

Gyógyszerészi Kémia II.

Gyakorlati praktikum

Kuzma Mónika, Lóránd Tamás, Rozmer Zsuzsanna, Perjési Pál



**„Megújuló gyógyszerészi kompetenciák
gyakorlatorientált elsajátítását szolgáló digitális tananyagok fejlesztése
magyar és angol nyelven,
az egyetemi oktatók felkészítése a 21. század oktatási kihívásaira”
Azonosítószám: TÁMOP -4.1.2.A/1-11/1-2011-0016**

Pécsi Tudományegyetem – Pécs, 2014

© Kuzma Mónika, Lóránd Tamás, Rozmer Zsuzsanna, Perjési Pál 2014

A projekt az Európai Unió támogatásával
az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg

Kézirat lezárva: 2014. március 31.



Felelős kiadó: Pécsi Tudományegyetem

Felelős szerkesztő: Dr. Perjési Pál

Egyéb fejlesztők: Erdősné Moravec Zsuzsanna és Ódor Fábán Erika

Műszaki szerkesztő: Czulák Szilvia és Bencze Zsolt

Lektorálta: Dr. Takácsné Dr. Novák Krisztina

ISBN 978-963-642-621-7

Terjedelem: 226 oldal

Tartalom

| | |
|--|-----------|
| ÁBRAJEGYZÉK | 9 |
| ELŐSZÓ | 12 |
| I TŰZVÉDELMI ÉS BALESETVÉDELMI ISMERETEK | 13 |
| I.1 A BIZTONSÁGOS MUNKAVÉGZÉS IRÁNYELVEI..... | 13 |
| I.1.1 Laboratóriumi munkavédelem..... | 13 |
| I.1.2 Baleset- és tűzvédelem, elsősegélynyújtás | 15 |
| II A GYÓGYSZERKÖNYVBEN HASZNÁLTATOS NEMZETKÖZI MÉRTÉKEGYSÉGRENDSZER (SI) EGYSÉGEK ÉS EGYÉB MÉRTÉKEGYSÉGEK | 17 |
| III GYÓGYSZERKÖNYVI FIZIKAI ÉS FIZIKAI-KÉMIAI VIZSGÁLATOK | 20 |
| III.1 OLDÓDÁS..... | 20 |
| III.2 OLVADÁSPONT-MEGHATÁROZÁS | 24 |
| III.3 DESZTILLÁCIÓS TARTOMÁNY..... | 26 |
| III.4 FORRÁSPONT..... | 28 |
| III.5 RELATÍV SŰRŰSÉG | 29 |
| III.6 AMPEROMETRIÁS TITRÁLÁS..... | 31 |
| III.7 COULOMETRIÁS TITRÁLÁS | 39 |
| III.8 A PH POTENCIOMETRIÁS MEGHATÁROZÁSA..... | 42 |
| III.9 POTENCIOMETRIÁS TITRÁLÁS | 47 |
| III.10 AZ OLDAT KÉMHATÁSA, KÖZELÍTŐ PH-ÉRTÉKE ÉS NÉHÁNY INDIKÁTOR SZÍNE KÖZÖTTI ÖSSZEFÜGGÉS..... | 50 |
| III.11 TÖRÉSMUTATÓ | 52 |
| III.12 OPTIKAI FORGATÓKÉPESSÉG..... | 56 |
| III.13 ABSZORPCIÓS SPEKTROFOTOMETRIA AZ ULTRAIBOLYA ÉS LÁTHATÓ (UV-VIS) SZÍNKÉPTARTOMÁNYBAN..... | 61 |
| III.13.1 A spektrofotometria elméleti alapjai | 61 |
| III.13.2 Az ultraibolya és látható spektrometria alapjai..... | 63 |
| III.14 AZ ABSZORBANCIA MEGHATÁROZÁSA | 67 |
| III.14.1 Spektrofotométerek felépítése és működése..... | 67 |
| III.14.2 A fény és a közeg kölcsönhatásai | 71 |
| III.14.3 Az UV-VIS spektrofotometria kvantitatív alkalmazása..... | 73 |
| III.14.4 Az abszorbancia mérés gyakorlata | 74 |
| III.15 TÖBBKOMPONENSŰ RENDSZEREK | 77 |
| III.16 DERIVATÍV ÉS DIFFERENCIA SPEKTROFOTOMETRIA..... | 80 |
| III.16.1 Derivatív spektrofotometria..... | 80 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| III.16.2 | Differencia spektrofotometria | 80 |
| III.17 | A SPEKTRUMOT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK..... | 80 |
| III.17.1 | A pH hatása a spektrumokra | 80 |
| III.17.2 | Az oldószer hatása a spektrumokra..... | 82 |
| III.18 | AZ UV-SPEKTROSKÓPIA FELHASZNÁLÁSA A GYÓGYSZERKÖNYVBEN AZONOSSÁGI VIZSGÁLATRA | 83 |
| III.18.1 | Cyanocobalaminum azonosítása Ph. Hg. VIII. szerint | 83 |
| III.18.2 | Aceclofenacum azonosítása Ph. Hg. VIII. szerint..... | 84 |
| III.19 | ABSZORPCIÓS SPEKTROFOTOMETRIA AZ INFRAVÖRÖS (IR) SZÍNKÉPTARTOMÁNYBAN | 85 |
| III.19.1 | Az IR spektrofotometria alapjai | 85 |
| III.19.2 | Gyakorlati spektroszkópia..... | 90 |
| IV | KROMATOGRÁFIA | 108 |
| IV.1 | A KROMATOGRÁFIA ALAPJAI..... | 108 |
| IV.1.1 | Bevezetés..... | 108 |
| IV.1.2 | Kromatográfiás jellemzők..... | 109 |
| IV.2 | GÁZKROMATOGRÁFIA | 114 |
| IV.2.1 | Vivőgázok (mozgófázisok) | 115 |
| IV.2.2 | Kromatográfiás oszlopok (kolonnák, állófázisok) | 115 |
| IV.2.3 | Mintabevitel (Injektálás) | 116 |
| IV.3 | FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA..... | 119 |
| IV.3.1 | Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia | 119 |
| IV.3.2 | Méretkizárásos kromatográfia..... | 127 |
| IV.3.3 | Ioncserés kromatográfia | 128 |
| IV.3.4 | Affinitás kromatográfia | 129 |
| IV.4 | VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIA | 131 |
| IV.4.1 | A VRK módszerek csoportosítása | 133 |
| IV.5 | SZUPERKRITIKUS FÁZISÚ KROMATOGRÁFIA | 134 |
| V | ANALITIKAI ELJÁRÁSOK VALIDÁLÁSA | 137 |
| V.1 | A MÉRÉSEK HIBÁJA | 137 |
| V.1.1 | A mérőeszközök megválasztása..... | 137 |
| V.1.2 | A mérési pontatlanság formái | 138 |
| V.2 | A VALIDÁLÁS | 140 |
| V.2.1 | A validálás folyamata..... | 140 |
| V.2.2 | A validálási teljesítményjelzők | 141 |
| V.3 | A MÉRÉSI EREDMÉNYEK STATISZTIKAI JELLEMZÉSE..... | 144 |
| V.3.1 | Egy méréssorozat eredményeinek jellemzése | 145 |
| V.3.2 | Méréssorozatok összehasonlítása..... | 147 |
| V.4 | A LINEARITÁS JELLEMZÉSE..... | 149 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| V.4.1 | A regressziós egyenes paramétereinek meghatározása | 149 |
| V.4.2 | A regressziós egyenes statisztikai értékelése | 150 |
| VI | NEM-GYÓGYSZERKÖNYVI FIZIKAI ÉS FIZIKAI-KÉMIAI VIZSGÁLATOK..... | 151 |
| VI.1 | A SAVI DISSZOCIÁCIÓS ÁLLANDÓ FOGALMA, JELENTŐSÉGE ÉS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI | 151 |
| VI.2 | A MEGOSZLÁSI HÁNYADOS FOGALMA, JELENTŐSÉGE ÉS MEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREI | 166 |
| VI.2.1 | A lipofilitás fogalma, jelentősége | 166 |
| VI.2.2 | A megoszlási hányados fogalma | 167 |
| VI.2.3 | A megoszlási hányados szerepe..... | 168 |
| VI.2.4 | Az oktanol/víz rendszer | 170 |
| VI.3 | A MEGOSZLÁSI HÁNYADOS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI | 171 |
| VI.3.1 | Direkt meghatározási módszerek..... | 171 |
| VI.3.2 | Indirekt meghatározási módszerek | 172 |
| VII | GYÓGYSZER HATÓANYAGOK AZONOSÍTÁSÁNAK MÓDSZEREI..... | 176 |
| VII.1 | ISMERETLEN HATÓANYAGOK AZONOSÍTÁSÁNAK ELVI ALAPJAI..... | 176 |
| VII.2 | GYÓGYSZERKÖNYVI AZONOSSÁGI VIZSGÁLATOK | 179 |
| VIII | ÖSSZETETT GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK VIZSGÁLATA | 192 |
| VIII.1 | A VIZSGÁLAT CÉLJA, A MEGFELELŐ MÓDSZER KIVÁLASZTÁSA | 192 |
| VIII.1.1 | Az alkalmazott módszer szelektivitása és érzékenysége | 192 |
| VIII.1.2 | A komponensek elválasztásának lehetőségei | 193 |
| VIII.1.3 | Az egyes gyógyszerformák vizsgálati módszerei..... | 194 |
| VIII.1.4 | Az elvárható eredményekkel szemben támasztott követelmények | 197 |
| VIII.2 | AZONOSÍTÁSI REAKCIÓK..... | 198 |
| VIII.2.1 | Klasszikus kémiai azonosítási reakciók..... | 198 |
| VIII.2.2 | Azonosítás kromatográfiás elválasztás révén | 204 |
| VIII.3 | TARTALMI MEGHATÁROZÁSOK | 205 |
| VIII.3.1 | Bázisok meghatározása..... | 205 |
| VIII.3.2 | Gyenge savak meghatározása | 210 |
| VIII.3.3 | Műszeres analitikai eljárások alkalmazása | 211 |
| VIII.4 | PÉLDÁK A GYAKORLATBÓL..... | 212 |
| IX | FELHASZÁLT IRODALOM..... | 216 |
| X | MELLÉKLETEK | 220 |
| X.1 | IR SPEKTROFOTOMETRIA | 220 |
| X.1.1 | Spektrumgyűjtemény (hallgatói verzió) | 220 |
| X.1.2 | Spektrumgyűjtemény (oktatói verzió) | 223 |

Ábrajegyzék

| | |
|---|----|
| III-1. ábra: Készülék az olvadáspont meghatározásához..... | 25 |
| III-2. ábra: Készülék a desztillációs tartomány meghatározásához..... | 27 |
| III-3. ábra: Sűrűségmérő eszközök..... | 30 |
| III-4. ábra: Az amperometriás titrálási görbék típusai egy polarizálható elektród alkalmazása esetén..... | 34 |
| III-5. ábra: Az amperometriás titrálási görbe szerkesztése a titrálás különböző fázisaiban felvett polarogramok alapján..... | 34 |
| III-6. ábra: Biamperometriás (<i>dead stop</i>) titrálási berendezés vázlata..... | 35 |
| III-7. ábra: Két polarizálható elektróddal végzett amperometriás mérésekkel kapott titrálási görbék típusai..... | 36 |
| III-8. ábra: Coulometriás titrálóberendezés egyszerűsített vázlata..... | 40 |
| III-9. ábra: Potenciometriás pH-mérőberendezés egyszerűsített vázlata..... | 44 |
| III-10. ábra: Kombinált üvegelektrod..... | 45 |
| III-11. ábra: Potenciometriás titrálóberendezés egyszerűsített vázlata..... | 47 |
| III-12. ábra: Titrálási görbék és differenciál görbék..... | 49 |
| III-13. ábra: A beesési szög és a törési szög összefüggése..... | 52 |
| III-14. ábra: A törési határszög..... | 54 |
| III-15. ábra: Abbé-féle refraktométer..... | 55 |
| III-16. ábra: A fény, mint elektromágneses hullám..... | 56 |
| III-17. ábra: Síkban polarizált fény..... | 57 |
| III-18. ábra: Cirkulárisan polarizált fény..... | 57 |
| III-19. ábra: Optikai forgatóképesség..... | 58 |
| III-20. ábra: <i>Lippich-féle</i> félárnyék-polariméter segéd-nikolprizmával..... | 59 |
| III-21. ábra: Az elektromágneses spektrum tartományai..... | 63 |
| III-22. ábra: Jablonski diagram..... | 63 |
| III-23. ábra: Különböző típusú elektrongerjesztések energiaátmenetei..... | 64 |
| III-24. ábra: Spektrális eltolódások..... | 66 |
| III-25. ábra: Az UV-Vis spektrofotométer felépítésének egyszerűsített rajza..... | 67 |
| III-26. ábra: A spektrális sávszélesség egyszerűsített ábrázolása..... | 68 |
| III-27. ábra: Kétsugármenetes UV-Vis spektrofotométer vázlatos rajza..... | 70 |
| III-28. ábra: Diódasoros spektrofotométer vázlatos rajza..... | 71 |
| III-29. ábra: Az oldat fényelnyelését meghatározó tényezők..... | 72 |
| III-30. ábra: A szalicilsav abszorpciós spektruma (oldószer: acetonitril, koncentráció: 50µg/ml)..... | 73 |
| III-31. ábra: Az abszorbancia értékek koncentráció függvényében való ábrázolásával kapott kalibrációs egyenes..... | 75 |
| III-32. ábra: A szalicilsav vas(III)-komplexe..... | 76 |
| III-33. ábra: A szalicilsav vas(III)-komplexének kalibrációs egyenese (a szalicilsav koncentrációjának függvényében ábrázolva)..... | 76 |
| III-34. ábra: Kétkomponensű rendszer UV-Vis spektruma..... | 77 |
| III-35. ábra: <i>Benzocainum</i> (Ph. Hg. VIII) UV-Vis spektrumának pH-függése..... | 81 |
| III-36. ábra: <i>Paracetamolum</i> (Ph. Hg. VIII.) spektrumának pH-függése..... | 82 |
| III-37. ábra: <i>Acidum salicylicum</i> (Ph. Hg. VIII.) UV-Vis spektrumának oldószertől való függése..... | 83 |
| III-38. ábra: A cyanocobalaminum UV-VIS spektruma..... | 84 |
| III-39. ábra: Az aceclofenacum UV-VIS spektruma..... | 84 |
| III-40. ábra: Az elektromágneses spektrum tartományai..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| III-41. ábra: A harmonikus oszcillátor modellje | 87 |
| III-42. ábra: Fourier transzformációs Michelson interferométeres IR spektrofotométer felépítése | 91 |
| III-43. ábra: Az FT IR spektroszkópiában leggyakrabban használt oldószerek értékelhető szinképtartománya | 92 |
| III-44. ábra: Nujol FT IR spektruma | 94 |
| III-45. ábra: Folyadék-küvetta III-46. ábra: KRS-5 szendvics | 94 |
| III-47. ábra: Gázküvetta | 95 |
| III-48. ábra: ATR egység | 96 |
| III-49. ábra: Polisztirol film FT IR spektruma a hullámszám-skála hitelesítéséhez kellő sávokkal | 97 |
| III-50. ábra: A felbontóképesség ellenőrzése (polisztirol film spektrum részletei) | 98 |
| III-51. ábra: Paracetamol minta és referenciaanyag (STD) FT IR spektruma. Hasonlóság: 99,74% | 104 |
| III-52. ábra: Famotidin „A” polimorf FT IR spektruma | 105 |
| III-53. ábra: Famotidin „B” polimorf FT IR spektruma | 105 |
| IV-1. ábra: A kromatográfia elve | 109 |
| IV-2. ábra: Komponenspár elválasztásának jellemzése | 110 |
| IV-3. ábra: A kromatográfias elválasztás és szelektivitás összefüggése | 113 |
| IV-4. ábra: A van Deemter görbe: 3, 5 és 10 µm szemcseméretű állófázis esetén | 113 |
| IV-5. ábra: A gázkromatográf felépítése | 114 |
| IV-6. ábra: A kapilláris és a töltött oszlopok összehasonlítása | 115 |
| IV-7. ábra: A lángionizációs detektor felépítése | 117 |
| IV-8. ábra: Az elektronbefogásos detektor felépítése | 117 |
| IV-9. ábra: A hővezetőképesség-mérő detektor felépítése | 118 |
| IV-10. ábra: A gyógyszeriparban gyakran alkalmazott oldószerek kromatogramja | 119 |
| IV-11. ábra: A nagyhatékonyságú kromatográf felépítése | 120 |
| IV-12. ábra: A szilikagél felülete | 121 |
| IV-13. ábra: Kémiailag módosított szilikagél a fordított fázisú folyadékkromatográfiában | 123 |
| IV-14. ábra: A normál és fordított fázisú folyadékkromatográfiában alkalmazott álló- és mozgófázisok | 124 |
| IV-15. ábra: A vankomicin 3D szerkezete. A vankomicin a megjelölt funkciós csoportok által alakít ki kölcsönhatást az elválasztandó molekulával | 125 |
| IV-16. ábra: A racém ibuprofén oszlop előtti derivatizálása | 126 |
| IV-17. ábra: Ismeretlen koncentrációban ibuprofént és belső standardként diklofenák-nátriumot tartalmazó oldat kromatogramja | 127 |
| IV-18. ábra: A méretkizárásos kromatográfia elve | 128 |
| IV-19. ábra: Erős kationcserélő működésének elve | 129 |
| IV-20. ábra: Erős anioncserélő működésének elve | 129 |
| IV-21. ábra: Az affinitás kromatográfia lépései | 130 |
| IV-22. ábra: A vékonyréteg-kromatogram kifejlesztése | 132 |
| IV-23. ábra: A THC és metabolitjainak SFC-MS kromatogramja | 134 |
| V-1. ábra: Szisztematikus mérési hibák – a torzítás | 138 |
| V-2. ábra: Véletlen mérési hibák – a pontosság | 139 |
| V-3. ábra: A véletlen hibák kiküszöbölése párhuzamos mérések révén | 139 |
| V-4. ábra: A mérési hibák grafikus jellemzése | 140 |
| V-5. ábra: Normál eloszlású görbe | 144 |
| V-6. ábra: A linearitás jellemzése | 149 |

