

КВАНТИТАТИВНА ОРГАНСКА АНАЛИЗА
ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОДИ

1. У В О Д

Квантитативната органска анализа битно се разликува од квантитативната неорганска анализа. Додека при неорганската анализа скоро секогаш се применуваат јонски реакции и определувањето на концентрацијата на одделните компоненти практички се сведува на одредувањето на соодветните јони, при квантитативната органска анализа најчесто се врши определување на ненаелектризираните честиици. При квантитативната органска анализа анализираниот материјал е комплексен и при тоа основен проблем претставува разделувањето на компоненти коишто треба да бидат анализирани. Откако компонентите ќе бидат разделени, задачата се сведува на примена на некоја од инструменталните методи на анализа како што се: електрохемиските методи, спектралните методи, хроматографските методи и сл.

Како што е познато, постојат повеќе методи за разделување на две или повеќе органски соединенија присутни во материјалот којшто треба да го анализираме. Да наведеме некои од нив: дестилација, ректификација, кристализација, филтрација, екстракција, адсорпција итн. Еден од ретките методи на разделување, кој може да ги задоволи високите барања на современата квантитативна органска анализа, е хроматографскиот метод. Различните варијации на овој метод се одликуваат со селективност, голема разделувачка способност и експедитивност во анализата. Исто така, денес, повеќето од овие методи се инструментализирани и компјутеризирани со што при нивната примената се избегнуваат субјективните грешки.

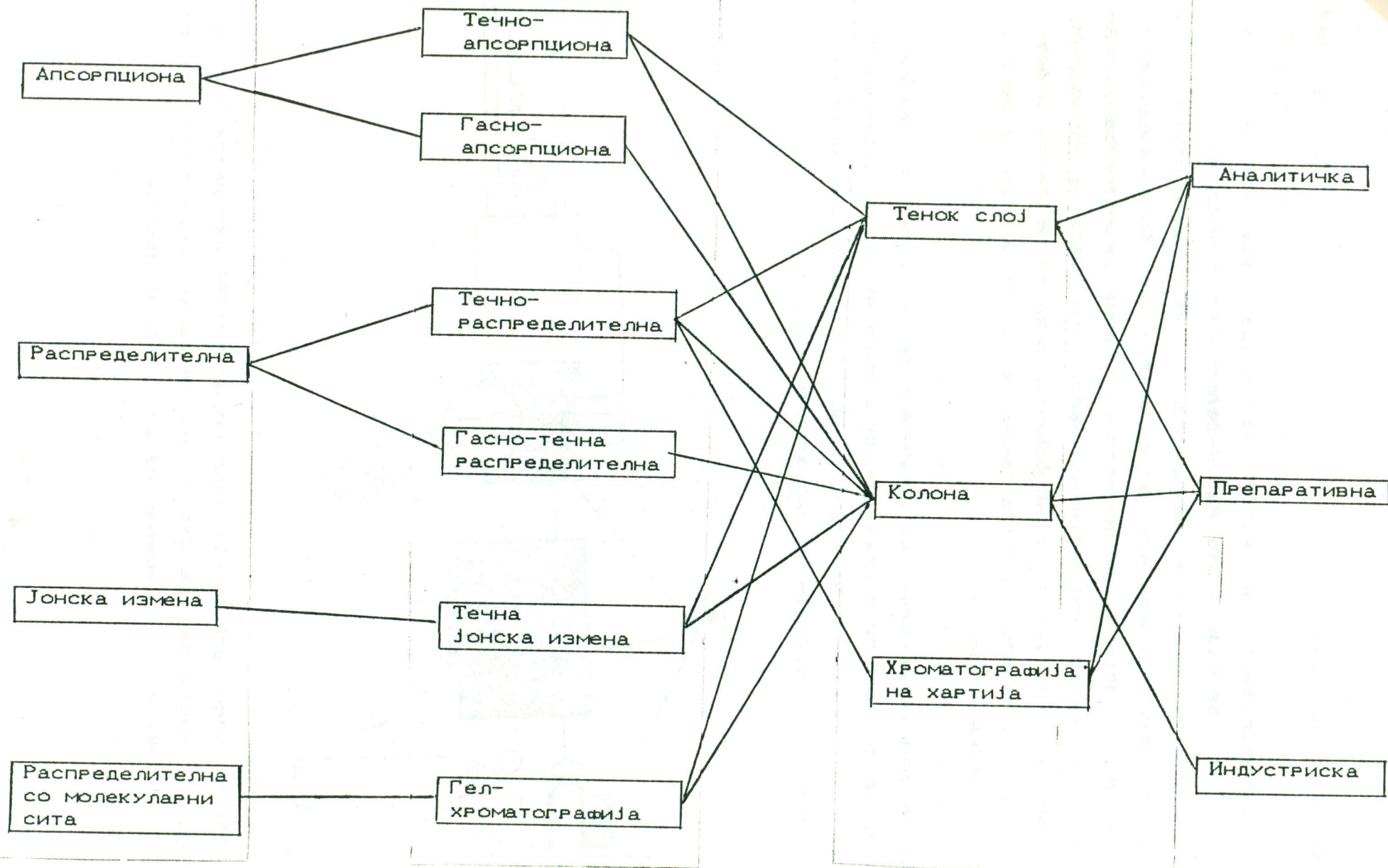
За оваа пригода ќе разгледаме две хроматографски методи (гасна хроматографија и течна хроматографија) со посебен осврт на нивната примена во квантитативна органска анализа.

2. ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОДИ

Хроматографијата е метод на разделување на смеси од супстанции, која се базира врз различната распределителна способност помеѓу две фази на компоненти кои сакаме да ги раздвоиме, при што едната од двете фази е подвижна а другата неподвижна. За разлика од другите методи кои се базираат врз распределба на супстанциите помеѓу две фази, хроматографијата е динамичен процес, бидејќи разделувањето се одвива преку протекување на подвижната фаза.

Во зависност од целта и димензиите на процесот на разделување на супстанциите, хроматографијата може да се подели на аналитичка, препаративна и индустриска. Основната цел при аналитичката хроматографија е квалитативната и квантитативната анализа на компонентите на смесата. Препаративната хроматографија се применува за да се добијат чисти супстанции за лабораториска примена.

Постојат повеќе варијанти на хроматографски методи во зависност од агрегатната состојба на подвижната и неподвижната фаза, од видот на апсорпционото средство, од природата на заемнодејството на компонентите на смесата и неподвижната фаза, од техниката на анализа итн. На сл.1. е прикажана една од начините на класификација на хроматографските процеси.



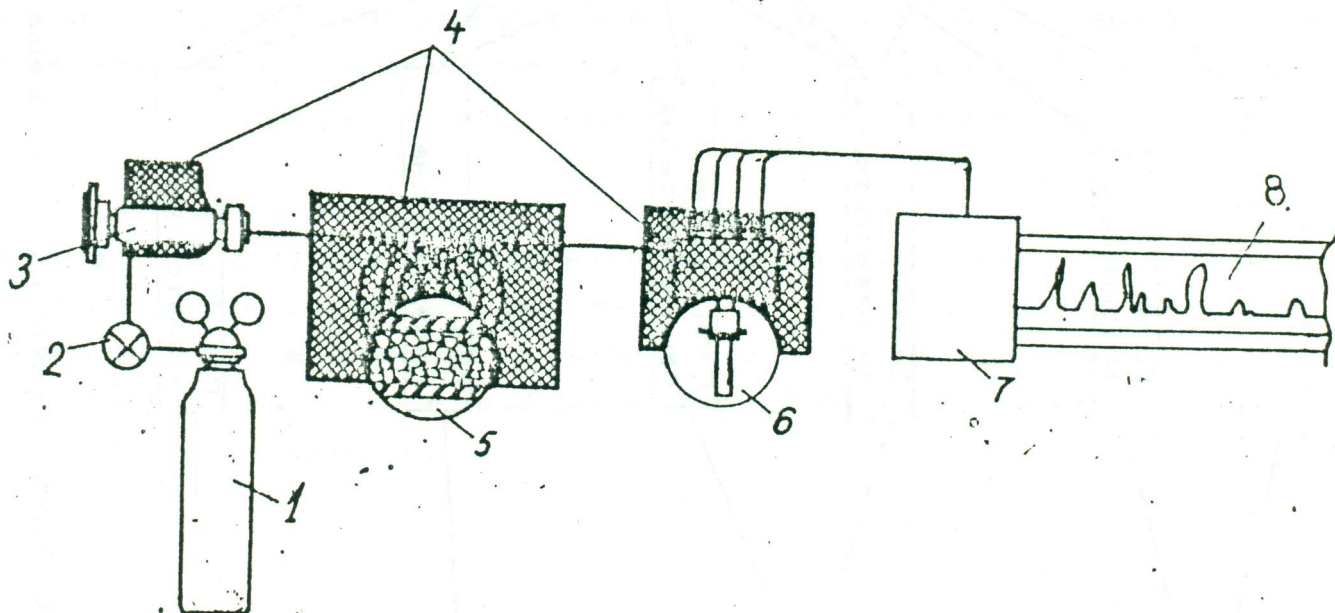
Сл. 1. Класификација на хроматографските процеси

2.1. ГАСНА ХРОМАТОГРАФИЈА

Слика 2

Гасната хроматографија е метод за разделување на испарливи соединенија, кој се базира втз распределбата на супстанциите помеѓу две фази. Една од фазите е неподвижна и има голема површина, а другата е гас којшто минува низ неподвижната фаза. Кога неподвижната фаза е тврда, се зборува за апсорпциона гасна хроматографија. Во овој случај најчесто употребувана неподвижна фаза е силикагел, активен јаглен и сл. Ако како неподвижна фаза се употреби инертен носител на кој е нанесен филм од течна фаза, тогаш станува збор за гасно-течна хроматографија.

На Сл. 2. е прикажана шема на компонентите на гасен хроматограф. Гасниот хроматограф ги содржи следниве основни делови: боца со гас носител, регулатор на гас носителот, место за воведување на пробата, колона, детектор, засилувач на сигналот и пишувач.



Сл. 2. Гасен хроматограф: 1- гас носител; 2- регулатор на гас носителот; 3- место за воведување на пробата; 4- термостати; 5- колона; 6- детектор; 7- засилувач на сигналот; 8- пишувач.

2.1.1. Гас носител

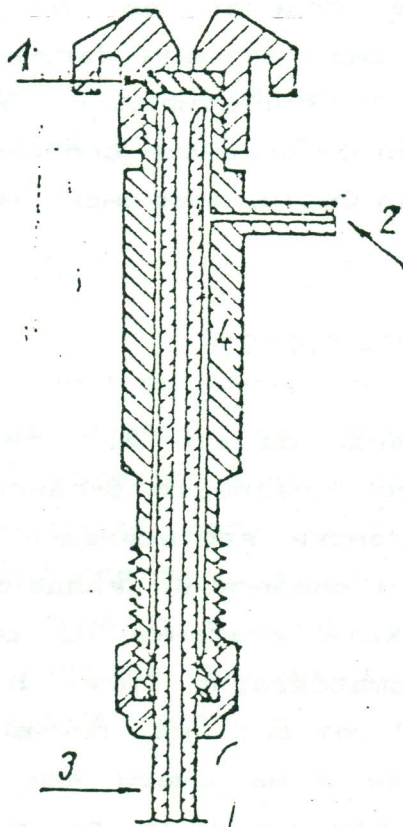
Подвижната фаза во гасната хроматографија се вика гас-носител. Тој може да биде аргон, хелиум, азот, водород или друг гас. Кој гас носител ќе биде употребен зависи од видот на детекторот.

