторида, хлорида, нитрита, фосфата и сульфата (100 мкг/мл).

Анализируемый образец воды.

Условия проведения анализа

Разделяющая колонка стальная 100x6 мм.

Неподвижная фаза: анионообменник Хикс зернением 10 мкм.

Подавляющая колонка: стальная 200x6 мм,

заполненная катионообменником КУ-2x8-Н.

Подвижная фаза водный раствор $2,5 \cdot 10^{-3}$ М по Na_2CO_3 и $5,0 \cdot 10^{-4}$ М по $NaHCO_3$

Ввод пробы: петля-дозатор на 20 мкл.

Регистрирующая система – программно-аппаратный комплекс «МультиХром».

Выполнение определения. Предварительно готовят подвижную фазу и дегазируют ее вакуумированием в течение 10-15 мин. Включают ионный хроматограф в сеть и прогревают в течение 30 мин, в это же время через колонку пропускают подвижную фазу для кондиционирования колонки. За “мертвое время” колонки принимают время выхода системного (инжекционного) пика.

Готовят 2 контрольные смеси анионов, содержащие фторид, хлорид, нитрат, нитрит, фосфат и сульфат ионы при концентрации: F^- - 2,5 и 5,0 мг/л; Cl^- - 5 и 10 мг/л; NO_2^- - 10 и 20 мг/л; NO_3^- - 25 и 50 мг/л; PO_4^{3-} - 50 и 100 мг/л; SO_4^{2-} - 25 и 50 мг/л соответственно.

Хроматографируют приготовленные контрольные смеси анионов. Определяют время удерживания, высоту и площадь пиков каждого из анионов.

В хроматограф вводят анализируемый образец воды, и регистрируют хроматограмму. Проводят идентификацию состава образца, и определяют концентрации анионов по формулам:

$$c_X = h_X c_{\text{стандарта}} / h_{\text{стандарта}} \quad \text{или}$$

$$c_X = S_X c_{\text{стандарта}} / S_{\text{стандарта}}$$

По хроматограмме одной из стандартных смеси при оптимальной скорости потока рассчитывают хроматографические параметры (факторы емкости, число теоретических тарелок на колонку и разрешение соседних пиков) разделения смеси

Результаты представляют в виде табл. 29:

Таблица 29. Хроматографические параметры анионов

Анион	t_R , сек	k	N	α	R_S	$S_{\text{пика}}$, мм·сек	$H_{\text{пика}}$, мм
Фторид							
Хлорид							
Нитрит							
Нитрат							
Фосфат							
Сульфат							

Работа 3. Определение фенолов в сточных и природных водах

Весьма распространенными экотоксикантами являются фенол и его хлорпроизводные. Эти соединения образуются в процессе производственной деятельности человека, в частности, в целлюлозно-бумажном производстве. Проведенные исследования показали, что для разделения хлорпроизводных фенола эффективно использовать в качестве подвижной фазы – смеси: (70,0:29,9:0,1) ацетонитрил:вода: H_3PO_4 .

Использование амперометрического детектора в высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет определять фенолы на уровне ПДК, даже в природных водах. В природных водах ПДК для фенола составляет 0,001 мг/л, *n*-хлорфенола – 0,002 мг/л, 2,4-дихлорфенола – 0,004 мг/мл, 2,4,6 – трихлорфенола – 0,006 мг/л и пентахлорфенола – 0,01 мг/л. Установлено, что максимальный сигнал регистрируется при потенциале стеклоуглеродного электрода – 1300 мВ относительно стального электрода сравнения.

В ряде случаев перед хроматографическим разделением фенолов необходимо использование сорбционного концентрирования. Наиболее эффективно сорбционное концентрирование фенолов на промышленно выпускаемых патронах Диапак-фенол. Высокие значения коэффициентов распределения фенолов на сверхсшитом полистироле (ССПС) позволяют практически количественно извлекать фенолы при помощи патронов Диапак – фенол из объемов водных растворов до 1 л. Для подавления диссоциации хлорзамещенных фенола растворы фенолов предварительно подкисляют соляной кислотой до значения рН 2,0 – 2,5. В указанных условиях степень извлечения фенола и его хлорзамещенных составляет 97±5 %.

Количественная десорбция наиболее сильно сорбируемых хлорзамещенных фенолов достигается 4,5 мл ацетонитрила. Более простым способом избежать процедуры размывания хроматографических пиков при определении фенолов в концентрате является разбавление элюата водой или буферным раствором.

Приборы и реактивы

Хроматографическая система, оснащенная насосом высокого давления «Марафон-2» («Аквилон», Россия), скорость подачи элюента 0,5-1,0 мл/мин; дозатором фирмы «Rheodyne», объем вводимой пробы 20 мкл; амперометрическим детектором фирмы «Biotronik» (Германия),

*ячейка – тонкослойная; режим – “DC”, диапазон измерения – 0,1 нА.
Рабочий электрод – стеклоуглеродный,
потенциал рабочего электрода 1000 мВ.
Электрод сравнения – хлоридсеребрянный.
Регистрирующая система – программно-аппаратный комплекс
«МультиХром».
Стальная колонка (150x4,6) мм, заполненная гидрофобизированным
силикагелем Диасорб-110-С₁₆ («Биохиммак», Россия).
Подвижная фаза – (50,0:49,9:0,1) ацетонитрил : вода : Н₃РО₄.
Стандартные растворы фенола, 2-хлорфенола и
2,4-дихлорфенола (100 мкг/мл) в воде.
Концентрирующий патрон Диапак-фенол («Биохиммак», Россия).
Ацетонитрил х.ч. («Криохром», Россия).
Ацетон, х.ч.*

Выполнение определения. Предварительно готовят серию растворов, содержащих смесь фенола, 2-хлорфенола и 2,4-дихлорфенола по (0,05; 0,08; 0,10; 0,15 мкг/мл) в подвижной фазе.

Последовательно хроматографируют все приготовленные растворы, для чего промывают петлю дозатора хроматографа анализируемым раствором, вводят пробу, регистрируют хроматограмму и определяют времена удерживания фенолов и площади их пиков.