| | |
|---|-----|
| VI-1. ábra: Az acetilszalicilsav felszívódását befolyásoló tényezők | 156 |
| VI-2. ábra: Potenciometriás titrálási görbe | 159 |
| VI-3. ábra: A potenciometriás titrálási görbe (a) első (b), illetve második (c) differencia-hányados görbéi..... | 160 |
| VI-4. ábra: A paracetamol disszociációs állandójának meghatározása különbségi potenciometriás módszerrel | 161 |
| VI-5. ábra: <i>Benzocainum</i> (Ph. Hg. VIII.) UV-Vis spektrumának pH-függése..... | 164 |
| VI-6. ábra: A benzokain protonált (BH ⁺) és nemprotonált (B) formájának megoszlása a pH függvényében..... | 165 |
| VI-7. ábra: A „pH-megoszlás hipotézis” | 169 |
| VI-8. ábra: Oktanol-micellák | 170 |
| VII-1. ábra:181 | |
| VII-2. ábra:182 | |
| VII-3. ábra:183 | |
| VII-4. ábra:185 | |
| VII-5. ábra:186 | |
| VII-6. ábra:190 | |
| X-1. ábra: Szalicilsav FT IR spektruma..... | 220 |
| X-2. ábra: Acetilszalicilsav FT IR spektruma | 220 |
| X-3. ábra: Etinilösztadiol FT IR spektruma | 221 |
| X-4. ábra: Fenilbutazon FT IR spektruma | 221 |
| X-5. ábra: Folsav FT IR spektruma | 222 |
| X-6. ábra: Hidrokortizon FT IR spektruma | 222 |
| X-7. ábra: Hidrokortizon FT IR spektruma | 223 |
| X-8. ábra: Szalicilsav FT IR spektruma..... | 223 |
| X-9. ábra: Acetilszalicilsav FT IR spektruma | 224 |
| X-10. ábra: Etinilösztadiol FT IR spektruma | 224 |
| X-11. ábra: Fenilbutazon FT IR spektruma | 225 |
| X-12. ábra: Folsav FT IR spektruma | 225 |
| X-13. ábra: Hidrokortizon FT IR spektruma | 226 |
| X-14. ábra: Szulfadimidin FT IR spektruma | 226 |

Előszó

A Gyógyszerészi kémia tantárgy gyakorlati tematikájában jelentős szerepet tölt be a gyógyszeralapanyagok, a gyógyszer technológiai segédanyagok, valamint az összetett gyógyszerkészítmények gyógyszerkönyvi vizsgálatainak megismerése, a módszerek elméleti alapjainak elsajátítása. Tanulmányaik során a hallgatók először a Gyógyszerkönyv kémiai vizsgálómódszereivel (Azonossági vizsgálatok, Határérték vizsgálatok, Tartalmi meghatározások) ismerkednek meg, megismerve a vizsgálatok kémiai alapjait. A kémiai vizsgálómódszerek részletes bemutatása a Gyógyszerészi kémia I – Gyakorlati segédanyag című elektronikus tananyagunk része.

A Gyógyszerészi kémia tantárgy gyakorlati oktatása egyik fő célkitűzéseinknek tartjuk, hogy a tantárgy szigorlatának idejére a hallgatók átfogó, koherens ismeretekkel rendelkezzenek a gyógyszervegyületek fizikai-kémiai tulajdonságairól, valamint a Gyógyszerkönyv által előírt minősítésük elméletéről és gyakorlatáról.

Jelen praktikum keretében összefoglalást nyújtunk a Gyógyszerkönyv analitikai módszereinek alkalmazásáról gyógyszervegyületek és összetett gyógyszerkészítmények vizsgálatainak kapcsán. A praktikumban bemutatott gyakorlatok, bemutatások részét képezik az Intézet által oktatott tantárgy gyakorlati és szemináriumi anyagának. A Gyógyszerkönyv „Analitikai módszerek” fejezetében felsorolt, de a Gyógyszerészi kémia tantárgy keretében nem oktatott területei – így a „Biológiai vizsgálatok”, a „Biológiai értékmérő módszerek”, a „Farmakognóziás módszerek”, valamint a „Gyógyszer technológiai vizsgálati módszerek” így nem kerülnek e praktikum keretében említésre.

A szerkesztők köszönetüket fejezik ki Dr. Takácsné Dr. Novák Krisztina egyetemi tanárnőnek, aki lelkiismeretes lektori munkájával, építő jellegű megjegyzéseivel, javításaival járult hozzá, hogy a Gyógyszerészi Kémia tanulmányaikat folytató egyetemi hallgatók hiteles, megbízható elektronikus forrásból kezdjék meg az ismerkedést a tantárggyal, és a megszerzett tudásra építkezve további szaktárgyak elsajátításán keresztül kiváló gyógyszerésszé válhassanak.

A gyakorlati praktikum modulszerű felépítése lehetővé teszi, hogy a jövőben szükség szerint újabb területekkel, további bemutatásra kerülő, vagy elvégzendő kísérletekkel, számítási feladatokkal bővüljön. Ezzel kapcsolatban a praktikum szerzői örömmel vesznek minden hozzájuk eljuttatott javaslatot. Természetesen az Intézet köszönettel vesz bármi, a javításra vonatkozó megjegyzést.

Pécs, 2014. január

A szerkesztők

I Tűzvédelmi és balesetvédelmi ismeretek

I.1 A BIZTONSÁGOS MUNKAVÉGZÉS IRÁNYELVEI

I.1.1 Laboratóriumi munkavédelem

A gyakorlatok során sok, az egészségre kisebb vagy nagyobb mértékben ártalmas hatású vegyszerrel dolgozunk, valamint különböző veszélyeket magukban hordozó kísérleteket végzünk el. Kellő elővigyázatossággal, körültekintéssel, az előírások és a figyelmeztetések pontos betartásával azonban a balesetek legnagyobb része elkerülhető!

A kémiai laboratóriumi gyakorlatok speciális jellege folytán állandóan fennforgó balesetveszély megelőzése céljából fokozott gonddal ügyeljünk a gyakorlatvezetők utasításaira, a laboratóriumi rend megtartására! Soha ne feledkezzünk meg arról, hogy vigyázatlanságunkkal, vagy gondatlanságunkkal nemcsak a saját, hanem a körülöttünk dolgozók testi épségét is veszélyeztetjük!

I.1.1.1 Előkészületek a gyakorlatokra

- Olvassuk el figyelmesen a gyakorlat leírását!* Szükség esetén tanulmányozzuk a tankönyvből az elvégzendő gyakorlattal kapcsolatos elméleti részeket! Miután megértettük, jegyezzük le röviden a gyakorlat lényegét a laboratóriumi jegyzőkönyvbe. Ha valamit nem értünk, kérdezzük meg a gyakorlatvezetőtől, még mielőtt a munkát megkezdénénk!
- Készítsük elő a jegyzőkönyvünket!* A gyakorlatok rövid leírásán túl jegyezzük fel, hogy a gyakorlatokon szereplő anyagok közül melyek igényelnek óvatos kezelést, mely műveletnél kell fokozott gondossággal dolgozni!

I.1.1.2 Magatartás a gyakorlat alatt

- A kémiai laboratóriumba a gyakorlatvezető megy be először, és utoljára hagyja el azt. A gyakorlatvezető távollétében a laboratóriumba bemenni, valamint ott kísérleteket folytatni szigorúan tilos!
- A laboratóriumi gyakorlatokon köpeny és (szükség esetén) védőszemüveg használata kötelező! A laboratóriumba csak a gyakorlati jegyzet, a laboratóriumi jegyzőkönyv és a szükséges íróeszközök vihetők be!
- A gyakorlaton magatartásunk legyen mindig fegyelmezett! A balesetek legnagyobb része a kellő ismeretek hiányából, vigyázatlanságból, gondatlanságból származik!
- A laboratóriumi jegyzetben, illetve a jegyzőkönyvben leírt kísérletek módosítása, más kísérletek elvégzése a gyakorlatvezető engedélye és személyes felügyelete nélkül tilos!
- A laboratóriumi asztal tisztaságára a gyakorlat során mindig ügyeljünk! Az asztalra vagy a vegyszeres üvegek oldalára került vegyszert száraz ruhával azonnal töröljük fel!
- A laboratóriumban dohányozni, étkezni vagy inni tilos!
- Az egymás közelében dolgozók legyenek figyelemmel társaik munkájára! Szükség esetén figyelmeztessék egymást az éppen folyó kísérlet veszélyességére!

- h) A gyakorlatot a laboratóriumi asztal tisztára törlésével, a reagensek üvegedényeinek a polcokra történő visszahelyezésével, valamint a használt üvegeszközöknek a tisztára mosogatásával, és azoknak a szekrénybe történő visszahelyezésével fejezzük be. Laboratóriumi szekrényünket gondosan zárjuk be!
- i) A gyakorlatok befejezése után, a laboratórium elhagyása előtt minden esetben mossunk kezet!

I.1.1.3 A gyakorlatok elvégzésének irányelvei

- a) A gyakorlatok elején a gyakorlatvezető megbeszélést tart. Ekkor lehetőség van a gyakorlatok elvégzésével kapcsolatos elméleti és gyakorlati kérdések tisztázására.
- b) Ezt követően végezzük el a kísérleteket. A kísérleteket egyedül hajtsuk végre, és a megfigyeléseinkről azonnal készítsünk jegyzőkönyvet!
- c) A kísérletek elvégzése előtt kellő alaposággal győződjünk meg, hogy a megfelelő reagenst használjuk fel! A kísérletekhez szükséges vegyszerek cseréje egyrészt baleseteket okozhat, másrészt „megmagyarázhatatlan” megfigyeléseket eredményezhet!
- d) A kísérletekhez ne használjunk a feltétlenül szükségesnél több vegyszert! *Ennek ellenére az üvegből kiöntött, de feleslegessé vált vegyszert az üvegekbe visszaönteni tilos!*
- e) A kísérletekhez használt vegyszereket mindig kellő óvatossággal kezeljük! A vegyszerek kóstogatása, szagolgatása, vagy megérintése tilos!
- f) Az analitikai mérlegeket különös óvatossággal kezeljük! A mérlegserpenyőre ejtett üveg- vagy fémeszköz a mérleg súlyos károsodásához vezethet!
- g) Előzzük meg, hogy bármilyen vegyszer a bőrünkre, vagy a ruhánkra kerüljön. A kezünkre kerülő vegyszernyomok munka közben könnyen a szánkba, vagy a szemünkbe kerülhetnek, ahol súlyos irritációkat okozhatnak!
- h) A tömény savakat és lúgokat igénylő, valamint a kellemetlen szaggal járó reakciókat mindig működő vegyifülkében végezzük! Szükség esetén védőszemüveget vagy álarcot használjunk! Előzzük meg az illékony vegyszerek gőzeinek belélegzését!
- i) A folyadéküvegekbe üvegbottal, pipettával, vagy spatulával belenyúlni tilos!
- j) A vegyszereket mindig lassan, lehetőleg keverés közben elegyítsük! Tömény oldatok hígításakor (*különösen koncentrált kénsav esetén*), mindig a tömény oldatot öntsük lassan, keverés közben desztillált vízhez, vagy a hígabb oldathoz!
- k) A felesleges vegyszerek, valamint reakcióelegyek megsemmisítésekor szigorúan tartsuk be a gyakorlatvezető utasításait!
- l) A laboratóriumi munka alapvető követelménye az edények tisztasága. Az üvegedények mosogatását kémcsőkefével, mosószerrel végezzük. Ezt követően az edényt előbb csapvízzel, majd desztillált vízzel öblítsük ki. Ha gyorsan száraz edényre van szükségünk, a nedves edényeket szárítószekrényben vagy infralámpa alatt száríthatjuk meg.