2.1.2. Регулатори на притисокот на гас носителот

Гасот носител е сместен во челични боци под притисок кој по редукција на притисокот се внесува во хроматографот. Протокот на гас носителот се движи околу 10 ml/min.

2.1.3. Воведување на пробата

Шема на приборот за воведување на пробата е прикажана на сл. 3. Пробата се додава со помош на шприц со капацитет од 1 до 10 μ l (0,001-0,010 ml).



Сл. 3. Прибор за воведување на пробата: 1- еластична мембрана; 2- влез на гас носителот; 3- излез кон колоната; 4- термостатиран дел.

2.1.4. Термостати

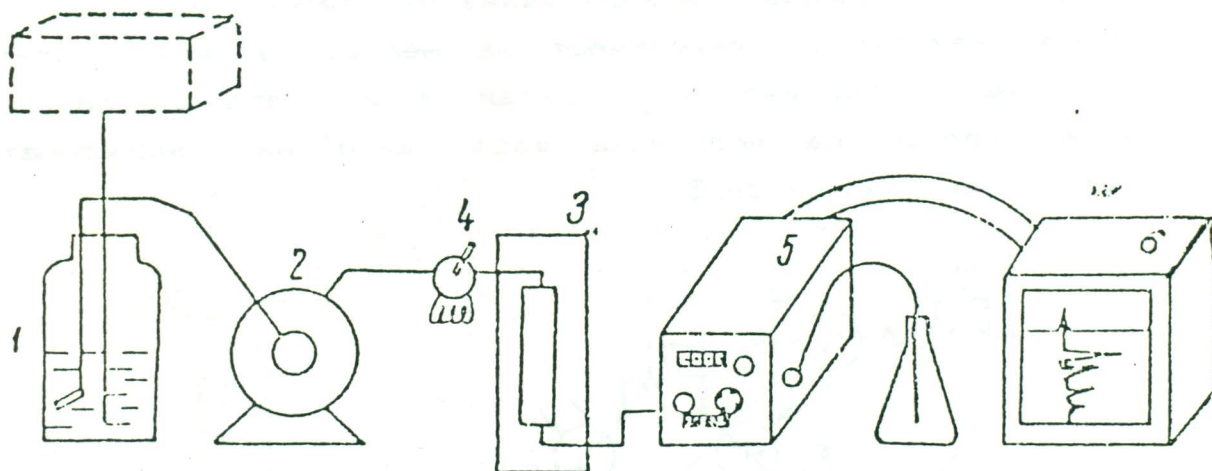
Приборот за воведување на пробата колоната и детекторот при гасната хроматографска анализа треба да бидат загреани и термостатирани на работната температура која што е карактеристична за секоја анализа.

2.1.5. Колони

Колоните се основен дел на гасните хроматографи од кои најчесто зависи разделувањето на смесата. Тие можат да бидат изработени од стакло, месинг, бакар, тефлон, други видови пластични маси, благородни метали и сл. По форма колоните можат да бидат прави, спирални, во форма на U, а по дијаметар од 5-6 mm, 2-3 mm или капиларни со дијаметар од 0,2 mm. Полнителите со кои се наполнети колоните можат да се поделат во три групи: А- апсорпциони (силикагел, алуминиумоксид, активен јаглен, молекуларни сита); Б- полимерни апсорбенти (полистиролни молекули о mreжени со дивинилбензен, силикагел со органски соединенија); В- нанесена течна фаза врз инертен носител (метилсиликонски масла).

2.2. ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА (HPLC)

Како што може да се види од сл. 4, при течната хроматографија мобилната фаза е течност (најчесто органски растворувачи во чиста состојба, смеса од органски растворувачи и сл.) која минува низ колоната под притисок и овозможува разделување на компонентите од смесата. Англо-саксонската кратенка на овој метод е HPLC (High Pressure Liquid Chromatography или High Performance Liquid Chromatography). HPLC методот се применува за квалитативно и квантитативно испитување и на смеси чии компоненти се со висока точка на испарување, кои не може да бидат разделени со гасна хроматографија. На сл. 4 е даден приказ на течен хроматограф од кој се гледа дека, во принцип, апаратурата е слична со гасниот хроматограф.