По полученным данным строят градуировочные графики зависимости: площадь пика – концентрация, уравнения, которых заносят в табл.30. По одной из хроматограмм рассчитывают основные хроматографические параметры для разделяемой смеси: факторы емкости фенолов, число теоретических тарелок и величину разрешения для соседних пиков и заносят в табл.31.

Проводят определение фенолов в образце водопроводной или сточной воды. Определение фенолов в реальных образцах проводят после предварительного их сорбционного концентрирования на патронах Диапак-фенол, используя следующую методику концентрирования фенолов из водных растворов: предварительно отфильтрованную через

бумажный фильтр пробу воды объемом 50 мл подкисляют 1 М раствором соляной кислоты до pH 2,0-2,5. Концентрирующий патрон Диапак-фенол промывают последовательно 2 мл ацетонитрила и 5 мл дистиллированной воды, после чего прокачивают через патрон пробу воды при помощи шприца или перистальтического насоса со скоростью 3-4 мл/мин.

Патрон после пропускания пробы промывают 1 мл дистиллированной воды, выдавливают шприцем остатки жидкости и элюируют фенолы с патрона 2 мл ацетонитрила (в противотоке) с объемной скоростью не более 1 мл/мин. Полученный элюат разбавляют водой в два раза и трижды хроматографируют.

Таблица 30. Времена удерживания фенольных соединений и уравнения градуировочных зависимостей для них

№	Соединение	Время удерживания, мин	Уравнение градуировочной прямой
1.	Фенол		
2.	2-хлорфенол		
3.	2,4дихлорфенол		

Таблица 31. Хроматографические параметры разделения фенольных соединений

№	Соединение	Фактор емкости	Число теоретических тарелок на колонку	Разрешение
1.	Фенол			
2.	2-хлорфенол			
3.	2,4дихлорфенол			

По полученным хроматограммам идентифицируют в смеси фенол, 2-хлорфенол и 2,4-дихлорфенол, определяют площади их хроматографических пиков.

Содержание фенолов в воде определяют по методу градуировочного графика, используя ранее полученные зависимости. Для повторного использования патрон последовательно промывают водой, ацетоном, водой (по 5 мл).

Работа 4. Разделение анионов методом капиллярного электрофореза

Метод капиллярного электрофореза для определения концентрации неорганических анионов основан на их миграции и разделении под действием электрического поля вследствие их различной электрофоретической подвижности.

Для определения анионов в приборе необходимо установить источник высокого напряжения отрицательной полярности. Тогда электрод на входном конце капилляра будет катодом, а электрод выходного конца – анодом, и анионы будут мигрировать в сторону выходного конца, т.е. к детектору.

Фоновый (ведущий) электролит в случае анализа анионов должен удовлетворять нескольким обязательным условиям:

- он должен быть щелочным, так как большинство определяемых анионов являются анионами слабых кислот и как таковые существуют только в щелочных средах;
- основой электролита должен быть анион, хорошо поглощающий в области рабочих длин волн детектора, так как большинство анионов не обладают собственным поглощением, и их определение может быть проведено лишь косвенным методом;
- должно присутствовать вещество, с помощью которого можно обратить направление электроосмотического потока, т.к. в

противоположенном случае ЭОП, направленный к катоду, резко замедлит электромиграцию анионов к детектору;

– катионный компонент буферного раствора должен быть катионом достаточно сильного основания, и в то же время обладать малой подвижностью, чтобы обеспечить малую электропроводность раствора.

На практике рабочий буферный раствор состоит из смеси диэтаноламина (основание) и хромовой кислоты с добавкой катионного поверхностно-активного вещества бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ). Избыток диэтаноламина создает слабо щелочную среду ($\text{pH} \sim 9$), анион CrO_4^{2-} обеспечивает необходимое светопоглощение, а катион ЦТАБ, сорбируясь на поверхности кварцевого капилляра, перезаряжает поверхность на положительную, чем достигается изменение направления ЭОП.

Порядок выхода анионов следующий: хлорид, нитрит, сульфат, нитрат, фторид, гидрофосфат. После выхода гидрофосфата через некоторое время регистрируется пик гидрокарбоната, который присутствует во всех растворах и может служить признаком и сигналом окончания анализа.

На электрофореграммах как градуировочных, так и анализируемых растворов часто наблюдаются отрицательные пики. Их появление связано с тем, что в анализируемых растворах отсутствуют анионы, которые находятся в растворе фонового электролита. Первый такой пик, связанный с наличием в фоновом электролите бромид-иона, наблюдается между сигналами хлорида и нитрата

Идентификацию и определение анализируемых анионов проводят косвенным методом, регистрируя ультрафиолетовое поглощение на длине волны 254 нм, используя в качестве фонового хроматный электролит.

Приборы и реагенты

Электрофоретическая установка «Капель» со спектрофотометрическим детектором («Люмэкс», Россия) (рис. 44). Капилляр кварцевый длиной 1 м и внутренним диаметром 75 мкм. Ввод пробы давлением (30 мбар, 15 сек).

Регистрирующая система – програмно-аппаратный комплекс «МультиХром».

0,5 М раствор NaOH.

1 М раствор HCl.

0,025 М раствор оксида хрома(III).

0,05 М раствор диэтиламина.

Раствор бромидоцетилтриметиламмония (БЦТМА) (3 мг/мл).

Водный раствор аммиака (1:1).

Водный раствор уксусной кислоты (1:9).

0,01 М раствор Трилона Б.

Хроматный рабочий буферный раствор, содержащий

5 ммоль/л хрома(III), 20 ммоль/л диэтиламина и 1,65 ммоль/л БЦТМА.

Стандартные растворы хлорида, нитрата, сульфата, нитрата, фосфата и фторида (100 мг/мл).

Подготовка нового капилляра к работе (выполняется предварительно):

Капилляр промывают в следующей последовательности: раствором соляной кислоты в течение 30 мин, затем дистиллированной водой в течение 30 мин, далее раствором гидроксида натрия в течение 30 мин и затем 60 мин дистиллированной водой. Напоследок капилляр промывают 30 мин хроматным буферным раствором. Проверяют готовность к работе на примере анализа раствора, содержащего хлорид-ион (10 мг/л). Система подготовлена к работе, если пик хлорида имеет симметричный контур.