I.1.2 Baleset- és tűzvédelem, elsősegélynyújtás

I.1.2.1 Balesetelhárítás, tűzvédelem

- a) A kísérletek megkezdése előtt győződjünk meg a használandó üvegeszközök épségéről! Repedt vagy törött eszközöket ne használjunk!
Ha munka közben bármelyik üvegeszköz eltörik, a kifolyt reakcióelegyet és az üvegcserepeket kellő óvatossággal azonnal töröljük fel, illetve gyűjtsük össze a szemetes edénybe! A törött üvegeszközt az előkészítőből pótoljuk!
- b) Egy kémcsőbe 4-5 ml folyadéknál nagyobb térfogatot ne öntsünk! A reakciók elvégzése során a kémcsőbe, vagy a lombikba nyílásán keresztül belenézni, vagy beleszagolni tilos! *A kémcső száját sohase fordítsuk magunk, vagy mások felé!*
- c) Az üvegedények melegítése előtt ellenőrizzük, hogy azok külső fala száraz-e! A kívül nedves üvegedény melegítés során könnyen elpattanhat. Ha forralunk, a kémcsövet kémcsőfogóval fogjuk meg!
- d) Erlenmeyer-lombikban, főzőpohárban úgy végezzük a forralást, hogy az edényt vasháromlábra tett azbesztlapra helyezzük, és egy szem forrkövet teszünk bele. A melegítést mindig kis lánggal kezdjük, és csak fokozatosan növeljük a láng erősségét.
- e) A Bunsen-égő meggyújtásánál először az égő gyufát tartjuk az égő kéménye fölé, és csak ezután nyitjuk ki a gázcsapot. Hogy elkerüljük az égő begyulladását, célszerű a levegőnyílásokat a meggyújtás előtt elzárni.
- f) Ha a Bunsen-égő a hevítés során mégis begyullad, amit sípoló hangjáról és zöldes lángjáról könnyű felismerni, a gázcsapot azonnal zárjuk el! Várjunk, míg lehűl, majd az előzőek szerint ismét gyűjtsük meg.
- g) Elektromos főzőlappal történő melegítéskor, vagy más elektromos eszköz használatakor ügyeljünk, hogy azt nedves kézzel ne érintsük meg, illetve, hogy arra a munka során folyadék ne kerüljön! Ha mégis előfordul (pl. melegítés során egy lombik elpattan), az elektromos kapcsoló kikapcsolásával feszültségmentesítsük a készüléket, és – lehűlés után – száraz ruhával töröljük le a folyadékot!
- h) Gyúlékony oldószerekkel (pl. éterrel, petroléterrel, alkohollal) történő munkavégzés esetén a laboratóriumban *nyílt láng használata tilos!* A légárammal tovább sodort oldószer gőzeit távolabbi láng is meggyújthatja!
- i) Sohasem szabad a tüzet fújni! Ezzel csak az égést fokozzuk, és a láng az arcunkba csap.
- j) Ha a ruhánk gyullad ki, azt nedves törölközővel vagy laboratóriumi köpennyel fojtsuk el!
- k) Kisebb térfogatú oldószer begyulladás esetén a tüzet az edény szájának óraüveggel történő lefedésével elolthatjuk. Nagyobb tűz, komolyabb veszély esetén a laboratórium falára szerelt, piros kézi tűzoltókészüléket használjuk! *Tilos vízzel oltani a vízzel nem elegyedő oldószerek (pl. benzin) okozta tüzet, a vízzel reagáló anyagokat (pl. alkálifémek) és feszültség alatti elektromos berendezéseket!* Egyidejűleg a folyosón lévő telefonon az Tűzoltóságot (105) azonnal értesítsük!
- l) Laboratóriumi tüzeset bekövetkezése esetén, a folyosón található, a laboratóriumba vezető gázcsapot és elektromos főkapcsolót azonnal zárjuk el, illetve kapcsoljuk ki! Természetesen, a sérült személyek ellátását azonnal kezdjük meg!

I.1.2.2 Elsősegélynyújtás

- a) Ha a laboratóriumban bárkit baleset ér, azt azonnal jelentse a gyakorlatvezetőnek, aki belátása szerint elsősegélyt nyújt és/vagy orvosi ellátást kér! A gyors elsősegélynyújtás elengedhetetlen feltétele a komolyabb egészségkárosodások megelőzésének!
- b) Égési sérülés esetén az égett bőrfelületet csapvízzel hűtsük és kérjünk szakellátást!
- c) Vágási sérülés esetén a sebből az esetleges szennyeződést, üvegszilánkot távolítsuk el, a vágott seb környékét fertőtlenítő-oldattal (pl. Betadine®) lemossuk! Szükség esetén ideiglenes kötést alkalmazunk és a sérültet szakrendelőbe kísérik!
- d) A bőrre kerülő vegyszereket bő vízzel azonnal mossuk le! Savak esetén azt követően a kézmosó feletti polcon található *nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal*, lúgok esetén *bórsavoldattal* semlegesítsük az érintett bőrfelületet. Végül ismét vízzel öblítjük és szükség esetén zsíros kenőccsel bekenjük azt.
- e) *Bőrre freccsent koncentrált kénsavat* először száraz ruhával töröljük le, utána mossuk csak bő vízzel, illetve semlegesítsük *nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal*!
- f) Ruhára freccsent savat híg ammóniaoldattal, vagy *nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal* közömbösíthetünk.
- g) A szánkba került vegyszereket haladéktalanul köpjük ki, majd a szánkat bő vízzel, illetve szükség esetén híg *nátrium-hidrogén-karbonát-* vagy *bórsavoldattal* öblögessünk!
- h) Szemsérülés esetén a szembe került vegyszert bő vízzel azonnal mossuk ki! Lúg esetén híg *bórsavoldatot*, sav esetén híg *nátrium-hidrogén-karbonát-oldatot* használhatunk öblítésre. Bármilyen természetű szemsérülés esetén a legrövidebb időn belül kísérik a szemsérültet a Szemészeti Klinikára!
- i) Belégzéssel történt mérgezés esetén a sérültet azonnal vigyük friss levegőre, és intézkedjünk szakorvosi ellátásáról!
- j) Áramütésnél legfontosabb a helyiség áramtalanítása (főkapcsoló). A sérültet friss levegőre kell vinni, szükség esetén mesterséges légzést alkalmazni, és haladéktalanul orvosi ellátást kell kérni.

II A Gyógyszerkönyvben használatos nemzetközi mértékegységrendszer (SI) egységek és egyéb mértékegységek

A *fizikai mennyiség* egy számérték (mérőszám) és a mértékegység szorzata. Ugyanazt a fizikai mennyiséget különböző mértékegységgel lehet mérni, 1980. január 1-től azonban csakis a nemzetközi mértékegység-rendszer (Systeme Internationale d'Unités) – jele SI – mértékegységei (SI egységek) használhatók.

A nemzetközi mértékegység-rendszer mértékegységei:

1. az alapmennyiségek
2. a kiegészítő mennyiségek
3. a származtatott mennyiségek

1. Az SI alapmennyiségei

| Mennyiség neve | Mennyiség jele | Mértékegység neve | Mértékegység jele |
|----------------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| Hosszúság | l (kis L) | méter | m |
| Tömeg | m | kilogramm | kg |
| Idő | t | másodperc | s |
| Elektromos áramerősség | I (nagy i) | amper | A |
| Termodinamikai hőmérséklet | T | kelvin | K |
| Anyagmennyiség | n | mól | mol |
| Fényerősség | I _v | kandela | cd |

Az SI alaplátmértékegységek definíciói a következők:

1. A *méter* annak az útnak a hosszúsága, amelyet a fény vákuumban 1/299 792 458 másodperc időtartam alatt megtesz.
2. A *kilogramm* az 1889. évben, Párizsban megtartott 1. Általános Súly- és Mértékügyi Értekezlet által a tömeg nemzetközi etalonjának elfogadott, a Nemzetközi Súly- és Mértékügyi Hivatalban, Sèvres-ben őrzött platina-irídium henger tömege.
3. A *másodperc* az alapállapotú cézium-133 atom két hiperfinom energiaszintje közötti átmenetnek megfelelő sugárzás 9 192 631 770 periódusának időtartama.
4. Az *amper* olyan állandó villamos áram erőssége, amely két egyenes, párhuzamos, végtelen hosszúságú, elhanyagolhatóan kicsiny körkeresztmetszetű és egymástól 1 méter távolságban, vákuumban elhelyezkedő vezetőben fenntartva, e két vezető között méterenként $2 \cdot 10^{-7}$ newton erőt hozna létre.
5. A *kelvin* a víz hármaspontja termodinamikai hőmérsékletének 1/273,16-szorosa.
6. A *mól* annak a rendszernek az anyagmennyisége, amely annyi elemi egységet tartalmaz, mint ahány atom van 0,012 kilogramm szén-12-izotópban. A mól alkalmazásakor meg kell határozni az elemi egység fajtáját; ez atom, molekula, ion, elektron, más részecske vagy ilyen részecskék meghatározott csoportja lehet.
7. A *kandela* az olyan fényforrás fényerőssége adott irányban, amely $540 \cdot 10^{12}$ Hertz frekvenciájú monokromatikus fényt bocsát ki és sugárerőssége ebben az irányban 1/683 watt/szteradián.

Az SI kiegészítő mennyiségei

| Mennyiség neve | Mennyiség jele | Kifejezése SI-alapegységekkel | Mértékegység neve | Mértékegység jele |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|
| Síkszög | $\alpha, \beta, \gamma, \dots$ | $m \cdot m^{-1}$ | radián | rad |
| Térszög | Ω, ω | $m^2 \cdot m^{-2}$ | szteradián | sr |

Az SI származtatott mennyiségei

Az alap- és kiegészítő mennyiségekből lehet a többi, származtatott mennyiséget létrehozni (a köztük megfigyelt és egyenletben rögzített kapcsolat alapján). A származtatott mennyiségek közül néhány külön nevet is kapott (mint frekvencia: hertz [Hz] = 1/s, vagy munka: joule [J] = N·m, ahol az erőegysége: newton [N] = m·kg/s²)

A Gyógyszerkönyvben szereplő, fontosabb származtatott egységek a következők:

| Mennyiség neve | Mennyiség jele | Kifejezése SI-alapegységekkel | Mértékegység neve | Mértékegység jele |
|----------------------------|----------------|--|----------------------------|-------------------|
| Hullámszám | ν | m^{-1} | reciprok méter | 1/m |
| Hullámhossz | l | $10^{-6} m$ | mikrométer | mikro |
| | | $10^{-9} m$ | nanométer | nm |
| Terület | A, S | m^2 | négyzetméter | m^2 |
| Térfogat | V | m^3 | köbméter | m^3 |
| Frekvencia | ν | s^{-1} | hertz | Hz |
| Sűrűség | ρ | $kg \cdot m^{-3}$ | kilogram/köbméter | $kg \cdot m^{-3}$ |
| Erő | F | $m \cdot kg \cdot s^{-2}$ | newton | N |
| Nyomás | p | $m^{-1} \cdot kg \cdot s^{-2}$ | pascal | Pa |
| Dinamikus viszkozitás | η | $m^{-1} \cdot k \cdot s^{-1}$ | pascal szekundum | Pa·s |
| Kinematikai viszkozitás | ν | $m^2 \cdot s^{-1}$ | négyzetméter/ szekundum | m^2/s |
| Elektromos feszültség | U | $m^2 \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-1}$ | volt | V |
| Elektromos ellenállás | R | $m^2 \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-2}$ | ohm | Ω |
| Elektromos töltésmennyiség | Q | A·s | coulomb | C |
| Mólkoncentráció | c | $mol \cdot m^{-3}$ | mól/köbméter | mol/m^3 |
| Tömegkoncentráció | ρ | $kg \cdot m^{-3}$ | kilogramm/köbméter | kg/m^3 |

A Gyógyszerkönyvben használatos nemzetközi mértékegységrendszer (SI) egységek és egyéb mértékegységek

Néhány fontos és széleskörűen használatos, de az SI-rendszerbe nem tartozó mértékegységet az alábbi táblázat foglalja össze:

| Mennyiség neve | Mennyiség jele | Kifejezése SI-alapegységekkel | Mértékegység neve | Mértékegység jele |
|----------------|----------------|---|-------------------|-------------------|
| Idő | t | 1 min = 60 s | perc | min |
| | | 1 h = 60 min = 3600 s | óra | h |
| | | 1 d = 24 h = 1440 min = 86400 s | nap | d |
| Térfogat | V | 1 l = 1 dm ³ = 10 ⁻³ m ³ | liter | l |
| Tömeg | tonna | 1 t = 10 ³ kg | tonna | t |
| Fordulatszám | | 1 r/min = (1/60) s ⁻¹ | fordulat/perc | r/min |

A mértékegységek többszörösei és törtrészei

A mértékegységek többszöröseit és törtrészeit az egység neve elé illesztett egy-egy szorzót jelentő, az alább felsorolt prefixumok egyikével kell képezni.

| Prefixum | Számérték | Jele | Prefixum | Számérték | Jele |
|----------|-------------------|------|----------|------------------|------|
| deci- | 10 ⁻¹ | d | deka- | 10 | da |
| centi- | 10 ⁻² | c | hekto- | 10 ² | h |
| milli- | 10 ⁻³ | m | kilo- | 10 ³ | k |
| mikro- | 10 ⁻⁶ | μ | mega- | 10 ⁶ | M |
| nano- | 10 ⁻⁹ | n | giga | 10 ⁹ | G |
| piko- | 10 ⁻¹² | p | tera- | 10 ¹² | T |
| femto- | 10 ⁻¹⁵ | f | peta- | 10 ¹⁵ | P |

III Gyógyszerkönyvi fizikai és fizikai-kémiai vizsgálatok

III.1 Oldódás

Az oldódás (oldás) a gyógyszerkészítés és a gyógyszerhatás kialakulásának egyik fontos művelete, illetve folyamata. Az oldódás fizikai-kémiai törvényszerűségeinek ismerete a gyógyszerészeti ismeretek egyik kiemelt fontosságú területe.

Oldás alatt azt értjük, amelynek során szilárd, folyadék vagy gáz halmazállapotú anyagot egy másik anyagban (az oldószerben) molekuláris szinten diszpergálunk. Ha az oldott anyag részecskéinek mérete 1 nm-nél kisebb, akkor *molekuláris*, ha 1-500 nm közé esik, úgy *kolloid* oldatokról beszélünk.

Az oldódás az oldószer és az oldott anyag(ok) részecskéi közötti (általában nem kovalens) kölcsönhatások eredménye. Az oldódás során az oldószer és az oldott anyag részecskéi egymás között kialakult kölcsönhatásai megszűnnek és helyettük egyidejűleg az oldószer és az oldott anyag részecskéi között új kölcsönhatások alakulnak ki. Az utóbbi folyamat neve *szolvatáció*, amennyiben az oldószer víz, akkor *hidratáció*.

A szolvatáció során különböző *intermolekuláris kölcsönhatások* alakulnak ki. Ezek közül a legfontosabbak a

- a.) hidrogénkötés
- b.) ion-dipól kölcsönhatás
- c.) orientációs (dipól-dipól) kölcsönhatás
- d.) indukciós (dipól-apoláris molekula) kölcsönhatás
- e.) London-féle (diszperziós) kölcsönhatás.