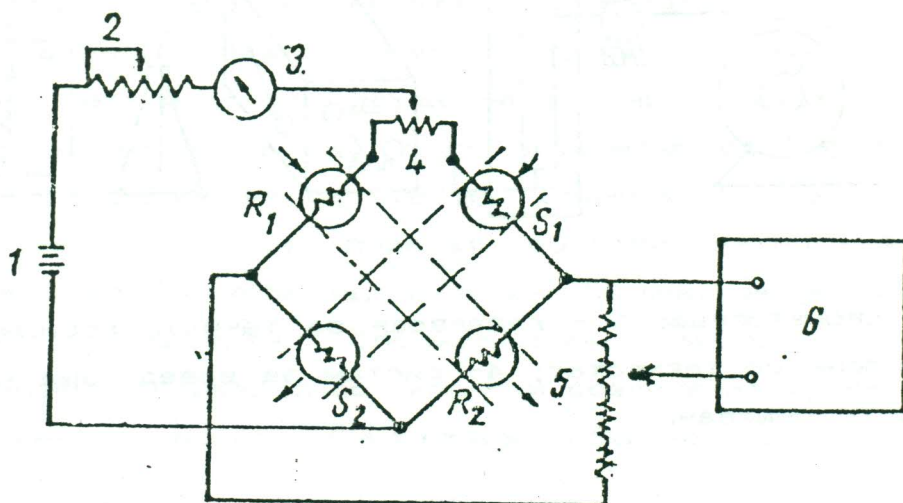
Сл. 4. Течен хроматограф: 1.- резервоар за течната мобилна фаза; 2- пумпа; 3- колона со термостат; 4- систем за воведување на пробата; 5- детектор; 6- пишувач.

2.3. Детектори

Детекторите се составен дел од хроматографите кои укажуваат колку ефикасно било разделувањето на компонентите од смесата. Детектирањето се врши на излезот од колоната со следење на промените на својствата на подвижната фаза како резултат на присутните компоненти во неа. Покрај осетливоста, детекторот треба да покажува линеарна зависност на сигналот што го дава и концентрацијата на компонентата. Постојат повеќе видови детектори, а најчесто во употреба се: кондуктометриски детектор, пламен-јонизационен детектор и UV-детектор.

Во современите хроматографи детекторот е променлив дел што овозможува, во зависност од типот на анализата, замена и употреба на соодветен детектор.

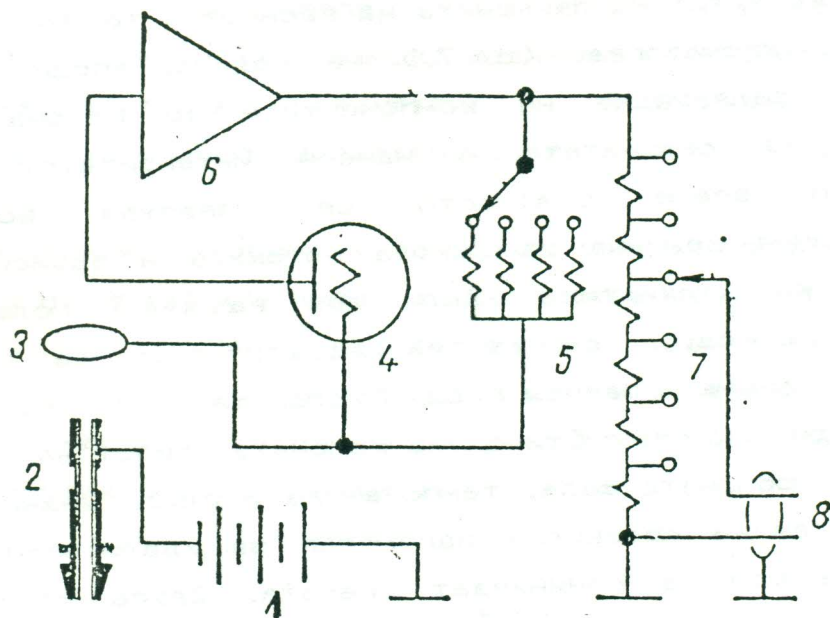
2.3.1. Кондуктометриски детектор (катарометар) Овој детектор е универзален, со средна осетливост а при неговата употреба детектираната компонента не се разорува. Принципот на работа се состои во сингнализирање при нарушување на урамнотезениот Винстон мост како резултат на присутност на некоја од компонентите во мобилната фаза. При работа со катарометар треба да се осигури константен проток на мобилната фаза. Шема на кондуктометриски детектор е прикажана на сл. 5.



Сл. 5. Катарометар: 1- извор на константно напојување; 2- регулатор на струја; 3- милиамперметар; 4- дотерување на нулата; 5- преклопник; 6- засилуваач; S_1 , S_2 - мерни келии; R_1 , R_2 - референтни келии.

2.3.2. Пламен-јонизационен детектор

За работа на овој детектор потребни се три гаса: водород за пламенот, воздух за поддржување на горењето и гас носител. Во текот на работата неопходно е да се одреди оптималниот однос на водород-воздух. При употреба на пламен-јонизациониот детектор анализираната смеса по разделувањето согорува во пламенот и се уништува, а истовремено, поради формирањето на нови јони во пламенот доаѓа до промена на урамнотезениот напон. Конструкцијата на еден ваков детектор е прикажана на сл. 6.



Сл. 6. Пламен-Јонизационен детектор: 1- извор на поларизиран напон; 2- пламеник-електрода; 3- колектор на јони; 4- конвертор струја-напон; 5- грубо дотерување на напонот; 6- засилувач; 7- избор на осетливоста; 8- излезен сигнал.

2.3.3. UV-детектор

UV-детекторот, всушност, претставува UV-спектрофотометар со чија помош се следи промената на апсорбација на излезот од колоната. Апсорбацијата се мери на одредена бранова должина карактеристична за дадените компоненти од смесата. Компјутеризираниите хроматографи поседуваат UV-детектори со т.н. Diode Array систем со чија помош се снима комплетниот спектар (на пр. од 200-450 nm) на рздвоената компонента

2.4. КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА

Како краен резултат на примената на гасниот и течниот хроматограф се добива т.н. хроматограм (сл.7.) на кој на апсцисата е нанесено времето на задржување на компонентите во колоната (ретенционо време), а на ординатата е нанесен интензитетот на сигналот. Ретенционото време (најчесто се изразува во минути) е карактеристична величина за секоја молекула и зависи од нејзините структурни карактеристики. Дали две различни молекули, кои се наоѓаат во смеса, ќе се раздвојат, т.е. ќе имаат различно ретенционо време зависи од условите во кои се одвива хроматографскиот процес (типот на колоната, типот на мобилната фаза, протокот на мобилната фаза, температура и сл.). Значи, ретенционото време претставува своевиден параметар за квалитативна анализа на компонентите кои ја сочинуваат смесата. Друга карактеристика на хроматограмот е интензитетот на пикот, кој е пропорционален со концентрацијата на компонентата на која тој пик се однесува.