Ежедневная подготовка капилляра к работе. Перед началом измерений и между ними капилляр промывают следующим образом: 2 мин дистиллированной водой, 1 мин раствором соляной кислоты, 2 мин дистиллированной водой и 3 мин хроматным рабочим буферным раствором. По окончании работы капилляр промывают следующим

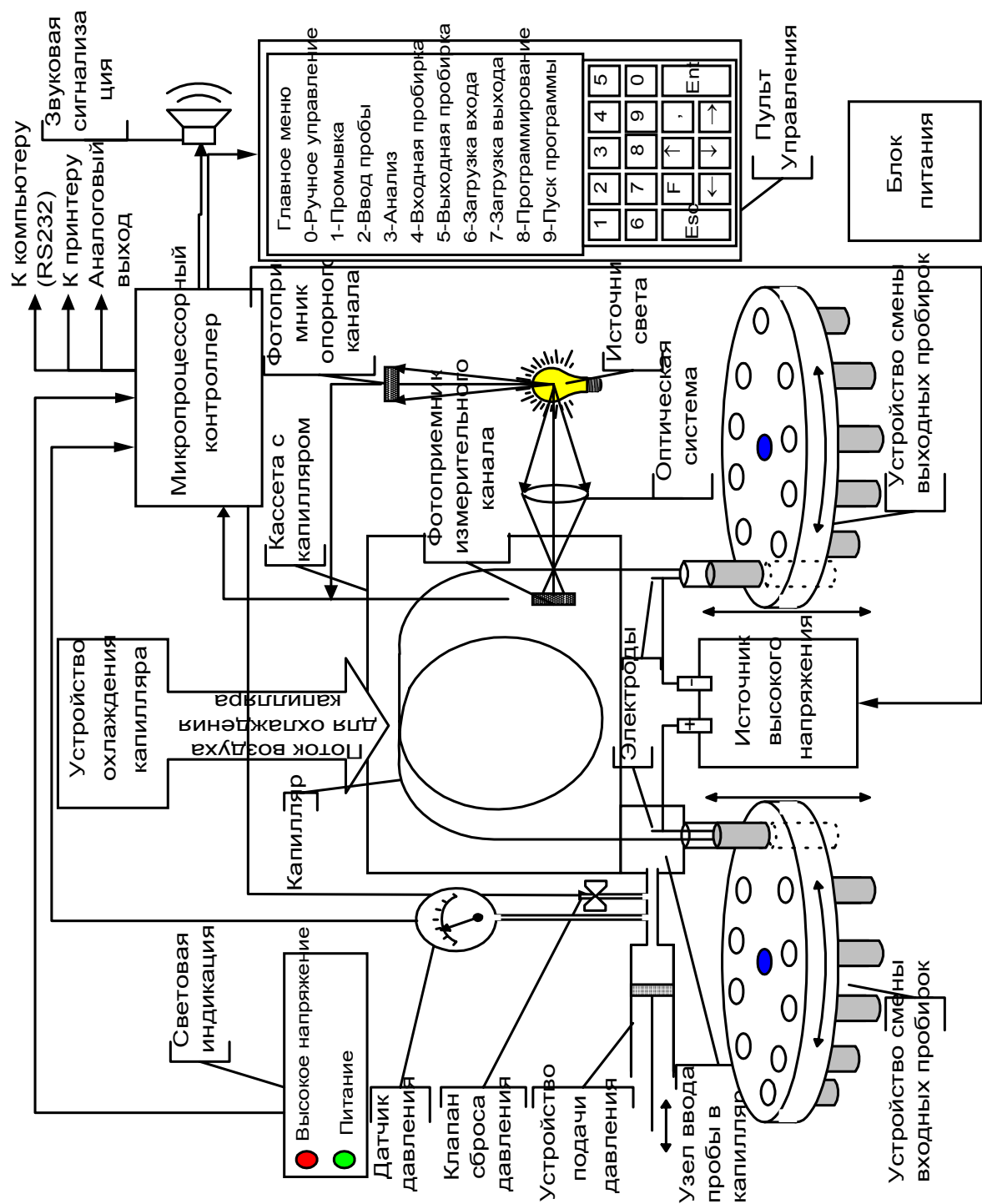


Рис. 44. Блок-схема прибора «Капель 105»

образом: 5 мин дистиллированной водой, 5 мин раствором соляной кислоты, 5 мин дистиллированной водой, после чего выключают прибор.

Выполнение определения. Готовят 5 градуировочных растворов, содержащих смесь определяемых ионов, содержание анионов в растворе приведено в табл.32. Приготовленные растворы помещают в виалы и последовательно анализируют, записывая электрофореграммы. Для регистрации электрофореграмм используют программу «МультиХром», определяют времена миграции анионов, площади их пиков и основные параметры (селективность разделения и разрешение пиков). По полученным значениям площади пиков строят градуировочные зависимости площадь пика – концентрация, уравнения, которых заносят в табл.33. Затем получают электрофореграмму образца водопроводной воды. Проводят идентификацию пиков на электрофореграмме образца водопроводной воды по временам их миграции. Вычисляют концентрацию компонентов в образце водопроводной воды по ранее полученным градуировочным зависимостям, принимая относительную погрешность определения равной 20%. Результаты вносят в табл.34.

Таблица 32. Состав смесей для градуировки системы капиллярного электрофореза

Анион	Концентрация, мг/мл				
	1	2	3	4	5
№					
Хлорид	0,5	1,0	5,0	20	50
Сульфат	20	50	1,0	0,5	5,0
Нитрат	5,0	20	0,5	50	1,0
Фторид	5,0	0,25	10	1,0	20
Фосфат	50	20	5,0	1,0	0,5

Таблица 33. Времена миграции анионов и уравнения градуировочных зависимостей для них

№	Анион	Время миграции, мин	Уравнение градуировочной прямой
1.	Хлорид		
2.	Нитрат		
3.	Сульфат		
4.	Фторид		
5.	Гидрофосфат		

Таблица 34. Результаты анализа образца

Компонент	Время миграции, мин	Площадь пика, mAU*s	Концентрация, мг/л

Работа 5. Разделение катионов методом капиллярного электрофореза

Для определения катионов в приборе используется источник высокого напряжения положительной полярности. Катионы движутся к катоду в том же направлении, что и ЭОП, но быстрее его. На электрофореграмме пики катионных компонентов пробы появляются до системного пика, в связи с этим величина напряжения должна быть не слишком большой, чтобы несколько растянуть во времени запись электрофореграммы.