Az oldószer és az oldott anyagok között kialakuló kölcsönhatások eredményeképpen az oldatok többségében az alkotórészek mennyisége csak meghatározott arányok között változhat. Az oldandó anyagot növekvő mennyiségben hozzáadva az oldószerhez, egy adott mennyiség feloldása után további mennyiséget az adott tömegű oldószer már nem képes feloldani. Az így kapott oldat az adott oldott anyagra nézve telítetté válik. Az oldatot *telített oldat*nak nevezzük. A telített oldat koncentrációját az adott oldott anyag, adott oldószerben, meghatározott hőmérsékleten mérhető *oldhatóság*ának nevezzük.

Az oldhatóság (oldékonyság) tehát a.) az oldott anyag, b.) az oldószer, valamint c.) a hőmérséklet függvénye.

A legtöbb szilárd halmazállapotú anyag folyadékokban mért oldhatósága a hőmérséklet emelkedésével nő. Az anyagok oldhatóságának a hőmérséklet függvényében történő változása az oldódás hőszínezete alapján megjósolható. Ha az anyag *oldáshőjének* (ΔH_{old}) előjele pozitív (endoterm folyamat) akkor az anyag oldhatósága az adott oldószerben a hőmérséklet emelkedésével nő. Amennyiben az oldáshő előjele negatív (exoterm folyamat) úgy az anyag adott oldószerben mérhető oldhatósága a hőmérséklet emelkedésével csökken. Amennyiben az oldáshő értéke nem túl nagy pozitív vagy negatív érték, úgy az oldhatóság a hőmérséklet emelkedésével (csökkenésével) számottevően nem változik. Utóbbi esetre példa a nátrium-klorid oldhatósága vízben.

Oldáshő (ΔH_{old}) alatt azt a hőmennyiséget értjük, ami (állandó hőmérsékleten és nyomáson) egy mól anyag nagy feleslegben vett oldószerben történő oldásakor a

környezetnek átadódik (*exoterm*) vagy a környezetétől a rendszer által elnyelődik (*endoterm*). Az oldáshő az oldódási folyamatban elnyelődő rácsenergia ($\Delta H_{\text{rács}}$) és a felszabaduló szolvatációs energia (ΔH_{szolv}) összegéből számítható ki.

$$\Delta H_{\text{old}} = \Delta H_{\text{rács}} + \Delta H_{\text{szolv}}$$

Gázok gázokban történő „oldódása” korlátlan. Gázhalmazállapotú anyagok folyadékokban történő oldódása a hőmérséklet emelésével általában csökken. (Kivételt képeznek azok a gázok, melyek az oldószerben nem csak fizikailag oldódnak, hanem azzal reakcióba is lépnek.) A gázok folyadékokban történő oldhatóságát a gázhalmazállapotú anyag parciális nyomásának emelésével növelhetjük. *Henry-törvénye* szerint az oldószerrel reakcióba nem lépő gáz oldhatósága egyenesen arányos a gáznak az oldat felszíne felett mérhető parciális nyomásával:

$$c = \alpha \cdot P$$

ahol

c = a gázhalmazállapotú anyag oldhatósága

P = a gázhalmazállapotú anyag oldószer feletti parciális nyomása

α = a gázhalmazállapotú anyag és az oldószer anyagi minőségétől, valamint a hőmérséklettől függő állandó

Tapasztalati szabályként alkalmazható, hogy „hasonló a hasonlóban oldódik”, azaz a polárosabb oldószerek a poláros, a kevésbé poláros oldószerek az apoláros vegyületeket (részecskéket) oldják (szolvatálják) jobban. Az oldószerek polaritását *dielektromos állandóikkal, relatív permittivitásukkal, illetve dipólusmomentumukkal* szokás jellemezni. A dielektromos állandó (vagy relatív permittivitás) mértéke megmutatja, hogy egy anyagra ható elektromos feszültség hatására tárolt elektromos energia nagysága milyen mértékben változik meg a vákuumhoz képest. Más szavakkal, a dielektromos állandó egy a vizsgált anyaggal kitöltött kondenzátor kapacitásának aránya ahhoz a (megegyező tulajdonságokkal rendelkező) kondenzátorhoz képest, melynek lemezei között vákuumot hoztunk létre. A két egymással szemben (párhuzamosan) elhelyezett fémlemezről álló, ún. síkkondenzátor kapacitása geometriai méreteitől, valamint a két síklemez (fegyverzet) közötti szigetelőanyag minőségétől függ:

$$C = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot A}{d}$$

ahol

C = a síkkondenzátor kapacitása (F)

A = a kondenzátor lemezeinek felülete (m^2)

d = a lemezek távolsága

ε_0 = a vákuum dielektromos állandója ($8,854 \cdot 10^{12}$ As/V · m)

ε_r = a két fegyverzet közötti anyag relatív dielektromos állandója (mértékegység nélküli mérőszám)

A gyakorlatban leggyakrabban használt oldószerek relatív dielektromos állandóit a **III-1. táblázat** mutatja be.

A *dipólusmomentum* a részecskéken (összetett ionok, molekulák) belüli töltésszétválás mértékét jellemző vektormennyiség. Definíció szerint a dipólusmomentum vektor iránya olyan, hogy a pozitív töltésselosztás centrumából mutat

a negatív töltéeloszlás centruma felé. A gyakorlatban használt skaláris érték a dipólusmomentum vektor hossza (nomája) ami számszerűsíthető, mint a szeparálódó töltés nagyságának a szorzata. Jele μ , mértékegysége $C \cdot m$. Nem SI mértékegysége a debye (D). $1D = 3,34 \cdot 10^{-30} C \cdot m$. A gázfázisú vízmolekulák dipólusmomentuma 1,86 D. egy igen fontos tulajdonsága a dipólusmomentumnak, hogy érzékenyen függ a molekula geometriájától (konformációjától). Néhány gyakorlatban használt oldószer dipólusmomentumát a **III-1. táblázat** foglalja össze.

III-1 táblázat: Néhány oldószer relatív dielektromos állandója és dipólusmomentuma

| oldószer | relatív dielektromos állandó (ϵ) | dipólusmomentum (μ) (Debye-egys.) |
|-------------------|---|---|
| n-Hexán | 1,88 | 0,095 |
| Dioxán | 2,21 | 0,045 |
| Szén-tetraklorid | 2,24 | 0 |
| Benzol | 2,28 | 0 |
| Éter | 4,34 | 1,15 |
| Kloroform | 4,81 | 1,15 |
| Etil-acetát | 6,02 | 1,88 |
| Ecetsav | 6,15 | 1,68 |
| Diklór-metán | 8,93 | 1,14 |
| n-Butanol | 17,51 | 1,75 |
| Aceton | 20,70 | 2,69 |
| Etanol | 24,55 | 1,66 |
| Metanol | 32,70 | 2,87 |
| Nitro-metán | 35,87 | 3,56 |
| Dimetil-formamid | 36,71 | 3,86 |
| Dimetil-szulfoxid | 46,68 | 3,9 |
| Víz | 80 | 1,85 |

Elektromos térben dipólusmomentummal nem rendelkező molekulák esetén is létrejön az ún. *indukált dipólusmomentum*. Indukált dipólusmomentum kialakulását eredményezi permanens dipólus (poláros oldószermolekulák) polározható részecskékkel (polározható oldott anyag) kialakult nem kovalens kölcsönhatása is. Az indukált dipólusmomentum vektor egyenesen arányos a molekulára ható térerősséggel, az arányossági tényező a molekula polarizálhatósága (α).

$$E_{ind} = - \frac{1}{r^3} \cdot \frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2}{4 \pi \epsilon_0}$$

ahol

E_{ind} = az indukciós kölcsönhatás energiája

r = a molekulák tömegközéppontja közötti távolság

μ_1 = poláris molekula (részecske) állandó dipólusmomentuma

α = az apoláros molekula polarizálhatósága

ϵ_0 = a vákuum dielektromos állandója

Ez a kölcsönhatás előfordul például a poláros vízmolekulák és az apoláros jód molekulák között.

A molekulákban zajló folytonos elektronmozgás következtében az atommagok körüli elektronsűrűség pillanatról pillanatra változik. Az aszimmetrikus elektroneloszlás, valamint az elektronfelhők kölcsönös taszítása miatt a molekula pillanatról pillanatra polarizálódik (dipólussá válik). A pillanatnyi dipólus karakterű molekulák között fellépő kölcsönhatás – az ún. diszperziós kölcsönhatás – nagysága egyenesen arányos a molekula az ionizációs energiával (I) valamint polarizálhatóságával (α).

$$E_{diszp} = \frac{1}{r^6} \cdot \frac{3 \alpha_1 \alpha_2}{2 n^4} \cdot \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}$$

ahol

E_{diszp} = a diszperziós kölcsönhatás energiája
 r = a molekulák tömegközéppontjai közötti távolság
 α = a molekulák polarizálhatósága
 n = a közeg törésmutatója
 I = a molekula első ionizációs energiája

A *Lorentz-Lorenz-egyenlet* (amely *Clausius-Mossotti-egyenlet*ként is ismert) alapján a nagy törésmutatójú anyagoknak nagy a polarizálhatósága. A Lorentz-Lorenz-egyenlet legáltalánosabb formája:

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} = \frac{4 \pi}{3} \cdot N \cdot \alpha$$

ahol

n = a refraktív index
 N = a molekulák száma egységnyi térfogatban
 α = az átlagos polarizálhatóság

A Gyógyszerkönyv az anyagok oldásának jellemzésére a **III-2. táblázatban** szereplő kifejezéseket alkalmazza. (A használt kifejezések 15-25 °C közötti hőmérsékletre vonatkoznak.)

III-2 táblázat: A Gyógyszerkönyv „oldékonyság” címszó alatt használt kifejezései

| Kifejezések | 1 g anyagra vonatkoztatott megközelítő oldószertérfogat milliliterben |
|---------------------------|---|
| Nagyon bőségesen oldódik | <1 |
| Bőségesen oldódik | 1-10 |
| Oldódik | 10-30 |
| Mérsékelten oldódik | 30-100 |
| Kevéssé oldódik | 100-1000 |
| Alig oldódik | 1000-10 000 |
| Gyakorlatilag nem oldódik | >10 000 |

Feladat: Gyűjtsön össze a Gyógyszerkönyvben szereplő hatóanyagok közül 5-5 anyagot, melyek a Gyógyszerkönyv által definiált, különböző rendelkeznek. A vegyületek szerkezete alapján értelmezze a szerkezet-oldékonyság összefüggéseket!

III.2 Olvadáspont-meghatározás

Az olvadáspont az a hőmérséklet, amelyen valamely szilárd anyag és folyékony fázis egymással egyensúlyban van. Az olvadáspont az anyag szerkezetétől függő fizikai állandó. Az olvadáspont nagy pontossággal mérhető, mert a tiszta anyag melegítése során az olvadáspont elérése után a hőmérséklet mindaddig állandó marad, amíg szilárd fázis is van jelen. Az olvadási folyamat során az anyaggal közölt hőmennyiség az olvadási hő fedezését biztosítja. Egységes tiszta anyagnak általában éles, egy °C hőmérséklet-tartományon belül mérhető olvadáspontja van.

Az anyag olvadáspontját befolyásoló tényezők a.) az anyag szennyezettségének mértéke, b.) a szennyező anyag minősége, valamint c.) a kristályvíz- és nedvességtartalom.

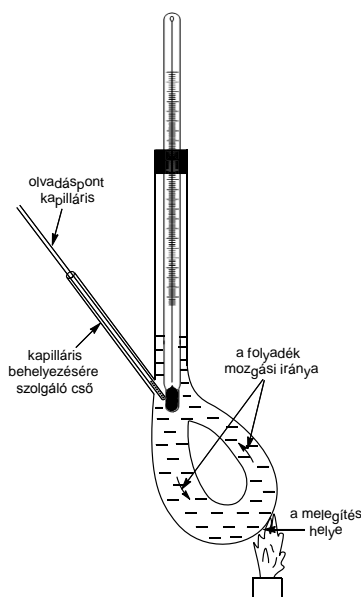
Az olvadt anyagban oldódó szennyezések csökkentik az olvadáspontot. Ezen túlmenően a szennyezett anyag általában nem egyetlen hőmérsékleten olvad meg, hanem az olvadási folyamat bizonyos hőmérsékletei határok között játszódik le. Ettől eltérően viselkednek az úgynevezett *eutektikus elegyek*, melyek olvadás szempontjából úgy viselkednek, mint a tiszta anyagok: az eutektikus összetételhez tartozó, meghatározott, állandó olvadáspontjuk van.

Vannak olyan anyagok, amelyek olvadáspontjuk körül elbomlanak. Ilyenkor az olvadáspont elhúzódik, az anyag megolvadás előtt elszíneződik, megbarnul, esetleg gáz fejlődik. Ezeknek az anyagoknak *bomlásipontjuk* van.

A Gyógyszerkönyv előírása szerint az olvadáspont meghatározására a.) a *kapilláris módszer*, b.) *nyitott kapilláris módszer*, valamint c.) az ún. *gyors módszer* használható. A *kapilláris módszerrel* történő meghatározáshoz a **III-1 ábrán** látható készülék használható. A készülék egy hurokszerű kialakítású üvegeszköz, melyet szilikonolajjal töltünk fel. A készülékbe felülről egy hőmérő illeszkedik, és két oldalcsövön keresztül helyezhetjük be a mérendő mintát tartalmazó kapillárist. A melegítéshez mikroégőt használunk, az ábrának megfelelő ponton, a hurok végét melegítve. Ezen a helyen az olaj felmelegszik, sűrűsége lecsökken, felfelé kezd áramlani, a helyére hidegebb, nagyobb sűrűségű olaj érkezik. Ügyelnünk kell, hogy a mérés során a melegítés ne legyen túl gyors; a hőmérő ugyanis a higanyzsákjának hőmérsékletét mutatja, és ez eltérhet az olajfürdő, illetve az anyagot tartalmazó kapilláris hőmérsékletétől. Túl gyors melegítés esetén az olaj gyorsabban melegíti fel a kis mennyiségű mérendő anyagot, mint a jóval nagyobb hőkapacitású higanyzsákot. Ekkor az anyag megolvadásának pillanatában a hőmérő alacsonyabb hőmérsékletet fog mutatni a ténylegesnél, és így a valódi olvadáspontnál kisebb értéket fogunk mérni.

A készüléket az Egészségügyi Világszervezet (WHO Collaborative Research Centre for Chemical Reference Substances) olvadáspont-referenciaanyagaival vagy más alkalmas anyagokkal kalibrálhatjuk.

Az olvadáspont egyszerűbben, gyorsabban és pontosabban mérhető elektromosan fűthető olvadáspontmérő készülékben, melynek felfűtési sebessége szabályozható. A kapillárisba töltött, készülékbe helyezett minta változását a felfűtés során egy nagyítóval ellátott ablakon keresztül figyelhetjük meg.

III-1. ábra: Készülék az olvadáspont meghatározásához

A Gyógyszerkönyv előírása szerint a meghatározáshoz a vizsgálandó anyagot finoman elporítva és vékony rétegben kiterítve 24 órán át tömény kénsav fölött exsikkátorban szárítjuk, hacsak az egyes cikkelyek másképpen nem írják elő. Az így kiszáritott mintából annyit viszünk be a kapillárisba, hogy abból – a kapillárist kb. 60 cm hosszúságú „ejtőcsőben” ejtetve – mintegy 2 mm magasságú oszlop képződjön.