Сл.7. Хроматограм: t_0 - почеток; t_B - ретенционо време за бензен; t_T - ретенционо време за толуен; h - височина на пикот; a - широчина на пикот; $h/2$ - половина од височината на пикот; $W_{1/2}$ - широчина на пикот при половина од неговата височина.

Како што кажавме, интензитетот на сигналот е право пропорционален со концентрацијата на соодветната компонента од смесата. За квантитативна органска анализа, базирана на хроматограмите, најчесто се употребуваат два параметри: 1. височината на пикот и 2. површината на пикот заградена од контурите на пикот.

Во хроматограмите висината на пикот помалку зависи од брзината на движењето на мобилната фаза, а површината на пикот помалку зависи од промената на составот на подвижната фаза. За пресметување на површината на пикот (од која потоа ќе се определи концентрацијата на саканата компонента) може да се употреби планиметар, интегратор или да се пресмета според изразите:

$$P = W_{1/2} \cdot h \quad \text{или} \quad P = \frac{h}{2} \cdot a,$$

каде што P - површина на пикот заградена од контурите на пикот;

h - височина на пикот;

a - широчина на пикот;

$h/2$ - половина од височината на пикот;

$W_{1/2}$ - широчина на пикот при половина од неговата височина.

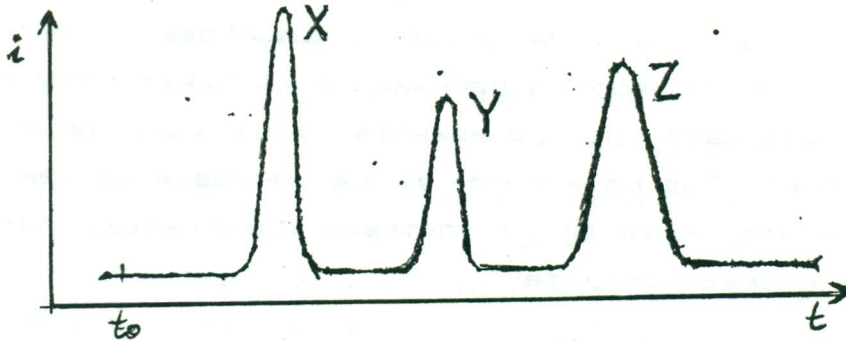
Следен чекор во приметата на хроматограмите за квантитативна органска анализа е трансформирање на вредностит P и h во податоци за квантитативниот состав. За оваа цел се применуваат следниве постапки: нормализирање, метод на внатрешна стандардизација, метод на надворешна стандардизација и метод на стандардно додавање.

2.3.1. Нормализирање

При нормализирањето се сумира површината на сите пикови од хроматограмот и се одредува уделот на супстанцијата што нè интересира употребувајќи го изразот:

$$\% X = \frac{P_x \cdot f_x}{\sum_n P_n \cdot f_n} \cdot 100$$

каде што P - површина на пикот, f - корекционен коефициент



Сл. 8. Квантитативна анализа со примена на нормализирање за пиковите од хроматограмот

Корекциониот коефициент f од своја страна е зададен со изразот:

$$f_x = \frac{P_{st}}{P_x} \cdot \frac{m_x}{m_{st}} \cdot f_{st}$$

m_x - количество на непознатата супстанција

m_{st} - количество на стандардот

f_{st} - корекциониот коефициент за стандардот е единица.

На пример, ако имаме две супстанции во еднакви количества кои даваат пикови со површина $P_x = 10$, и $P_{st} = 20$, тогаш $f_x = 2$.

Ако имаме на располагање хроматограм од три пикови (X, Y и Z) кои потекнуваат од смеса составена од три компоненти со површини $P_x = 100$, $P_y = 50$ и $P_z = 100$ и корекциони коефициенти $f_x = 1$, $f_y = 2$ и $f_z = 1$, тогаш составот на смесата ќе биде:

$$X \% = \frac{100 \cdot 1}{300} \cdot 100 = 33$$

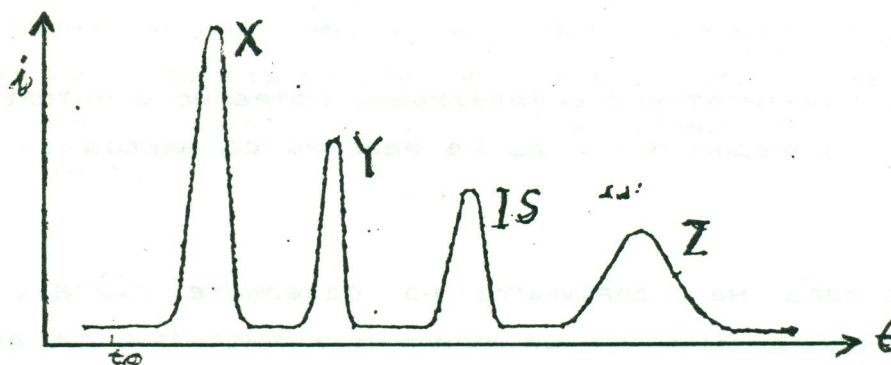
$$Y \% = \frac{50 \cdot 2}{300} \cdot 100 = 33$$

$$Z \% = \frac{100 \cdot 1}{300} \cdot 100 = 33$$

За успешно да се примени овој метод, потребно е да се исполнети следниве услови: сите компоненти треба да ја напуштат колоната, сите компоненти да бидат детектирани и да имаат ист сигнал за исто количество.