Чтобы зарегистрировать пики катионов применяют косвенное детектирование. В состав ведущего электролита вводят поглощающий

катион бензимидазола (БИА) в концентрации 0,006 М, которая обеспечивает необходимую оптическую плотность исходного раствора. При разделении катионы пробы эквивалентно замещают в растворе катион БИА, и оптическая плотность в зоне пика уменьшается. Бензимидазол в водном растворе является слабым основанием, pK_a которого равен 5,8. Это означает, что при $pH = 5,8$ в растворе в равных концентрациях находятся молекулярная и катионная формы БИА, а при $pH = 4,8$ концентрация катионной формы в 10 раз превышает концентрацию формы молекулярной. Так как для эквивалентного обмена катионов необходимо, чтобы концентрация катионной формы БИА в электролите была как можно больше, электролит должен быть слабо кислым. Однако в таком случае резко уменьшается скорость ЭОП, а также возрастает общая концентрация электролита, что приводит к возрастанию тока в капилляре. На практике ведущий электролит готовят на основе винной кислоты, анионы которой обладают малой подвижностью и, следовательно, увеличивают сопротивление электролита, а соотношение кислоты и основания подбирают так, чтобы достичь необходимого компромисса между временем анализа и величиной тока.

При электрофорезе катионы регистрируются в последовательности, которая определяется их электрической подвижностью. Первым появляется пик цезия, следом за ним почти с тем же временем выходит пик рубидия. Следующими выходят пики аммония и калия. Их электрические подвижности одинаковы, поэтому без специальных мер, они выходят одним общим пиком. Для разделения аммония и калия в состав ведущего электролита вводят специальную добавку краун-эфира (18-краун-6), который уменьшает электрическую подвижность ионов калия, не оказывая в то же время заметного влияния на подвижность других ионов. В результате становится возможным полное разделение катионов щелочных и щелочно-земельных элементов. Далее, один за другим выходят пики

натрия, магния, лития, стронция, бария и кальция. При анализе природных вод на электрофореграмме могут наблюдаться дополнительные пики, принадлежащие другим катионам, в частности, катионам двухвалентных марганца и железа. Пик марганца выходит вслед за пиком стронция, а пик железа – после пика кальция.

Приборы и реагенты

Электрофоретическая установка «Капель» со спектрофотометрическим детектором («Люмэкс», Россия). Капилляр кварцевый длиной 1 м и внутренним диаметром 75 мкм. Ввод пробы давлением (30 мбар, 15 сек). Регистрирующая система – программно-аппаратный комплекс «МультиХром». 0,5 М раствор NaOH. 1 М раствор HCl. Рабочий буферный раствор, содержащий 6 мМ раствора бензимидазола, 2,5 мМ винной кислоты и 2 мМ 18-крауна-6. Стандартные растворы аммония, калия, натрия, стронция и кальция (50 мг/мл), магния и бария (25 мг/мл).

Выполнение определения. Готовят 3 градуировочных раствора, содержащих смесь определяемых ионов, в интервале концентраций 5 – 25 мг/мл. Приготовленные растворы помещают в вials и последовательно анализируют, записывая электрофореграммы. Для регистрации электрофореграмм используют программу «МультиХром», определяют времена миграции катионов, площади их пиков и основные параметры (селективность разделения и разрешение пиков). По полученным значениям площади пиков строят градуировочные зависимости площадь пика – концентрация, уравнения, которых заносят в табл.35.

Затем получают электрофореграмму образца водопроводной воды. Проводят идентификацию пиков на электрофореграмме образца водопроводной воды по временам их миграции. Вычисляют концентрацию

компонентов в образце водопроводной воды по ранее полученным градуировочным зависимостям, принимая относительную погрешность определения равной 20%. Результаты вносят в таблицу, аналогичную табл.34.

Таблица 35. Времена миграции катионов и уравнения градуировочных зависимостей для них

№	Анион	Время миграции, мин	Уравнение градуировочной прямой
1.	Аммоний		
2.	Калий		
3.	Натрий		
4.	Магний		
5.	Стронций		
6.	Барий		
7.	Кальций		

Работа 6. Определение примесей (никотиновой и γ -аминомасляной кислот) в лекарственном препарате пикамилон

Устойчивость лекарств является предметом постоянной заботы фармацевтов. В последнее время значительное внимание уделяется изучению факторов, которые влияют на стойкость составных частей лекарств и могут её повредить или влияют на качество вспомогательных средств, необходимых для приготовления готовых лекарственных форм. Благодаря скорости определения и простоте приборов тонкослойная хроматография оказывается наиболее употребительным аналитическим

методом при исследовании стабильности лекарственных средств, в частности, при оценке стабильности препаратов, содержащих никотиновую кислоту. Одним из таких препаратов является **пикамилон** – натриевая соль N- никотиноил--аминомасляной кислоты.

Большой интерес клиницистов к пикамилому определяется уникальным сочетанием его фармакологических свойств. Пикамилон улучшает кровоснабжение и функциональное состояние мозга, улучшает микроциркуляцию и гемодинамику глаз, способствует улучшению артериального кровоснабжения внутренних органов. Обладает ноотропными, антигипоксическими и антиоксидантными свойствами; длительно удерживается в тканях организма; малотоксичен. Кроме того, пикамилон оказывает транквилизирующий, не вызывая миорелаксации, сонливости и вялости, и психостимулирующий эффекты, восстанавливает физическую и умственную работоспособность при переутомлении, уменьшает угнетающее влияние этанола на центральную нервную систему.