Feladat: Egy ismert anyag (*Ureum*, Ph. Hg. VIII.) és egy ismeretlen anyag olvadáspontjának meghatározása.

1. Gyakorló mérés végzése karbamiddal (*Ureum*, Ph. Hg. VIII.)

- a.) Az elporított és exsikkátorban 24 órán kénsav felett tárolt karbamidot az egyik végén gondosan leforrasztott kapillárisba töltjük. Ezt úgy végezzük, hogy a kapilláris nyitott végét az anyagba nyomjuk és a bejuttatott anyagot, a kapillárist (óraüvegre állított üvegcsőbe) ejtetve az aljára rázzuk, tömörítjük. Kb. 2 mm hosszan célszerű a kapillárist megtölteni, ekkor olvadáskor az anyag hirtelen összehúzódása is jól láthatóan jelzi az új fázis kialakulását.
- b.) A kapillárist behelyezzük az olvadáspont-mérőkészülékbe úgy, hogy az anyag pontosan a higanyzsák előtt helyezkedjen el, így biztosítani tudjuk, hogy a kapilláris és a hőmérő higanyzsákja környezetében azonos legyen a hőmérséklet.
- c.) Mikroégővel melegítjük a készüléket; az első, közelítő mérésnél kb. 10 °C/perc sebességgel. Amikor a kristályok élei kezdenek megolvadni, feljegyezzük az olvadáspontot.
- d.) Kivesszük a megolvadt anyagot tartalmazó kapillárist, és kb. 30 °C-kal a mért olvadáspont alá hagyjuk hűlni a készüléket.
- e.) Újabb kapillárist helyezve a készülékbe, az első, közelítő mérés után még legalább két mérést végzünk, de ekkor olvadáspont 20 °C-os közelében csak 1–2 °C/perc melegítést alkalmazunk. Amennyiben két mérés során is sikerült a karbamid 133 °C-os olvadáspontját meghatározni, elkezdhetjük az ismeretlen anyag mérését.

2. Ismeretlen hatóanyag olvadáspontjának mérése

- a.) A elporított és exszikkátorban 24 órán kénsav felett tárolt vizsgálandó anyagot a karbamidnál leírtakhoz hasonlóan az egyik végén gondosan leforrasztott kapillárisba töltjük.
- b.) A kapillárist belehelyezzük az olvadáspontmérő készülékbe úgy, hogy az anyag pontosan a higanyzsák előtt helyezkedjen el (lásd fent).
- c.) A mikroéggővel melegítjük a készüléket, először kb. 10 °C/perc sebességgel. Amikor a kristályok élei kezdenek megolvadni, feljegyezzük az olvadáspontot.
- d.) Kivesszük a megolvadt anyagot tartalmazó kapillárist, és kb. 30 °C-kal a mért olvadáspont alá hagyjuk hűlni a készüléket.
- e.) A következő mérést úgy végezzük, hogy a mért olvadáspont 20 °C-os közelében csak 1–2 °C/perc melegítést alkalmazunk.
- f.) Az első, közelítő mérés után még három mérést végzünk, a mérési eredmények átlagaként adjuk meg a mért olvadáspont értékét.

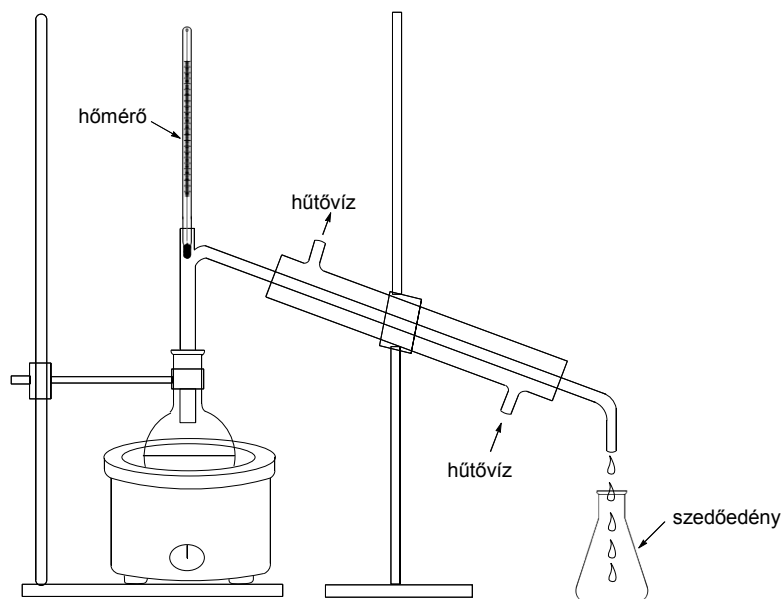
III.3 Desztillációs tartomány

A desztilláció az a művelet, amelynek során a folyadékot elpárologtatjuk, majd a gőzöket más helyen hűtéssel kondenzáltatjuk. A művelet terméke a párlat vagy desztillátum. A desztilláció célja:

- a.) egy folyadék elválasztása a nem illékony szennyeződésektől,
- b.) különböző forráspontú anyagok szétválasztása, vagy
- c.) egységes anyagok azonosságának és tisztaságának ellenőrzése.

A Gyógyszerkönyv által definiált desztillációs tartomány az a 101,3 kPa (760 torr) nyomásra korrigált hőmérsékleti tartomány, amelyen belül a Gyógyszerkönyvben specifikált körülmények között a folyadék, vagy a folyadék meghatározott része desztillál.

A gyógyszerkönyvi készülék egyszerűsített rajza a **III-2. ábrán** látható. A készülék részei a.) a desztilláló lombik, b.) a lombik oldalcsővéhez csatlakozó köpenyes (*Liebig*-féle) hűtő, valamint c.) a hajlított végű hűtőcső (gólyaorr) alatt elhelyezett szedőedény. A frakcionáló lombikban keletkezett gőz a ferde helyzetű *Liebig*-féle hűtőben cseppfolyósodik, majd a gólyaorron keresztül a szedőedénybe kerül.

III-2. ábra: Készülék a desztillációs tartomány meghatározásához

A hőmérőt oly módon helyezük el a lombik nyakába, hogy higanytartályának felső szintje az oldalsó kivezető nyílás legalsó pontjánál 5 mm-rel mélyebbre kerüljön. A hőmérő 0,2 °C beosztású legyen, és kb. 50 °C-os hőmérséklettartományt foglaljon magába. A mérés folyamán a lombikot, beleértve a nyakát is óvjuk a légmozgástól. Még a melegítés megkezdése előtt a lombikba forráskönnyítőt kell helyezni (pl. horzsakövet, üveggyöngyöt, mázatlan cserepet vagy üvegapillárist). A forráskönnyítőkkel a késleltetett forrást akadályozzuk meg, ugyanis ilyenkor hirtelen sok buborék képződik, amelyeknek lökésszerű feltörése a lombik összetörését okozhatja.

A desztillálható folyadék melegítésének módja a forráspontjától és gyúlékonyságától függ. Pl. gyúlékony, 100 °C alatt forró anyagnál vízfürdőt használunk. A hűtés módja: 120 °C alatti forráspontú folyadékoknál hűtőben áramló csapvizet, 120–160 °C közöttieknél állóvizet, a 160 °C felettiéknél léghűtést alkalmazunk.

Bemutató: *Petroléter* (Ph. Hg. VIII.) desztillációs tartományának meghatározása

A gyógyszerkönyvi vizsgálat során a desztilláló lombikba 50,0 ml vizsgálandó folyadékot mérünk és néhány szem forráskövet szórunk bele. A desztillátumot ml-es beosztású 50 ml térfogatú mérőhengerbe gyűjtjük. Vízhűtés mellett a lombikot úgy melegítjük, hogy a forrás gyorsan meginduljon. Feljegyezzük azt a hőmérsékletet, amelyen az első csepp desztillátum a mérőhengerbe cseppen. A fűtést ezt követően úgy szabályozzuk, hogy percenként 2-3 ml folyadék desztilláljon. Végül feljegyezzük azt a hőmérsékletet, amelyen a folyadék teljes mennyisége desztillált.

Az észlelt hőmérsékleti értékeket a következő képlet segítségével a normál légköri nyomásra (101,3 kPa) korrigáljuk:

$$t_1 = t_2 + k (101,3 - b)$$

ahol

t_1 = a korrigált hőmérséklet

t_2 = a b légköri nyomáson mért hőmérséklet

k = a korrekciós faktor (lásd **III-3. táblázat**)

b = a desztilláció folyamán mért légköri nyomás kPa mértékegységben kifejezve

III-3 táblázat: Hőmérséklet-korrekció

| Desztillálási hőmérséklet (°C) | Korrekciós faktor (<i>k</i>) |
|--------------------------------|--------------------------------|
| < 100 | 0,30 |
| 100-140 | 0,34 |
| 140-190 | 0,38 |
| 190-240 | 0,41 |
| > 240 | 0,45 |

A vizsgált minta desztillációs tartománya a Gyógyszerkönyv előírása szerint 50-70 °C között kell, hogy legyen.

III.4 Forráspont

A folyadékok feletti gőztérben minden hőmérsékleten megtalálhatók a folyadék molekulái; ez a folyamat a *párolgás*. A gőztenzió (egyensúlyi gőznyomás) az a nyomás, amit egyensúlyi állapotban az anyag elpárolgó gőze hoz létre. A gőztenzió függ a hőmérséklettől: az a hőmérséklet, amelyen a tenzió eléri a külső nyomást, a *forráshőmérséklet*. Folyadékok forráspontján – ha külön nincs rá utalás – azt a hőmérsékletet értjük, amelyen a tenzió eléri a 101,3 kPa nyomást. A mért forráshőmérsékletet 760 Hgmm-re (101,3 kPa-ra) korrigálva kapjuk meg a *forráspontot*.

A forrásban lévő tiszta anyag hőmérséklete – ha a nyomás nem változik – a melegítés hatására nem emelkedik, mert a közölt hőmennyiség a folyadék gőzzé alakulásához szükséges párolgási hő fedezésére használandó fel.

Nagyobb mennyiségű anyagok forráspontját legegyszerűbben desztillációval határozhatjuk meg. A desztilláció során ügyelnünk kell arra, hogy a forrás egyenes legyen (forrkő) és hogy a hőmérőt elegendő egyensúlyi állapotban lévő gőz vegye körül.

A Gyógyszerkönyv előírása szerint a forráspont meghatározására a „Desztillációs tartomány” meghatározásához előírt készüléket használjuk, azzal az eltéréssel, hogy a lombik nyakába illesztett hőmérő higanytartályának alja a desztilláló lombik nyaki és gömbrészének találkozásával egy magasságban legyen, és a lombikot olyan, hőszigetelő anyagból készült lapra helyezzük, amelynek a közepén 35 mm átmérőjű kör alakú nyílás van.

Bemutató: Ethanolum (96 per centum) (Ph. Hg. VIII.) forráspontjának meghatározása

A desztilláló lombikba 20 ml vizsgálandó folyadékot töltünk, majd néhány szem horzsakövet szórunk bele. A lombikot úgy melegítjük, hogy a forrás gyorsan meginduljon. Azt a hőmérsékletet olvassuk le, amelyen a desztillátum az oldalesőből a hűtőbe kezd folyni.

Az észlelt hőmérsékletet a következő képlet segítségével a normál légköri nyomásra (101,3 kPa) korrigáljuk:

$$t_1 = t_2 + k (101,3 - b)$$

ahol

t_1 = a korrigált hőmérséklet

t_2 = a b légköri nyomáson mért hőmérséklet

k = a korrekciós faktor (lásd **III.3. táblázat**)

b = a desztilláció folyamán mért légköri nyomás kPa mértékegységben kifejezve

A Gyógyszerkönyv szerint a vizsgált minta forráspontja kb. 78 °C.

III.5 Relatív sűrűség

A sűrűség (ρ) az anyag egységnyi térfogatának (V) tömege (m):

$$\rho = \frac{m}{V}$$

$$\rho = \frac{m}{V} \rightarrow m = \rho \cdot v$$

A sűrűség SI mértékegységrendszerben elfogadott egysége a kg m^{-3} . A laboratóriumban a g cm^{-3} vagy g dm^{-3} egységeket használjuk.

Mivel az anyag térfogata hőmérsékletfüggő, következésképpen a sűrűsége is változik a hőmérséklet függvényében. Ha az anyag 0°C hőmérsékletű, akkor a sűrűségét *normálsűrűségnek* nevezik. Ettől eltérő t hőmérsékleten a ρ_t sűrűséget a térfogatváltozásból számíthatjuk. A különböző hőmérsékleten mért sűrűségek és térfogatok fordítottan aránylanak egymáshoz:

$$\rho_t : \rho_0 = V_0 : V_t$$

ebből:

$$\rho_t = \frac{\rho_0 \cdot V_0}{V_t} = \frac{\rho_0 \cdot V_0}{V_0(1+\alpha t)}$$

ahol

α az anyag köbös hőtágulási együtthatója.

Az így definiált sűrűséget *abszolút sűrűségnek* nevezzük. A gyakorlatban igen gyakran találkozunk a *relatív sűrűség* fogalmával, különösen mérések alkalmával. A *relatív sűrűség* egy viszonyszám, amely megadja, hogy valamely anyag abszolút sűrűsége hányszorosa a vonatkoztatási anyag abszolút sűrűségének. A vonatkoztatási anyag gázoknál leggyakrabban a levegő, a cseppfolyós és szilárd anyagoknál a víz. A relatív sűrűség (d) eszerint két, azonos fizikai körülmények között – tehát azonos nyomáson és hőmérsékleten – mért abszolút sűrűség (ρ) hányadosa.

A Gyógyszerkönyv definíciója szerint valamely anyag *relatív sűrűsége* (d_{20}^{20}) az anyag 20°C hőmérsékleten mért tömegének és a vele azonos térfogatú és hőmérsékletű víz tömegének hányadosa. A relatív sűrűséget (d_{20}^{20}) a cikkelyben megadott pontossággal *aerométerrel* (III-3 ábra; a), *piknométerrel* (III-3 ábra; b), vagy *hidrosztatikai mérleggel* (Mohr-Westphal mérleggel) (III-3 ábra; c) mérjük. A méréskor a levegő felhajtóerejét nem vesszük figyelembe; ez a harmadik tizedesjegyben egy egységnyi hibát okozhat.

A sűrűség jellemzésére két másik definíció is használatos.