2.3.2. Метод на внатрешен стандард

Овој метод е најчесто применуван при обработката на хроматограми добиени со гасна хроматографија или со течна хроматографија. Не е неопходно да биде познат вкупниот квантитативен состав на сите компоненти во смесата. Доволно е супстанцијата што не интересира на хроматограмот да е идентифицирана и разделена од останатите компоненти во смесата. На Сл. 9. е прикажан ваков хроматограм

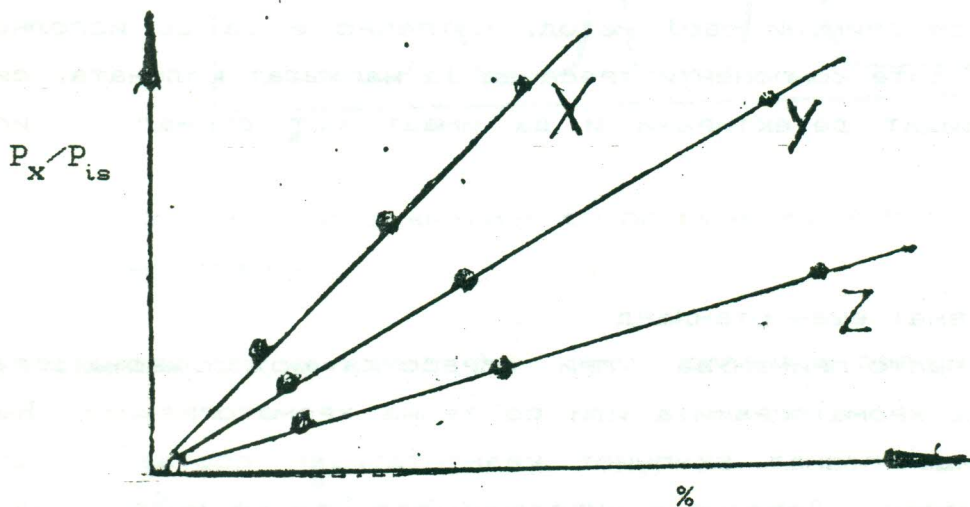


Сл. 9. Квантитативна анализа со примена на внатрешен стандард за пиковите од хроматограмот.

Пресметувањето на концентрацијата на бараната компонента се врши според изразот:

$$\% X = \frac{P_x}{P_{is}} \cdot f_x \cdot \frac{m_{is}}{m_{смеса}} \cdot 100.$$

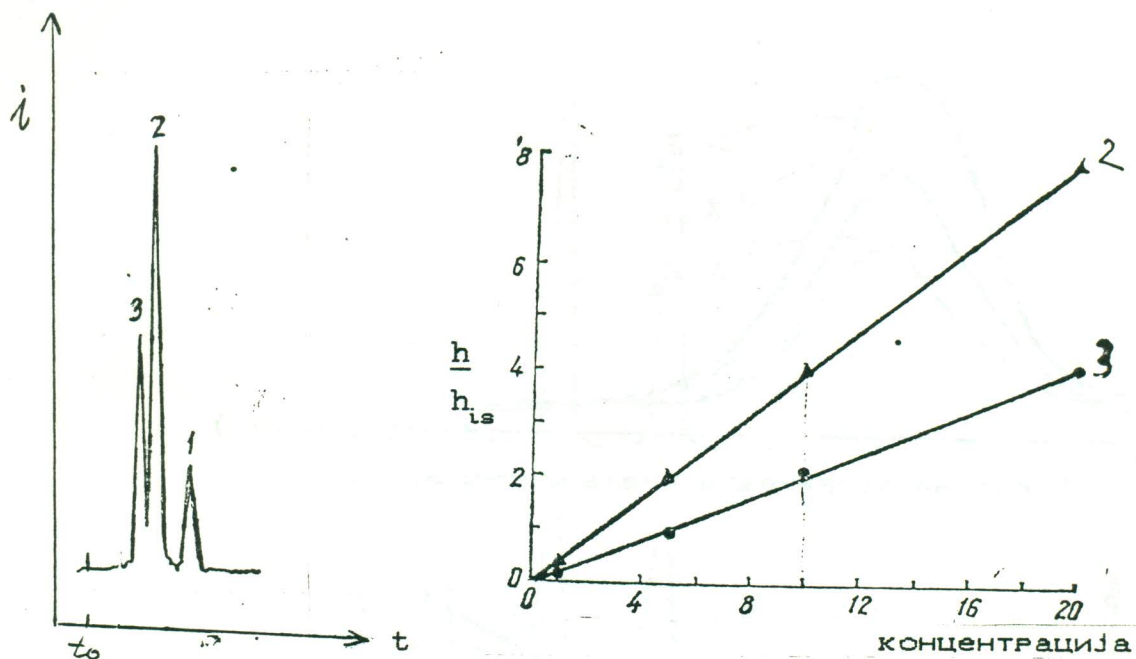
На Сл. 10 графички е прикажана линеарната корелација помеѓу односот на површините на пиковите од бараната супстанција и интерниот стандард и процентниот состав.



Сл. 10. Зависност помеѓу P_x/P_{is} и процентниот состав.