Препарат назначают при состояниях, сопровождающихся тревогой, страхом, повышенной раздражительностью, показан при астенических состояниях, обусловленных различными нервно-психическими заболеваниями или связанными с повышенным физическим и умственным напряжением; депрессивных расстройствах в пожилом возрасте, сенильных психозах.

При оценке чистоты лекарственного препарата пикамилона в качестве посторонних примесей в нем оценивают содержание никотиновой и γ -аминомасляной (ГАМК) кислот, которое не должно превышать 0,4 и 0,1 % соответственно.

Никотинамид и никотиновая кислота представляют собой две формы витамина B₅. Они широко используются в виде пищевых добавок для человека и животных. Недостаток витамина B₅, в пище приводит к характерным заболеваниям — пеллагре у человека и «чёрному языку» у

животных.

Согласно литературным данным, для разделения никотинамида и никотиновой кислоты с помощью метода ТСХ предложено несколько элюирующих систем: н-пропанол—10%-ный NH_3 (95:5); уксусная кислота—ацетон—метанол—бензол (5:5:20:70); пропанол-2—метанол—хлороформ—10% -ный NH_3 в различных соотношениях. Так как никотиновую кислоту и её амид разделяют на флуоресцентных слоях, обнаружение ведут в ультрафиолетовом свете. Идентифицировать эти соединения можно также действием раствора п-аминобензойной кислоты и парами бромциана. Никотинамид окрашивается в оранжевый, а кислота — в красный цвет.

ГАМК принято считать медиатором торможения ЦНС, она является также нейромодулятором, поддерживающим в нервных структурах баланс между процессами возбуждения и торможения.

При определении ГАМК методом тонкослойной хроматографии используют подвижную фазу: четыреххлористый углерод – метиловый спирт – уксусная кислота (30:7:4). В качестве проявителей для γ -аминомасляной кислоты наиболее часто используют изатин (лиловое окрашивание) и нингидрин (фиолетовое окрашивание).

Реагенты и аппаратура

Пикамилон, 1% раствор в этиловом спирте.

Никотиновая кислота, 0,1% раствор в этиловом спирте.

γ -Аминомасляная кислота, 0,1% раствор в смеси этиловый спирт-вода (1:1).

Нингидрин, 0,2% раствор в этиловом спирте.

Подвижная фаза хлороформ-этанол-уксусная кислота (7,5:1,75:1) или толуол-изопропанол-ацетон-уксусная кислота (7:2:0,5:0,5).

Камера для ТСХ.

Пульверизатор для опрыскивания хроматограмм.

Микрошприц на 10 мкл.

Установка для нанесения проб на пластинку ТСХ – УСП – 1м.

*Фен для сушки пластин для ТСХ.
Сушильный шкаф.
Видеоденситометр Сорбфил.
Пластинки Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ.*

Выполнение работы. Готовят разбавлением стандартных растворов 2 серии водно–спиртовых растворов: пикамилона с содержанием 0,1; 0,5; 0,7 и 1,0 %; смеси кислот с содержанием 0,02; 0,03; 0,04 и 0,05 % никотиновой и 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 и 0,05 % и γ -аминомасляной кислот, соответственно.

Для приготовления раствора образца препарата “Пикамилон” 2 таблетки пикамилона по 0,05 г растирают в ступке и растворяют в 2 мл водно-спиртовой смеси. Полученную взвесь (содержит и вспомогательные вещества: крахмал, магния карбонат основной, сахар, кальция стеарат, тальк) фильтруют через бумажный фильтр.

На пластинке карандашом проводят линию старта на расстоянии 1,5 см от края и закрепляют пластинку на столике ТСХ – УСП-1м, который подогрет до 50⁰С. С помощью микрошприца наносят пробы стандартных растворов пикамилона(2 мкл), никотиновой и γ -аминомасляной кислот(по 5 мкл) и образца (5 мкл). Нанесение проб может проводиться также автоматически с помощью автоматического аппликатора.

Пластинку с нанесенными пробами помещают в герметичную хроматографическую камеру, куда предварительно наливают 10 мл подвижной фазы. Пластинку выдерживают в камере около получаса, так чтобы фронт растворителя поднялся на 7-10 см. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают феном. Для обнаружения никотиновой кислоты и пикамилона пластинку просматривают при облучении УФ-излучением при длине волны 365 нм. Для обнаружения γ -аминомасляной кислоты пластинку опрыскивают раствором нингидрина из пульверизатора и нагревают 10-15 мин в сушильном шкафу при температуре 100⁰С до появления окрашенных пятен.

Обработка хроматографических данных. Проявленные пластинки помещают в камеру денситометра и с помощью видеокамеры и системы AverTV Studio вводят запись видеоизображения пластины в память компьютера. Затем в программе видеоденситометра Sorbfil обрабатывают полученный видеоролик. Обработка включает:

1. Расстановку линий старта и фронта
2. Расстановку треков
3. Расчет треков (устанавливается режим сглаживания – по 3 точкам; порог чувствительности – положением рычажка справа; далее выбирают обрабатываемые пики и задают для них вершину, левую и правую границы после этого полученные данные запоминают нажатием клавиши «принять»; ненужные пики удаляют нажатием кнопки «удалить пик») Таким образом проводят обработку всех треков на хроматограмме.
4. Получение отчета: нажимают кнопку «отчет» и записывают результаты расчета треков. Для вывода на экран полученных хроматограмм нажимают кнопку «хроматограмма» и распечатывают их, нажимая кнопку «Print».

Результаты расчетов заносят в табл. 36.

Таблица 36. Значения R_f соединений и уравнения градуировочных зависимостей для них

№	Вещество	Значение R_f	Уравнение градуировочной прямой

По полученным площадям хроматографических пиков для стандартных растворов и контрольной смеси рассчитывают содержание никотиновой и γ -аминомасляной кислот в образце.