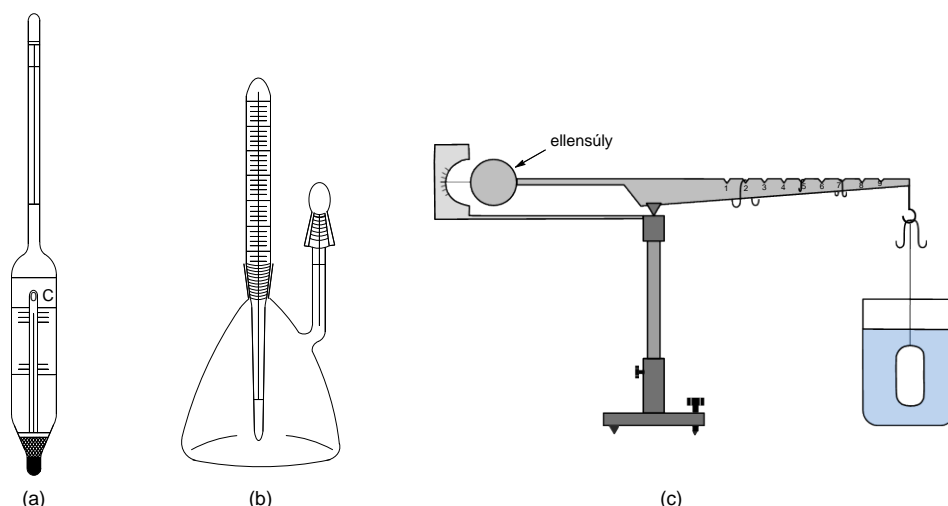
Valamely anyag d_4^{20} szimbólummal jelölt *relatív sűrűsége* a vizsgált anyag 20°C -on meghatározott tömegének valamint a vele azonos térfogatú desztillált víz 4°C -on mért tömegének a hányadosa. A 4 ($3,98$) $^\circ\text{C}$ -os víz sűrűsége kb. $1000,00$ ($999,9720$) $\text{kg/m}^3 = 1,00000$ ($0,999972$) g/cm^3 .

A relatív sűrűség (d) és a kg m^{-3} egységben kifejezett (abszolút) sűrűség (ρ) közötti számszerű összefüggések a következők:

$$\rho_{20} = 998,202 d_{20}^{20} \quad \text{vagy} \quad d_{20}^{20} = 1,00180 \cdot 10^{-3} \rho_{20}$$

$$\rho_{20} = 999,972 d_4^{20} \quad \text{vagy} \quad d_4^{20} = 1,00003 \cdot 10^{-3} \rho_{20}$$

$$d_4^{20} = 0,998230 d_{20}^{20}$$

III-3. ábra: Sűrűségmérő eszközök

A folyadékok sűrűségét kényelmesen és gyorsan *areométerrel* (III-3. ábra: a) határozhatjuk meg. Az areométer alul kiszélesedő és megterhelt gömbben végződő üvegcső. Működése *Arkhimédész törvényén* alapszik. Az areométer addig süllyed a folyadékba, míg az általa kiszorított folyadék súlya egyenlővé nem válik az egész areométer súlyával.

A merülés mértéke tehát függ a folyadék sűrűségétől, amit az areométer vékony csövén levő skálán leolvashatunk. Egy-egy areométer adott sűrűség tartományban alkalmazható. Ennek megfelelően kétféle areométert alkalmaznak a méréseknél. A *kereső areométereket* alkalmazzák a vizsgálandó folyadék sűrűségének közelítő meghatározásához, illetve a mérési tartomány kiválasztásához. A tényleges méréshez pedig, csak abban a tartományban alkalmazható *mérő areométert* használnak. Az areométeres sűrűség meghatározás az előzőekhez képest kevésbé időigényes módszer.

A *piknométeres* módszer esetében sűrűségmérést tömeg- és térfogatmérésre vezethetjük vissza: ismert térfogatú folyadék tömegét megmérjük, majd a tömeg/térfogat arányból kiszámítjuk a sűrűséget. A *piknométer* (III-3. ábra: b) lombikra emlékeztető hasas, szűk nyakú edény. A nyílása csiszolatos kapillárisal zárható, amelyen egy körbefutó jel a folyadékszint pontos beállítását biztosítja.

Feladat: *Ethanolum (96 per centum)* (Ph. Hg. VIII.) relatív sűrűségének és etanol tartalmának meghatározása

Mérés piknométerrel.

Az üres, száraz piknométer tömegét, dugóval együtt, analitikai mérlegen megmérjük (m_1), majd a kb. 20 °C hőmérsékletű vizsgálandó mintával úgy töltjük meg, hogy a folyadék meniszkusza valamivel a körkörös jel alatt legyen. Ezután a piknométert $20 \pm 0,1$ °C hőmérsékletű vízfürdőbe állítjuk. A piknométert 20 perc elteltével, de még a vízfürdőben, kapilláris pipettával úgy pontosan a jelig, hogy a meniszkusz legalsó pontja éppen érintse a körkörös jelet. A piknométer nyakát belül a körkörös jel fölött szükség esetén szűrőpapírcsíkkal kiszárítjuk, és dugóval lezárjuk.

A piknométert a vízfürdőből kivéve gondosan szárazra töröljük, 15 percre a mérlegszekrénybe állítjuk, majd tömegét újból pontosan megmérjük (m_2). A folyadékkal telt piknométer és az üres piknométer tömegének különbsége adja a lombikba férő folyadék (*Ethanolum*) tömegét (m_f).

A mérés után a vizsgálandó folyadékot kiöntjük, a piknométert gondosan kimossuk, majd ugyanúgy, mint a vizsgálandó folyadék esetében, kb. 20 °C hőmérsékletű *R vízzel* jelig töltjük, majd újra megmérjük (m_3). A benne lévő folyadék (*R víz*) tömege:

$$m_v = m_3 - m_1$$

A vizsgálandó minta (folyadék) tömegének (m_f) és az *R víz* azonos módon mért tömegének (m_v) hányadosából (m_f/m_v) a relatív sűrűséget 20 °C-ra az alábbi képlet alapján számoljuk ki:

$$\rho_{20^\circ\text{C}} = \frac{m_f}{m_v} \cdot 0,997003 + 0,0012$$

A Gyógyszerkönyv előírása szerint az *Ethanolum* (96 per centum) készítmény relatív sűrűségének 0,805-0,812 g/cm³ közé kell esnie.

Az etanoltartalom meghatározása

A Gyógyszerkönyv előírása szerint vizsgált minta etanoltartalmát a meghatározott relatív sűrűségének ismeretében a következő (III-4) táblázat alapján határozzuk meg (Ph. Hg. VIII.)

III-4 táblázat: Alkoholmetriás táblázat

| %v/v | % m/m | ρ_{20} | %v/v | % m/m | ρ_{20} | %v/v | % m/m | ρ_{20} |
|------|-------|-------------|------|-------|-------------|------|-------|-------------|
| 94,0 | 91,01 | 0,8151 | 95,0 | 92,41 | 0,8113 | 96,0 | 93,84 | 0,8074 |
| 94,1 | 91,15 | 0,8148 | 95,1 | 92,55 | 0,8109 | 96,1 | 93,98 | 0,8070 |
| 94,2 | 91,29 | 0,8144 | 95,2 | 92,69 | 0,8106 | 96,2 | 94,13 | 0,8066 |
| 94,3 | 91,43 | 0,8140 | 95,3 | 92,83 | 0,8102 | 96,3 | 94,27 | 0,8062 |
| 94,4 | 91,56 | 0,8136 | 95,4 | 92,98 | 0,8098 | 96,4 | 94,42 | 0,8057 |
| 94,5 | 91,70 | 0,8133 | 95,5 | 93,12 | 0,8094 | 96,5 | 94,57 | 0,8053 |
| 94,6 | 91,84 | 0,8129 | 95,6 | 93,26 | 0,8092 | 96,6 | 94,71 | 0,8049 |
| 94,7 | 91,98 | 0,8125 | 95,7 | 93,41 | 0,8086 | 96,7 | 94,86 | 0,8045 |
| 94,8 | 92,13 | 0,8121 | 95,8 | 93,55 | 0,8082 | 96,8 | 95,01 | 0,8041 |
| 94,9 | 92,27 | 0,8117 | 95,9 | 93,69 | 0,8088 | 96,9 | 95,16 | 0,8037 |

A vizsgált minta C₂H₆O tartalma a Gyógyszerkönyv előírása szerint 95,1-96,9 % v/v (92,6-95,2 % m/m) értékek között legyen.

III.6 Amperometriás titrálás

Az analízis elektrokémiai módszerei azokat az eljárásokat foglalják magukba, melyek az elektrolitokban történő áramvezetés valamint a fémes vezetők és az elektrolitok fázishatárán lejátszódó jelenségeken alapulnak. E definíció alapján az elektroanalitikai eljárások közé soroljuk

- a.) az elektrolízisen alapuló módszereket, mint a
 1. voltammetria
 2. elektrogravimetria, és
 3. coulometria;

- b.) az elektródpotenciálok meghatározásán alapuló módszereket, mint a potenciometria; valamint
- c.) az elektrolitok vezetőképességének meghatározásán alapuló módszereket, mint a
1. konduktometria, és
 2. oszcillometria

Az amperometria a voltammetriás eljárások közé tartozó elektrokémiai módszer. A voltammetriás módszerek az elektrokémiai folyamatok során alkalmazott feszültség és ennek hatására az elektrolitoldaton átfolyó áram erőssége közötti függvénykapcsolatot használják analitikai célokra. A voltammetriás mérések során az elektroaktív anyagot tartalmazó elektrolitoldatba merülő két elektródra, a munka- és a referenciaelektródra egyenletesen növekvő feszültséget kapcsolunk, és annak függvényében mérjük az oldaton átfolyó áram erősségét. Az áramerősséget a molekulaelektrod potenciáljának függvényében ábrázolva kapjuk a voltammetriás görbét. A görbe egyaránt hordoz kvalitatív és kvantitatív információkat az elektrolizáló cellában lejátszódó változásokról.

Az elektrolizáló cellán csak akkor folyik áram, ha az elektródreakcióban résztvevő komponens transzportja az oldat belsejéből az elektród felszínére folyamatos. Ez történhet koncentráció gradiens hatására fellépő *diffúzió*, ez *elektromos erőtér* hatására bekövetkező vándorlás, vagy külső *mechanikus hatás* (pl. kevertetés) útján.

A feszültség-áram görbék értelmezése lényegesen egyszerűbb, ha az elektrolízis olyan kísérleti körülmények között zajlik, amelyek mellett a diffúziós anyagtranszport a meghatározó folyamat.

A voltammetriás mérések során zömében két olyan elektródot alkalmazunk, amelyek egyike sokkal nagyobb mértékben polarizálódik, mint a másik elektród. A cellára kapcsolt feszültség és az elektródok potenciálja között egyszerű összefüggés áll fenn:

$$V = E_a - E_k + i R$$

ahol

E_a = az anód potenciálja

E_k = a katód potenciálja

i = az átfolyó áramerősség

R = a cella ellenállása

Mivel a nempolarizálható elektród potenciálja állandó, a cellára kapcsolt feszültség csak az egyik elektród (munkaelektrod, indikátorelektrod) potenciálját változtatja meg, és ennek az elektródnak a potenciálváltozása a cella feszültségváltozásával megegyező.

Polarizálható elektródként a voltammetriás módszereknél leggyakrabban higanyelektrodot alkalmaznak. A higanyelektrod a rajta fellépő nagy hidrogén túlfeszültség miatt a negatív potenciáltartományban előnyösen alkalmazható. Ezért a higanyelektrodokat elsősorban redukciók végrehajtására alkalmazzák. Ezzel szemben a platina- és a grafittelektrod polarizálhatósági tartománya az anódos alkalmazásuknak kedvez, mivel az elektródokon a hidrogén-túlfeszültség nagyon kicsi. Ezért a platina- és grafittelektrodok elsősorban oxidációs folyamatok vizsgálatára használhatók.

Az elektródreakció lényege az elektronátlépés. A katódnak kapcsolt elektródon redukció, az anódon oxidáció játszódik le. Az elektródreakcióba vihető anyagot

depolarizátornak nevezzük. Az elektrolízis során az anódos folyamatokban egyenértéknyi mennyiségű depolarizátor vesz részt.

Az elektródreakciót követően a termék az elektród felületére kiválva azon adszorbeálódhat, higanyelektród esetén abban amalgámot képezve oldódhat. A kivált termék további kémiai átalakulásban is részt vehet, vagy eltávozhat az elektródtól.

A *voltammetriás analitikai módszerek* leggyakoribb eljárásai a.) a *polarográfia* és b.) az *amperometria*. E praktikum keretében csak a Gyógyszerkönyvben is alkalmazott amperometriás méréseket tárgyaljuk.

A voltammetriás áramerősség koncentrációfüggése titrálások végpontjának meghatározására is alkalmazható. Ezen az elven alapulnak a voltammetriás végpontjelzési módszerek. A voltammetriás elektródokra megfelelő potenciálkülönbséget kapcsolva a depolarizátor elektródreakciója által keletkező áramerősséget mérjük a mérőoldatfogyás függvényében.

Az amperometriás módszernek egy- vagy két polarizálható elektróddal végzett változata ismeretes. A két polarizálható elektróddal végzett végpontjelzési módszert „*dead stop*” módszernek, vagy kétszeres amperometriának (*biamperometriának*) nevezzük.

Amperometriás titrálás

Az amperometriás titrálások során mérőoldatként olyan ismert koncentrációjú reagensoldatot használunk, amely csökkenti a depolarizátor koncentrációját (pl. csapadékképzéssel, redukcióval) vagy az elektródreakcióhoz szükséges potenciált negatív irányba tolja el (pl. komplexképzéssel). A hozzáadott mérőoldat térfogatrészleteinek függvényében mért határáram változás és a mérendő komponens koncentrációja közötti összefüggés (*Ilkovic-egyenlet*) – az elektródpotenciál koncentráció függését leíró logaritmikus összefüggéstől (*Nernst-egyenlet*) eltérően – lineáris.

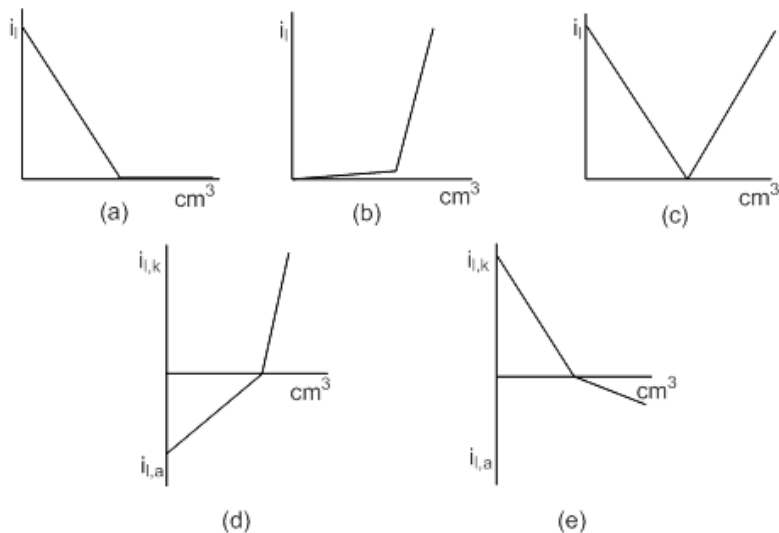
Az amperometriás titrálás végpontját úgy határozzuk meg, hogy a vizsgálandó oldatba merülő két elektród (egy polarizálható (indikátor-) elektród és egy nempolarizálható összehasonlító elektród) között állandó feszültséget fenntartva az áramerősség változását mérjük a hozzáadott mérőoldat mennyiségének függvényében. A polarizálható (indikátor-) elektródot a meghatározni kívánt anyag tulajdonságainak megfelelően választjuk meg és kapcsoljuk a mérőcella katódjaként vagy anódjaként. Az indikátorelektród potenciálját úgy kell megválasztani, hogy biztosítsuk az elektrokémiai aktív anyag diffúziós áramát. Indikátorelektródként használhatunk platina-, csepegő higany-, forgókorong- vagy szén-elektródot, összehasonlító elektródként pedig kalomel- vagy ezüst/ezüst-klorid-elektródot.