При ваквото квантитативно определување потребно е интерниот стандард да има добро изразен пик и да не реагира со некоја од компонентите од смесата.

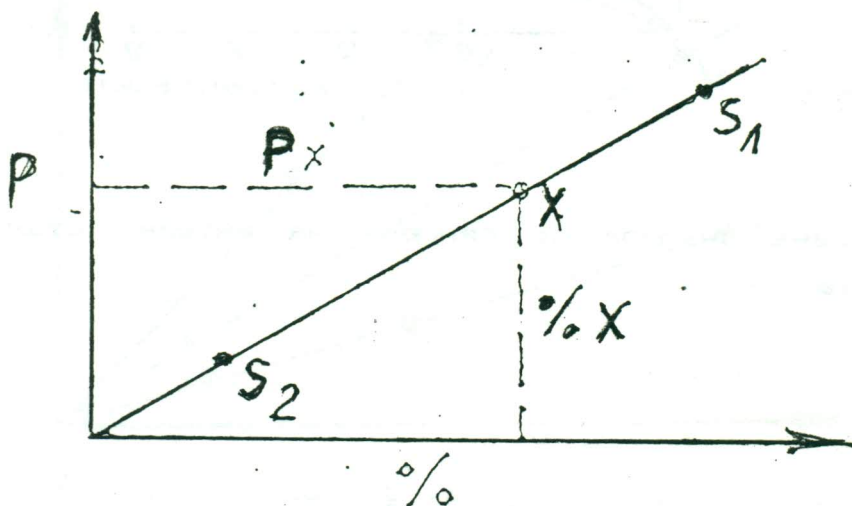
Покрај употреба на површините на одделните пикови, методот на интерен стандард може да се примени користејќи ги височините на одделните пикови (сл. 11.).



Сл. 11. Квантитативна анализа со примена на интерен стандард и височина на пиковите.

2.3.3. Метод на надворешен стандард

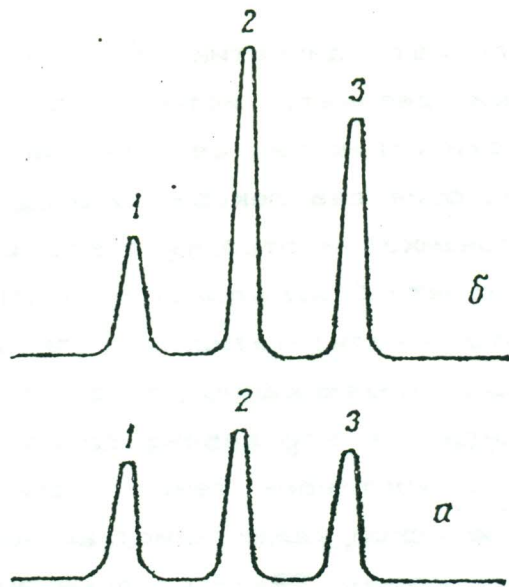
Методот е познат и како метод на апсолутна калибрација. Ваквата методологија ни е позната од спектрофотометријата при конструирањето на калибрациона крива. На сл.12. е прикажан хроматограм и калибрациона крива.



Сл. 12. Квантитативна анализа при работа со надворешен стандард.

2.3.4. Метод на стандардно додавање

Ова, исто така, е позната техника. Во хроматографската анализа се применува кога не може да се пронајде местото на пикот на бараната супстанција. Постапката е следнава: се хроматографира пробата и се добива хроматограм како на сл. 13а; да претпоставиме дека сме заинтересирани за супстанциите под број 2 и 3; се приготвува нова проба во која сме додале познато количество од супстанциите 2 и 3 (Сл.13б). Во овој случај супстанцијата 1 е референтна супстанција.



Сл. 13. Квантитативна анализа со примена на методот на стандардно додавање: а- почетен хроматограм; б- хроматограм по додавањето на познато количество од 2 и 3.

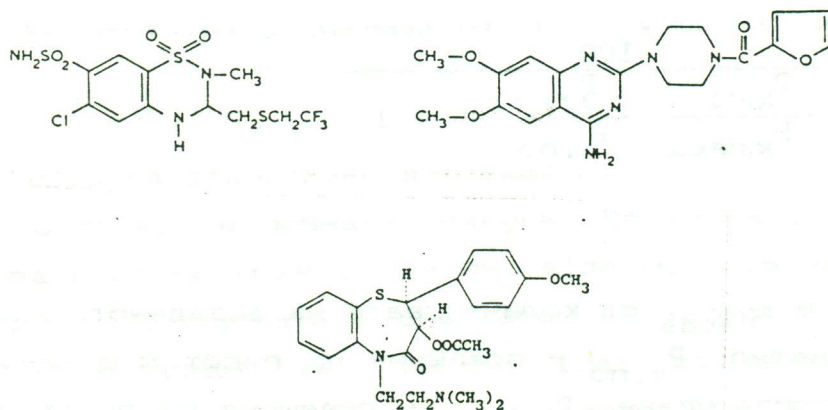
Пресметувањето на концентрацијата на бараната компонента се врши според изразот:

$$\% X = \frac{m_{\text{дод.}}}{m_{\text{проба}}} \cdot \frac{100}{\frac{P_{X,\text{по}}}{P_{X,\text{пред}}} \cdot \frac{P_{1,\text{пред}}}{P_{1,\text{по}}} - 1}$$