Работа 7. Разделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии

Разделение аминокислот является важной и распространенной задачей, решаемой методом тонкослойной хроматографии. Возможность разделения аминокислот можно исследовать на примере разделения аргинина, аланина, валина и триптофана, формулы которых приведены в табл.37. :

Таблица 37. Изучаемые аминокислоты

Аминокислота	Формула
Аргинин	$(\text{NH})(\text{NH}_2)\text{CNHCH}_2\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Аланин	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Валин	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Триптофан	$(\text{C}_8\text{H}_7\text{N})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

Реагенты и аппаратура

Этанольные растворы аминокислот (0,12 мг/мл).

Подвижная фаза изобутанол-изопропанол-вода-уксусная кислота (5:4:3:0.2).

1% раствор нингидрина в этиловом спирте.

Пластинки Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ.

Камера для ТСХ.

Пульверизатор для опрыскивания хроматограмм.

Микрошприц на 10 мкл.

Установка для нанесения проб на пластинку ТСХ – УСП – 1м.

Фен для сушки пластин для ТСХ.

Видеоденситометр Сорбфил.

Выполнение работы. Готовят разбавлением стандартных растворов 4 серии этанольных растворов аминокислот с содержанием: 0,025; 0,05; 0,075; и 0,10 мг/мл.

На пластинке карандашом проводят линию старта на расстоянии 1,5 см от края и закрепляют пластинку на столике ТСХ – УСП-1м, который подогрет до 50⁰С. С помощью микрошприца наносят пробы стандартных этанольных растворов аминокислот и контрольной смеси по 2 мкл.

Пластинку с нанесенными пробами помещают в герметичную хроматографическую камеру, куда предварительно наливают 10 мл подвижной фазы. Пластинку выдерживают в камере около часа, так чтобы фронт растворителя поднялся на 7–10 см. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают феном. Для обнаружения аминокислот пластинку опрыскивают раствором нингидрина из пульверизатора и нагревают 10–15 мин в сушильном шкафу при температуре 100⁰С до появления окрашенных пятен. Проявленные пластинки помещают в камеру денситометра и с помощью видеокамеры и системы AverTV Studio вводят запись видеоизображения пластины в память компьютера. Затем в программе видеоденситометра Sorbfil обрабатывают полученный видеоролик, как описано в работе 6.

По результатам обсчета хроматограмм заполняют таблицу, аналогичную табл. 36. По полученным площадям хроматографических пиков аминокислот для стандартных растворов и контрольной смеси рассчитывают содержание аминокислот в контрольной смеси.

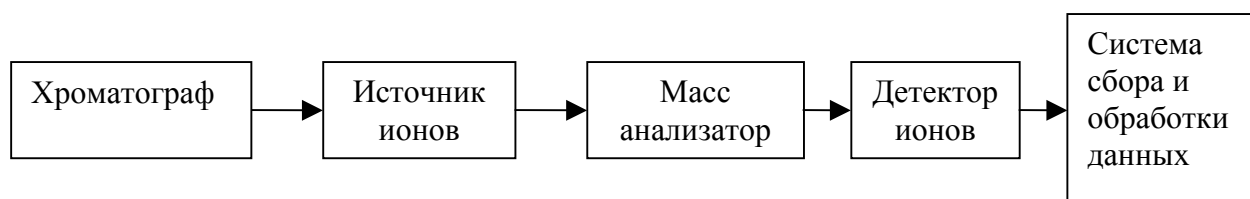
Работа 8. Хромато-масс-спектрометрическое определение органических соединений средней летучести

(задача подготовлена к.х.н., с.н.с. Глазковым И.Н.)

Метод хромато-масс-спектрометрии является одним из наиболее высокоселективных и высокочувствительных методов анализа многокомпонентных смесей органических соединений разной природы. Одной из наиболее простых задач, которую приходится решать этим методом, является определение массовой концентрации заданных

органических соединений средней летучести ($T_{\text{кип.}}$ в диапазоне 200 – 400⁰С) в органических экстрактах. Такие экстракты получают после соответствующей пробоподготовки, в основном, при анализе объектов окружающей среды (вода и почва). К соединениям средней летучести относятся ряд нормируемых экотоксикантов: фенолы, полиароматические углеводороды, фталаты, хлорбензолы и др.

Блок-схема хромато-масс-спектрометра выглядит следующим образом:



После разделения на хроматографической колонке вещества попадают в камеру ионизации масс-спектрометра. Наиболее старый и широко применяемый метод ионизации — ионизация пучком электронов. Столкновение молекул с электронами приводит к образованию ионов. При этом молекулы часто разваливаются на заряженные фрагменты по определенному для каждого соединения механизму. Процесс ионизации должен происходить в вакууме 10^{-7} - 10^{-6} мм.рт.ст.

После ионизации ионы попадают в масс-анализатор. Наиболее широко распространенный квадрупольный масс-анализатор представляет собой четыре стержня, к которым попарно в противоположной полярности подается определенная комбинация постоянного и радиочастотного переменного напряжений. Ионы, влетающие параллельно оси этих стержней, попадают в гиперболическое поле и, в зависимости от соотношения их массы (точнее, m/z) и частоты, пропускаются этим полем или не пропускаются дальше.

Последним элементом масс-спектрометра является детектор заряженных частиц. Для этой цели используют диодные вторично-

электронные умножители, в которых ион, попадая на первый диод, выбивает из него пучок электронов, которые в свою очередь, попадая на следующий диод, выбивают из него еще большее число электронов и т.д. Другой вариант — фотоумножители, регистрирующие свечение, возникающее при бомбардировке ионами люминофора. Конечным результатом всего этого процесса является масс-спектр, несущий информацию о структуре молекулы.

С помощью системы обработки данных проводят качественную идентификацию по временам удерживания и относительной интенсивности одного основного и двух подтверждающих ионов (m/z) масс-спектра. Количественное определение идентифицированного соединения выполняют методом «внутреннего стандарта», для которого предварительно определяют градуировочный поправочный коэффициент (F), показывающий во сколько раз отклик масс-селективного детектора (площадь хроматографического пика, соответствующая основному для данного конкретного соединения иону m/z) на единицу массы вещества отличается от отклика масс-селективного детектора на единицу масс «внутреннего стандарта». Вещества, используемые в качестве внутренних стандартов, приведены в табл.38.