A titrálás során először megmérjük a vizsgálandó anyagot tartalmazó alapoldat határáramát, majd a várható végpont értékétől függően, a titrálás során állandó mérőoldat részleteket adagolunk. A műszert minden mérési pontban akkor olvassuk le, amikor a kapott áramjel már nem mutat az idővel egyirányú változást.

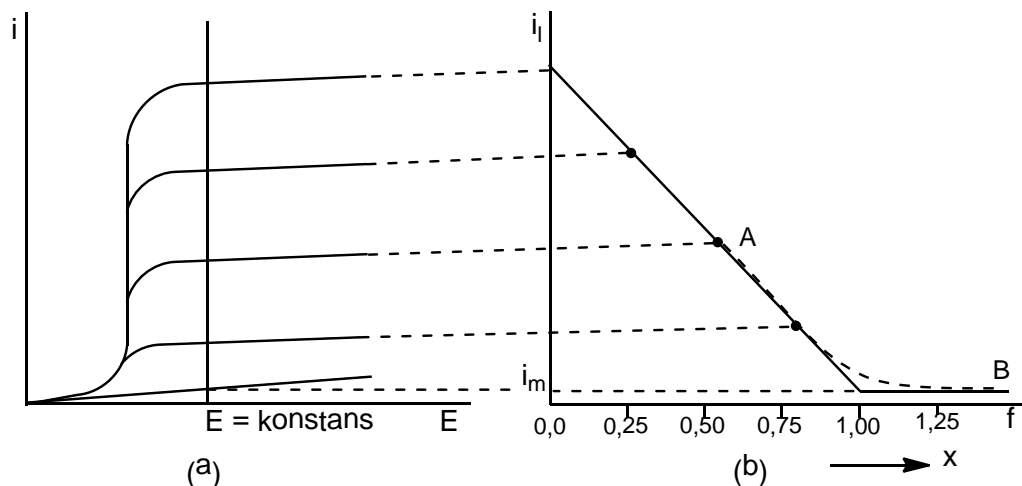
Az amperometriás titrálási görbe az összetartozó i és V értékpárok grafikus ábrázolása. Az amperometriás titrálási görbék típusait a **III-4. ábra** szemlélteti. Az ábra a.) görbét abban az esetben kapjuk, ha a meghatározandó anyag, a b.) görbét, ha a mérőoldat anyaga, míg a c.) görbét, ha a választott elektródpotenciálon mind a meghatározandó anyag, mind a mérőoldat anyaga részt vesz az elektródreakcióban. Az

a.) görbe szerkesztését a titrálás különböző szakaszaiban felvett áram-feszültség (i - V) görbékéből a **III-5. ábra** mutatja be.

III-4. ábra: Az amperometriás titrálási görbék típusai egy polarizálható elektród alkalmazása esetén



III-5. ábra: Az amperometriás titrálási görbe szerkesztése a titrálás különböző fázisaiban felvett polarogramok alapján

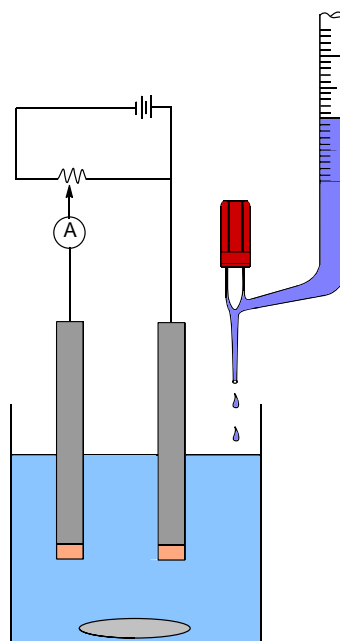


Az amperometriás titrálások további típusait a **III-4. ábra** d.) és e.) titrálási görbéi mutatják be. A d.) titrálási görbe annak az esetnek felel meg, amikor a választott elektródpotenciálon a mérendő komponens oxidációs, a mérőoldat feleslege redukációs áramot ad le. Hasonlóképpen, az e.) titrálási görbe annak a meghatározásnak az áram-feszültség (i - V) görbéje, amelyben a mérendő anyag redukációs, a mérőoldat feleslege oxidációs áramot ad le.

Biamperometriás (dead-stop) titrálás

A klasszikus amperometriás végpontjelzési módszer módosított változata a két indikátorelektrodos ún. *biamperometriás végpontjelzés*. A biamperometriás titrálás olyan térfogatos analitikai eljárás, amellyel a biamperometriás mérőcella áramerősségének (i) mérése révén követjük egy reverzibilis redoxrendszer oxidált vagy redukált komponensének az adagolt mérőoldat hatására bekövetkező csökkenését vagy egy új reverzibilis redoxrendszer megjelenését.

A biamperometriás mérőcella a vizsgálandó oldatba merülő két, azonos méretű és anyagú polarizálható elektródot tartalmaz (**III-6. ábra**).

III-6. ábra: Biamperometriás (*dead stop*) titrálási berendezés vázlata

Az elektródokra általában nem túl nagy, kb. 0,01-0,1 V állandó polarizáló-feszültséget kapcsolunk. A mérőoldat hozzáadott térfogatrészleteinek függvényében mérjük a cellán átfolyó áram nagyságát. Áram csak akkor folyhat át a cellán, ha mindkét elektródon elektródreakció (a katódon redukció, az anódon oxidáció) mehet végbe. Mivel az alkalmazott polarizáló feszültség kicsi, a cellában áram csak akkor folyhat, ha a titrálás adott szakaszában valamelyik reverzibilis redoxrendszer mindkét komponense jelen van. Ekkor elektrolízis játszódik le. Az áram nagyságát mindig a kisebb koncentrációban jelenlévő komponens határozza meg.

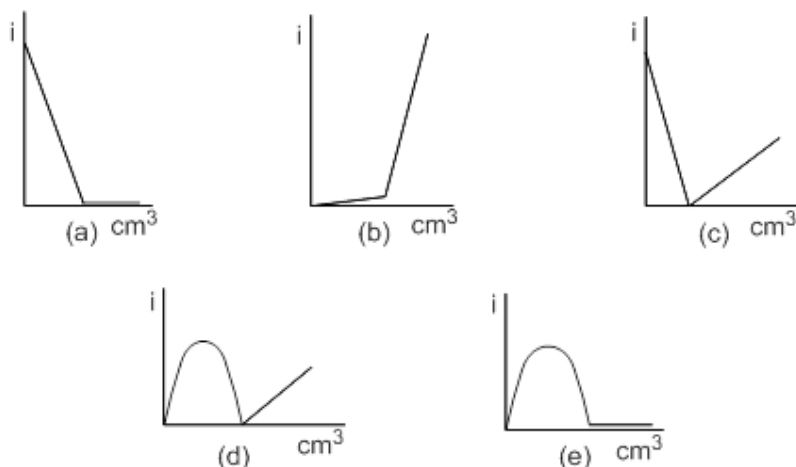
Amikor a titrálás során e reverzibilis redoxrendszer valamelyik formája elfogy, az egyik elektródon megszűnik az elektródreakció lehetősége és nem folyik tovább áram a rendszeren. Az áram megszűnése jelzi a titrálás végpontját („dead stop”).

A biamperometriás mérések szempontjából *polarizálható elektródoknak* nevezzük azokat az elektródokat, amelyekre az előbb leírt körülmények között feszültséget kapcsolva, reverzibilis redoxrendszer távollétében csak igen kicsi, legfeljebb 1-2 μA áram mérhető. Nemesfém vagy grafit, általában platina tű- vagy lemezelektrodokat használunk.

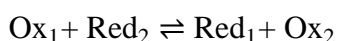
A titrálási görbék kvalitatív magyarázata a titrált redoxrendszer két komponensének (Ox_1 és Red_1) valamint a mérőoldat-redoxrendszer két

komponensének (Ox_2 és Red_2) koncentráció változása alapján értelmezhető. Az amperometriás titrálási görbék különböző típusait a **III-7. ábra** mutatja be.

III-7. ábra: Két polarizálható elektróddal végzett amperometriás mérésekkel kapott titrálási görbék típusai



A titrálások általános esete, ha mind a mérendő rendszer, mind a mérőoldat hatóanyaga elektrokémiailag reverzibilis:



Ez esetben, egy redukált formában jelen lévő meghatározandó anyag (Red_2) oxidáló mérőoldattal (Ox_1) történő titrálása esetén (**III-6. ábra; d**), a titrálás kezdetén a rendszer nem tartalmaz Ox_2 részeket, így a katódon nincs lehetőség elektródreakcióra – tehát a rendszeren nem folyik áram ($i = 0$). A titrálás során az $[Ox_2]$ részek koncentrációja folyamatosan növekszik, és az áramerősség maximumát az 50%-os titrálási fok esetén ($[Ox_2] = [Red_2]$) mérhetjük. Ezt követően a $[Red_2]$ koncentrációja az $[Ox_2]$ koncentrációjához képest fokozatosan csökken, és ez fogja megszabni az áramerősséget. Az ekvivalenciapontban $[Red_2] = 0$, és az Ox_1/Red_1 redoxrendszer sem tud áramot szolgáltatni, mivel a mérőoldatban található Ox_1 oxidálószer még nincs a rendszerben. Ezért az ekvivalenciapontban az áramerősség minimumra csökken, majd az oldatot túltitrálva a mérőoldatból keletkező redoxrendszer (Ox_1 és Red_1) elektródreakciója fogja az áramot szolgáltatni.

Előfordulhat olyan eset, amikor a két redoxrendszer közül az egyik olyan mértékben irreverzibilis, hogy az alkalmazott polarizáló feszültség nem éri el a rendszer túlfeszültségét. Ekkor a **III-7. ábra** (a), (b) vagy (c) görbét kapjuk. Amennyiben a redukált formában jelen lévő meghatározandó anyag (Red_2) irreverzibilis redoxrendszert képviselő oxidáló mérőoldattal (Ox_1) titrálunk, a titrálás kezdete előtt a rendszeren nem folyik át áram, hiszen $[Ox_2] = 0$. Az ekvivalenciapont eléréséig az áramerősséget meghatározó (kisebb koncentrációban jelen lévő) $[Ox_2]$ folyamatosan nő, és 50%-os titrálás esetén maximális áramerősséget mérhetünk. Ezt követően az áramerősséget a $[Red_2]$ koncentrációja az $[Ox_2]$ koncentrációhoz képest fokozatosan csökken, és ez fogja az átfolyó áramerősséget megszabni. Az ekvivalenciapontban $[Red_2] = 0$, és az előzőek alapján az áramerősség minimumra csökken. Az oldatot túltitrálva az áramerősség nem nő, mivel a mérőoldat hatóanyaga nem képez reverzibilis redoxrendszert (**III-7. ábra: e**).

Amennyiben oxidált formában jelen lévő reverzibilis redoxrendszert képző meghatározandó anyagot (pl. jódoldat) titrálunk irreverzibilis redoxrendszert képző redukálószerrel (pl. nátrium-tiosulfáttal), akkor ugyancsak az **III-7. ábra (e)** görbéjéhez hasonló titrálási görbét kapunk.

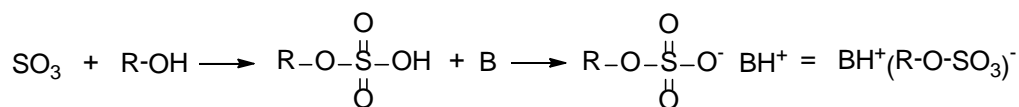
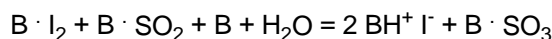
Amennyiben egy reverzibilis redoxrendszer oxidált formájában lévő anyag (Ox_1 pl. jódoldat) titrálását a reverzibilis redoxrendszer redukált formája (Red_1 pl. jodidionok) feleslegének jelenlétében kezdjük meg, úgy az elektródreakció feltételei már a titrálás kezdetén adottak. A kisebb koncentrációban jelen lévő oxidálószer (Ox_1 pl. jód) koncentrációja a titrálás során fokozatosan csökken, egészen az ekvivalenciapontig, és ennek megfelelően az áramerősség folyamatosan csökken az ekvivalenciapontig (**III-7. ábra: a és c**). Amennyiben a mérőoldat hatóanyaga irreverzibilis redoxrendszer redukált formája (pl. nátrium-tiosulfát) túltitrálás esetén sem tapasztalható az áramerősség növekedése (**III-7. ábra: c**). Amennyiben a mérőoldat hatóanyaga reverzibilis redoxrendszer redukált formája úgy túltitrálás esetén az áramerősség növekedése figyelhető meg (**III-7. ábra: c**).

A titrálási görbék kiértékelésekor figyelembe kell venni, hogy a legtöbb titrálási reakció egyensúlyra vezet. Ennek következtében a titrálás végpontja előtt és után egyenes, a végpont környezetében viszont görbe szakaszokat kapunk. Ilyen esetekben a titrálás végpontja az előbb említett egyenes szakaszok extrapolálásával megszerkesztett metszéspont.

Víz meghatározás biamperometriás (dead-stop) titrálással

A gyógyszerészi gyakorlatban az amperometriás titrálást a legkiterjedtebben a víztartalom Karl Fischer módszerével végzett meghatározásnál használják. Ez a módszer *biamperometriás* végpontjelzéssel a víztartalom érzékeny és pontos meghatározására alkalmas.

A titrálóedényben lévő két platinaelektródra 10-50 mV polarizáló feszültséget kapcsolunk, és az előzetesen megtitrált metanolban oldják a vizsgálandó anyagot, majd vízmérő jód ($SO_2 + I_2$) mérőoldattal titráljuk, ami a felszabaduló sav megkötésére alkalmas bázist (B) is tartalmaz. A gyógyszerkönyvi R jód-kénessav-reagens piridin bázist tartalmaz.



Az egyenértékponthoz a jód már nem lép reakcióba (nincs víz a rendszerben), és minimális feleslege hatására a cellán áram folyik át. Mindkét elektród depolarizálódik, a katódon a kis feleslegben lévő jód redukciója, az anódon pedig a jodidionok oxidációja megy végbe, ezért a cellán a jód koncentrációjával arányos áram folyik át (mindig a redoxrendszer kisebb koncentrációban jelen lévő komponense szabja meg az áramot). A módszer előnye, hogy a szokásos, kb. 4 mg/ml víztartékú mérőoldattal végzett, kb. 20-40 mg tömegű víz meghatározásánál az állandó áram megjelenése egyértelműen, a csepphibán belül jelzi az egyenértékpontot. Csak nyomnyi víz (pl. porampullák nedvességtartalma) meghatározásánál szükséges titrálási görbét felvenni, és az egyenértékpontot ennek alapján megállapítani.