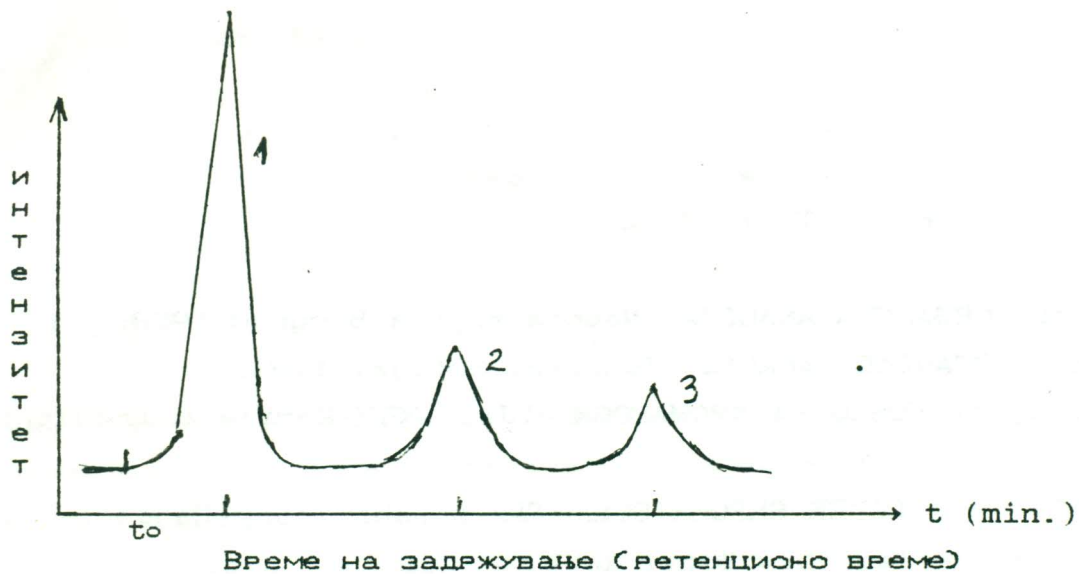
каде што: $m_{\text{дод.}}$ и $m_{\text{проба}}$ се количествата на додаденото количество и на пробата, соодветно; $P_{X,\text{по}}$ - површина на пикот што нè интересира по второто хроматографирање; $P_{X,\text{пред}}$ - површина на пикот при првото хроматографирање; P_1 - површина на пикот од референтната супстанција.

2.5. ПРИМЕНА НА HPLC ЗА КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ПОЛИТИАЗИД И ПРАЗОСИН ВО ТАБЛЕТИ

Политиазидот е добро познат диуретик и антихипертензивна, а празосинот е хинозалински дериват, исто така, антихипертензивен молекула. Нивните молекулски структури се прикажани на сл.14. Таблети кои содржат комбинација од овие два лекови (0,5 mg политиазид и 1 mg празосин по таблета) се поефикасни отколку секој од нив поединечно. Производството на вакви таблети ("Алкалоид" - Скопје) нужно наложува нивна контрола. Нивното квантитативно определување, покрај употреба на други методи, најефикасно е со примена на HPLC методот. Како интересен стандард е употребена друга органска молекула - дилтиазем. За оваа цел е употребен течен хроматограф од фирмата LKB модел 2150. Да наведеме некои карактеристики на одредувањето: мобилна фаза - ацетонитрил; колона RP-18 со димензии 25cm x 4,6 mm; проток на течната фаза 1 ml/min; UV-детекторот поставен на бранова должина од 270 nm; автоматизиран интегратор; ретенционото време на празосинот е 4,38 min, за политиазидот 6,21 min., а за интерниот стандард 9,78 min. На сл.15 е прикажан добиениот хроматограм, а резултатите за квантитативната органска анализа на активните компоненти од таблетата се дадени во табела 1.



Сл. 14. Хемиски структури на политиазид, празосин и дилтиазем.



Сл. 15. Хроматограм од примената на HPLC за квантитативно определување на политиазид и празосин во таблети; 1- празосин, 2- политиазид, 3- дилтиазем.

Табела 1.

HPLC квантитативна анализа на четири производствени серии од политиазид/празосин таблети со декларирана содржина од 0,5 mg политиазид и 1 mg празосин во таблета

серија	определена концентрација во %	
	политиазид	празосин
1	102,8 (0,9)*	99,8 (1,4)
2	100,1 (1,3)	100,4 (1,5)
3	97,9 (0,7)	99,7 (1,0)
4	98,2 (1,2)	99,1 (0,9)

* ± стандардна девијација.

3. Л И Т Е Р А Т У Р А

1. R. Halaši, ORGANSKA ANALIZA, Naučna knjiga Beograd 1982.
2. N. Dimov, ORGANIČEN ANALIZ, Tehnika, Sofija, 1984.
3. S. Turina, TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA, SKTH/Kemija u industriji 1984.
4. E. Stahl, THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, a Laboratory Handbook, 2nd ed. Spinger Verlag, New York, 1988.
5. L. R. Snyder, PRINCIPLES OF ADSORPTION CHROMATOGRAPHY, Dekker, New York, 1968.
6. H. Purnell, GAS CHROMATOGRAPHY, J. Wiley and Sons, New York, 1962.
7. B. Bogdanov, PREDICTION OF GAS CHROMATOGRAPHIC RETENTION INDEXES OF MONO-, DI- AND TRIMETILBIPHENYLS, Croatica Chemica Acta, 63, (1990) 671-682.
8. B. Panzova, M. Ilievska, G. Trendovska, B. Bogdanov, SIMULTANEOUS DETERMINATION OF POLITHAZIDE AND PRAZOSIN IN TABLETS BY SECOND-ORDER DERIVATIVE UV-SPECTROSCOPY, International Journal of Pharmaceutics 70, (1991) 187-190.