Реагенты и аппаратура

Хромато-масс-спектрометр фирмы «Финниган», модель Incos 50, состоящий из:

- квадрупольного масс-спектрометрического детектора Incos 50;*
- газового хроматографа Varian 3400, оснащенного капиллярной колонкой длиной 30 м, диаметром 0,32 мм; неподвижная фаза — SE-54, толщина пленки неподвижной фазы — 1 мкм;*
- системы обработки данных Prolab Vector 2.*

Микрошприц емкостью 10 мкл.

Раствор смеси 15 среднелетучих органических соединений в метаноле, концентрация компонентов — 10 нг/мкл.

Раствор смеси 44 среднелетучих органических соединений в метаноле, концентрация компонентов — 10 нг/мкл.

Раствор смеси внутренних стандартов (табл.38), концентрация компонентов – 40 нг/мл.

Раствор декафтортрифенилфосфина в дихлорметане, концентрация 1 мкг/мкл.

Газ-носитель – гелий очищенный марки А.

Метанол, хроматографически чистый.

Таблица 38. Состав смеси внутренних стандартов

Соединение	Формула	Молекулярная масса	Основной ион	Вторичные ионы
1,4-Дихлобензол-d ₄	C ₆ Cl ₂ D ₄	151	152	150, 115
Нафталин- d ₈	C ₁₀ D ₈	136	136	68
Аценафтен- d ₁₀	C ₁₂ D ₁₀	164	164	162, 160
Фенантрен- d ₁₀	C ₁₄ D ₁₀	188	188	94, 80
Кризен- d ₁₂	C ₁₈ D ₁₂	240	240	120, 236
Перилен- d ₄	C ₂₀ D ₁₂	164	164	260, 265

Проверка настройки масс прибора по декафтортрифенилфосфину. Для проверки настройки шкалы масс прибора ввести в инжектор хроматографа в режиме «без деления потока» 1 мкл раствора декафтортрифенилфосфина в метаноле с концентрацией 100 нг/мкл и провести хроматографическое определение в условиях:

Начальная температура термостата	40 ⁰ С
Выдержка	4 мин
Скорость нагрева	10 ⁰ С/мин
Конечная температура термостата	250 ⁰ С
Выдержка	20 мин
Температура испарителя	270 ⁰ С

Вывести масс-спектр декафтортрифенилфосфина, и сравнить полученные значения с допустимыми, представленными в табл.39. Если полученные значения удовлетворяют табличным, то можно проводить дальнейшие измерения.

Таблица 39. Допустимые значения интенсивностей ионов масс-спектра декафтортрифенилфосфина

Масса иона	Относительная интенсивность
51	30-60 % от массы 198
68	<2% от массы 69
70	<2% от массы 69
127	40-60% от массы 198
197	<1% от массы 198
198	основной пик, 100%
199	5-9% от массы 198
275	10-30% от массы 198
365	>1% от массы 198
441	меньше, чем 443
442	>40% от массы 198
443	17-23 % от массы 442

Контроль стабильности градуировочной характеристики. Для определения стабильности градуировочной характеристики прибора для обозначенного преподавателем соединения проанализировать полученный у него градуировочный раствор. Ввести в инжектор хроматографа в режиме «без деления потока» 1 мкл градуировочного раствора и провести определение в условиях:

Начальная температура термостата	40 ⁰ С
Выдержка	4 мин
Скорость нагрева	10 ⁰ С/мин
Конечная температура термостата	270 ⁰ С
Выдержка	20 мин
Температура испарителя	270 ⁰ С
Температура интерфейса ГХ/МС	260 ⁰ С
Диапазон сканирования	50 – 500 а.е.м.
Скорость сканирования	не менее 1 скан/сек

В соответствии с данными табл. 40,41, где приведены массы характеристичных ионов для двух стандартных смесей среднелетучих

Таблица 40. Состав и массы характеристичных ионов 15 компонентной смеси среднелетучих соединений

Соединение	Формула	Молекулярная масса	Основной ион	Вторичные ионы
Фенол	C_6H_6O	94	94	65, 66
2-Хлорфенол	C_6H_5ClO	128	128	64, 130
2-Нитрофенол	$C_6H_5NO_3$	139	139	109, 65
2,4-Диметилфенол	$C_8H_{10}O$	122	122	107, 121
Бензойная кислота	$C_7H_6O_2$	122	122	105, 77
2,4-Дихлорфенол	$C_6H_4Cl_2O$	163	162	164, 98
4-Хлор-3-метилфенол	C_7H_7ClO	142	107	144, 142
2-Метилфенол	C_7H_8O	108	107	108, 77, 79, 90
4-Метилфенол	C_7H_8O	108	107	108, 77, 79, 90
2,4,6-Трихлорфенол	$C_6H_3Cl_3O$	197	196	198, 200
2,4-Динитрофенол	$C_6H_4N_2O_5$	184	184	63, 154
4-Нитрофенол	$C_6H_5NO_3$	139	139	109, 65
4,6-Динитро-2-метилфенол	$C_7H_6N_2O_5$	198	198	51, 105
2,4,5-Трихлорфенол	$C_6H_3Cl_3O$	197	196	198, 97, 132, 99
Пентахлорфенол	C_6HCl_5O	166	266	264, 268

соединений, найти на хроматограмме пики, соответствующие определяемому соединению (задается преподавателем) и внутреннему стандарту. Вывести масс-хроматограммы по основным характеристичным ионам определяемого соединения внутреннего стандарта, получить значения времен удерживания, площадей соответствующих пиков и рассчитать поправочный коэффициент F по уравнению:

$$F_i = \frac{Q_i \times c_{st}}{Q_{st} \times c_i}, \text{ где}$$

Q_i – площадь пика характеристического иона определяемого соединения;

Q_{st} – площадь пика характеристического иона «внутреннего стандарта»;

c_{st} – концентрация «внутреннего стандарта» (40 нг/мкл); c_i – концентрация определяемого компонента в градуировочном растворе (20 нг/мкл). Дальнейшие измерения можно проводить, если выполняется

соотношение: $|F_i - F_{tab}| \leq 0.3F_{tab}$.

Таблица 41. Состав и массы характеристических ионов 44 компонентной смеси среднелетучих органических соединений

Соединение	Формула	Молекулярная масса	Основной ион	Вторичные ионы
Бис(2-хлорэтил) эфир	$C_4H_8Cl_2O$	143	93	63, 95
1,3-Дихлорбензол	$C_6H_4Cl_2$	147	146	148, 111
1,4-Дихлорбензол	$C_6H_4Cl_2$	147	146	148, 111
1,2-Дихлорбензол	$C_6H_4Cl_2$	147	146	148, 111
Бис(2-хлор-изопропил) эфир	$C_4H_{12}Cl_2O$	171	45	63, 95
N-Нитрозоди-н-пропиламин	$C_6H_{14}N_2O$	130	70	42, 101, 130
Гексахлорэтан	C_2Cl_2	236	117	
Нитробензол	$C_6H_5NO_2$	123	77	201, 199
Изофорон	$C_9H_{14}O$	138	82	123, 65
Бис(2-Хлорэтокси)-метан	$C_5H_{10}Cl_2O_2$	173	93	95, 138 95, 123
1,2,4-Трихлорбензол	$C_6H_3Cl_3$	181		

Нафталин	$C_{10}H_8$	128	180	182, 145
Гексахлорбутадиен	C_4Cl_6	260	128	129, 127
Гексахлор- циклопентадиен	C_5Cl_6	272	225 237	223, 227 235, 272
2-Хлорнафталин	$C_{10}H_7Cl$	162		
Диметилфталат	$C_{10}H_{10}O_4$	194	162	127, 164
Аценафтилен	$C_{12}H_8$	152	163	194, 164
2,6-Динитротолуол	$C_7H_6N_2O_4$	182	152	151, 153
Аценафтен	$C_{12}H_{10}$	154	165	63, 89
2,4-Динитротолуол	$C_7H_6N_2O_2$	182	154	153, 152
Диэтилфталат	$C_{12}H_{14}O_4$	222	165	63, 89
Флуорен	$C_{13}H_{10}$	166	149	177, 150
4-Хлорфенил- фениловый эфир	$C_{12}H_9ClO$	204	166 204	165, 167 206, 141
N-Нитрозоди- фениламин	$C_{12}H_{10}N_2O$	198	169	168, 167
4-Бромфенил- фениловый эфир	$C_{12}H_9BrO$	249	248	250, 141
Гексахлорбензол	C_6Cl_6	284	284	142, 249
Фенантрен	$C_{14}H_{10}$	178	178	179, 176
Антрацен	$C_{14}H_{10}$	178	178	176, 179
Ди-n-бутил фталат	$C_{16}H_{22}O_4$	278	149	150, 104
Флуорантен	$C_{16}H_{10}$	202	202	101, 203
Пирен	$C_{16}H_{10}$	202	202	200, 203
Бензилбутилфталат	$C_{19}H_{20}O_4$	312	149	91, 206
Бензо(а)антрацен	$C_{18}H_{12}$	228	228	229, 226
Кризен	$C_{18}H_{12}$	228	228	226, 229
Бис(2-этилгексил)-	$C_{24}H_{38}O_4$	390	149	167, 279

фталат				
Ди-н-октил фталат	$C_{24}H_{38}O_4$	390	149	167, 43
Бензо(b)флуорантен	$C_{20}H_{12}$	252	252	253, 125
Бензо(k)флуорантен	$C_{20}H_{12}$	252	252	253, 125
Бензо(a)пирен	$C_{20}H_{12}$	252	252	253, 125
Индено-(1,2,3-cd) пирен	$C_{22}H_{12}$	276	276	138, 227
Дибензо-(a,h) антрацен	$C_{22}H_{14}$	278	278	139, 279
Бензо(g,h,i)перилен	$C_{22}H_{12}$	276	276	138, 277
Азобензол	$C_{22}H_{10}N_2$	182	77	182, 51, 105
N-Нитрозодиметил- амин	$C_2H_8N_2O$	74	42	74, 44

Анализ экстракта. Перед анализом к экстракту добавляют 10 мкл раствора «внутреннего стандарта» с концентрацией компонентов 1 мкг/мкл. Затем полученный раствор (1 мкл) вводят в инжектор хроматографа в режиме «без деления потока», и проводят разделение смеси в условиях, аналогичных условиям для хроматографирования градуировочного раствора. Экстракт анализируют трижды.

Получают масс-хроматограммы для основного характеристического и 2-ух подтверждающих ионов определяемого соединения (данные табл.40,41). Проводят идентификацию определяемого соединения по следующим критериям:

- характеристические ионы для определяемого компонента должны давать максимальное значение в любом выбранном скане рассматриваемого пика;

- время удерживания рассматриваемого пика не должно отличаться не более, чем на 30 сек от времени удерживания подлинного соединения;
- относительная интенсивность пиков 3-х характеристичных ионов в рассматриваемом масс-спектре не должна отличаться более чем на 20% от относительной интенсивности этих пиков в масс-спектре истинного соединения, полученного для калибровочного раствора.

Далее проводят оценку определяемого вещества в экстракте. По масс-хроматограмме определяют площадь пика основного характеристичного иона для определяемого соединения и соответствующего внутреннего стандарта. Результаты измерений заносят в табл.42.

Таблица 42. Результаты определения компонента в органическом экстракте

№ определения	Площадь характеристичных ионов		Концентрация определяемого компонента	
	Определяемого соединения Q_i	Внутреннего стандарта Q_{st}	В пробе, нг/мкл	Среднее значение, нг/мкл
1	Q_1	Q_{st1}	c_{i1}	\hat{c}_i
2	Q_2	Q_{st2}	c_{i2}	
3	Q_3	Q_{st3}	c_{i3}	

Вычисляют концентрацию определяемого соединения в экстракте по формуле: $c_i = \frac{Q_i \times c_{st}}{Q_{st} \times F_i}$. Рассчитывают величину доверительного интервала, принимая $P=0,95$, и представляют результат (концентрация соединения в экстракте) в виде: $c, \text{ нг/мкл} = \hat{c}_i \pm \Delta$.