Feladat: Ismert gyógyszeralapanyag víztartalmának meghatározása amperometriás titrálással

A Gyógyszerkönyv előírása szerint a víztartalom titrálással történő meghatározásának (Karl Fischer-féle félmikro-módszer) kivitelezése a következő:

A kb. 60 ml-es titrálóedényhez két platinaelektród, a nitrogéngáz bevezetésére szolgáló cső, a buretta bevezetését is biztosító dugó és a szárítóanyaggal védett szellőzőcső csatlakozik. A vizsgálandó anyagot a csiszolatos dugóval zárható oldalnyíláson át juttatjuk a titrálótérbe. A titrálás folyamán az oldat keveréséről mágneses keverővel vagy szárított nitrogén áramoltatásával gondoskodunk.

A végpontot amperometriásan határozzuk meg. Az alkalmas mérőrendszer része egy 1,5 V feszültségű elem és a hozzá csatlakozó kb. 2000 Ohm ellenállású potenciométer, amellyel változtatható feszültség biztosítható. A feszültséget úgy állítjuk be, hogy a platinaelektródon és a velük sorba kapcsolt mikroampermérőn kis intenzitású áram haladjon át. Minden reagensrészlet hozzáadására kitér a mikroampermérő mutatója, de azonnal vissza is tér a kiindulási helyzetébe. A titrálás végpontját a legalább 30 másodpercen át megmaradó kitérés jelzi.

Az *R jód-kénessav-reagens* vízegyenértékét használat előtt meg kell határozni. A felhasznált kémszereknek és oldatoknak vízmentesnek kell lenniük, ennek érdekében a meghatározás során valamennyi művelet légnedvességtől védve kell végezni. Az *R jód-kénessav-reagenst* fénytől védve, lehetőleg automata burettával felszerelt tartályban tartjuk.

A kereskedelemből beszerezhető jód-kénessav-reagensek összetétele gyakran eltér a gyógyszerkönyvi oldatétól, annyiban, hogy a piridint különböző egyéb bázisokkal helyettesítik. Az ilyen oldat alkalmasságát felhasználás előtt meg kell vizsgálni, és minden egyes esetben igazolni kell a sztöchiometriát, valamint azt, hogy a vizsgálandó anyag és a reagens között nincs összeférhetetlenség.

Ha nincs más előírás, az „A” módszer szerint végezzük a meghatározást.

„A” módszer. A titrálóedénybe kb. 20 ml *R vízmentes metanolt* vagy előírt oldószert mérünk, és amperometriás végpontjelzést alkalmazva, *R jód-kénessav-reagenssel* megtitráljuk. A vizsgálandó anyag előírt mennyiségét gyorsan a titrálóedénybe juttatjuk. Egy perces keverés után a titrálást *R jód-kénessav-reagenssel* a végpontig titráljuk.

„B” módszer. A titrálóedénybe kb. 10 ml *R vízmentes metanolt* vagy előírt oldószert mérünk, és amperometriás végpontjelzést alkalmazva, *R jód-kénessav-reagenssel* megtitráljuk. A vizsgálandó anyag megfelelő mértékben elporított, előírt mennyiségét gyorsan a titrálóedénybe juttatjuk, majd pontosan mért, kb. 1 ml-es feleslegben lévő vagy előírt térfogatú *R jód-kénessav-reagenst* adunk hozzá. A lezárt lombikot 1 percig vagy a cikkelyben előírt ideig, időközönként összekeverve, fénytől védve állni hagyjuk. Az *R jód-kénessav-reagens* feleslegét *R víz R vízmentes metanollal* vagy a cikkelyben előírt oldószerral készült, pontosan ismert - kb. 2,5 g/l - töménységű oldatával addig titráljuk, amíg az áramerősség a kezdeti értékre csökken.

Vizsgálat: Az előírás szerint beállítjuk az indikátorelektród potenciálját, majd a kezdeti és a titrálás folyamán mért áramerősség-értékeket az adagolt mérőoldat térfogatának függvényében ábrázoljuk. Az elméletileg várható végpont eléréséhez szükséges mérőoldat-mennyiségnek kb. 80%-át legalább három, egymást követő

részletben adagoljuk az oldathoz. A három áramerősség-érték egy egyenesen helyezkedik el. A titrálást a várható végpont után is folytatva legalább három további mérőoldatrészletet adunk az oldathoz. Az így nyert értékeknek is egy egyenesre kell esniük. A titrálás végpontját a két egyenes metszéspontja jelenti.

III.7 Coulometriás titrálás

Coulometria név alatt foglaljuk össze a Faraday II. törvényére alapított analitikai eljárásokat. Faraday II. törvénye szerint:

$$m = \frac{M}{n \cdot F} \cdot Q$$

ahol

m = az elektrolíziskor leválasztott anyag tömege

M = a leválasztott anyag móltömege

n = az elektródreakcióban résztvevő elektronok száma

F = a Faraday-féle állandó (96487 C)

Q = az elektrolizáló cellán átfolyt töltés

A coulometriás mérések alkalmazhatóságának alapvető kritériuma a 100%-os áramhasznosítás, mivel az áthaladt töltésmennyiségből számítjuk a meghatározandó anyag mennyiségét. Általánosságban elmondható, hogy 100%-os áramkihasználás akkor érhető el, ha a meghatározás során nem lépnek fel zavaró mellékreakciók. Az áramkihasználás hatékonyságát lerontó mellékreakciók között megemlítendőek azok az esetek, amikor:

- a meghatározandó anyag mellett az oldószer is elektródreakcióba lép,
- az áram áthaladásakor az elektród anyaga is változást szenved,
- a kísérőanyagok is reagálnak,
- az elektrolízis terméke másodlagos kémiai reakcióba lép.

A coulometriás méréseket két csoportba sorolhatjuk:

- Közvetlen vagy direkt coulometriáról* beszélünk akkor, ha a meghatározandó anyagot közvetlen elektródreakcióba visszük, és a kvantitatív átalakításhoz szükséges töltésmennyiséget mérjük.
- Indirekt, vagy reagenstermelő coulometria* esetén vagy a meghatározandó anyag oldatában (belső reagens termelés) vagy attól térbelileg elkülönítve (külső reagens termelő) alkalmas elektrolitból a megfelelő polaritású elektródon elektromos áram segítségével reagenst állítunk elő, amellyel a meghatározandó anyagot elreagáltatjuk, mintegy megtitráljuk. Ezért ezt a módszert coulometriás titrálásnak is nevezzük.

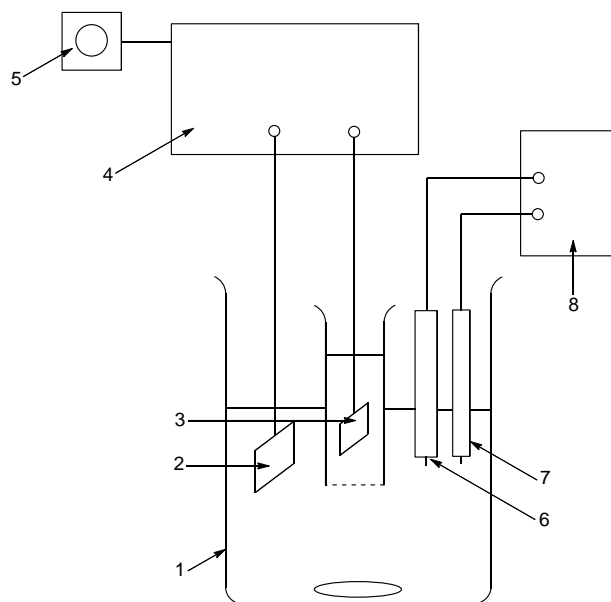
A coulometriás titrálások előnye, hogy olyan reagensek felhasználását is lehetővé teszi, amelyek illékonyaságuk (pl. elemi klór) vagy nagy reakciókészségük (pl. Ag^{2+} , ClO^-) miatt mérőoldatként nem, vagy csak nehezen tárolhatók. A titrálások elvégezhetőek homogén közegben, folyamatos reagens-adagolással, vagy elválasztott cellában generálva a reagenst, és utána adva a mintaoldathoz.

A coulometriás méréseket kétféle módon valósíthatjuk meg: vagy *állandó áramerősséget*, vagy *állandó potenciálértéket* alkalmazva végezhetjük az elektrolízist. Az állandó áramerősség mellett végzett elektrolízis során az elektrolizált komponens koncentrációjának csökkenésével a munkaelektrod potenciálja a *Nernst-egyenlet*

értelmében állandóan változik. Ezért úgy kell megválasztani a kísérleti feltételeket, hogy ne legyen zavaró hatásuk.

Az állandó áramerősség mellett végzett coulometriás titrálások során, elektrokémiai úton olyan reagenst termelünk, mellyel a meghatározandó komponenst titráljuk. A titrálás végpontjának jelzésére független módszert alkalmazunk. Használhatunk vizuális indikálást, fotometriás mérést, vagy elektrokémiai eljárást (pl. amperometriát). Az állandó áramerősség mellett működő coulometriás titrálóberendezés vázlatát a **III-8. ábra** mutatja be.

III-8. ábra: Coulometriás titrálóberendezés egyszerűsített vázlata



1: elektrolizáló cella; 2: munkaelektrod; 3: segédelektrod;
4: amperosztát; 5: stopperóra; 6 és 7: biamperometriás elektródpar;
8: végpontjelző műszer

A „generátor” áramkör elektródjain ((2) és (3)) áthaladó elektromos töltés áthaladási idejét mérjük (5) és ebből tudjuk a Q -t kiszámítani. Ha a titrálás végpontját elektrokémiai végpontjelzéssel határozzuk meg, a reagensgeneráló elektródparon kívül egy második elektródparát is az oldatba merítünk ((6) és (7)), ami az ún. indikátor áramkör.

Az állandó (ellenőrzött) potenciálon végzett mérések során az áramerősség fokozatosan csökken. Így a Q -töltésmennyiség az alábbi képlet alapján határozható meg:

$$Q = \int_0^{\infty} i_t \cdot dt$$

ahol

Q = az elektrolizáló cellán átfolyt töltésmennyiség

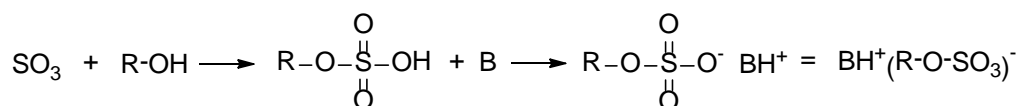
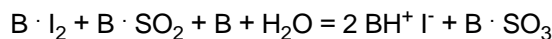
i_t = az elektrolizáló áram erőssége az elektrolízis időpontjában

Az ellenőrzött potenciálon végzett coulometriás mérések nagy előnye, hogy a végpont meghatározásához nem kell külön indikátorrendszert alkalmazni, az elektrolízis előrehaladtával az áramerősség fokozatosan csökken, és így annak maradékáramra való csökkenése jelzi a reakció végét.

Víz meghatározás coulometriás titrálással

A Gyógyszerkönyv a víztartalom meghatározására coulometriás módszert is előír, melynek legfontosabb ismérvei a következők:

A víz coulometriás titrálása azon a reakción alapul, amely víz, kén-dioxid és jód között vízmentes közegben, kellő pufferkapacitással rendelkező bázis jelenlétében kvantitatíve végbemegy.



A jód elektrokémiai úton, a reakciócellába bevitt jodid oxidációjával a meghatározás során képződik. Az anódon keletkezett jód azonnal reagál a vízzel és a kén-dioxiddal. Az anyagban lévő vízmennyiség egyenesen arányos a titrálás végpontjáig áthaladó elektromos töltés mennyiségével. A végpontot akkor érjük el, amikor a cellában lévő teljes vízmennyiség reakcióba lépett, és ezért jódfelesleg keletkezik. 1 mól jód 1 mól vízzel egyenértékű; 10,71 C elektromos töltés pedig 1 mg víznek felel meg.

A rendszer előzetes elektrolízissel vízmentesítjük. Az egyes meghatározásokat egymás után ugyanazon reagensoldattal a következő feltételek teljesülése esetén végezhetjük:

- a reakcióelegyben lévő alkotórészek között nincs összeférhetlenség,
- mellékreakciók nem jönne létre,
- az elektrolit-reagens térfogata és vízkapacitása megfelelő.

A coulometriás titrálások kis mennyiségű víz mérésére korlátozódnak; a meghatározáshoz javasolt vízmennyiség tartomány: 10 µg-10mg.

A módszer pontosságát elsősorban az befolyásolja, hogy milyen mértékben tudjuk megóvni a rendszert a légköri nedvességtől. A rendszer alkalmasságát az alapvonal-eltolódás követésével kell ellenőrizni.

Készülék: A készülék reakciócellából, elektródokból és mágneses keverőből áll (**III-8. ábra**). A reakciócellát egy nagyobb anódtér és egy kisebb katódtér alkotja. A két teret, az elektród felépítésétől függően, diafragma választja el. Mindkét tér platinaelektródot tartalmaz. A folyékony halmazállapotú vagy a feloldott mintát fecskendő segítségével szeptumon át juttatjuk a cellába. Szilárd halmazállapotú minta bevitelét általában ajánlatos elkerülni. Ha a mintabevitelnek mégis ezt a módját alkalmazzuk, a mintát jól zárható bemeneti nyíláson át juttatjuk a cellába. Megfelelő óvintézkedésekkel kell megakadályozni a légnedvesség bejutását a rendszerbe, pl. manipulátorban, száraz inert gázatmoszférában dolgozva. Az analitikai eljárást alkalmas műszer szabályozza, amely egyben az eredményeket is kijelzi.

Vizsgálat: A reakciócella elektródtereit a gyártó használati utasításai szerint megtöltjük a víz mikromeghatározására szánt elektrolit-reagenssel, és stabil végpontig titráljuk. A vizsgálandó anyag előírt mennyiségét a cellába juttatjuk. Ha nincs más előírás, 30 másodpercen át keverjük, ezután ismét stabil végpontig titrálunk. A mérőműszeren leolvasott értékekből kiszámítjuk a mintában található víz mennyiségét,

illetve a %-os víztartalmat. Amennyiben a minta típusa és a mintaelőkészítés indokolja, üres kísérletet is végzünk.

A torzításmertesség ellenőrzése: Két egymást követő meghatározás között pontosan mért, a minta víztartalmával nagyságrendileg azonos mennyiségű vizet juttatunk a készülékbe, akár *R víz*, akár *R víz* mikromeghatározására szánt víz-referenciaoldat formájában. Ezután elvégezzük a coulometriás titrálást. A visszanyerés 1000 µg H₂O hozzáadása esetén 97,5-102,5%, 100 µg H₂O hozzáadásakor pedig 90,0-110% legyen.

III.8 A pH potenciometriás meghatározása

A pH vizes oldatok hidrogénion-koncentrációjának (oxóniumion-koncentrációjának) jellemzésére bevezetett mérőszám. Mivel vizes oldatokban a hidrogénion és hidroxidion koncentrációk alacsonyak, *S. P. L. Sorensen* javaslatára számszerű jellemzésükre a koncentrációk tízes alapú negatív logaritmus értékeiket használjuk. Ennek megfelelően:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+], \text{ illetve}$$

$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+].$$

Hasonlóképpen:

$$\text{pOH} = -\log [\text{OH}^-]$$

Tiszta vízben $\text{pH} = \text{pOH} = 7$. A pH 7 alatti értékek (pH 0-7) savas, míg a pH 7 feletti értékek (pH 7-14) lúgos kémhatású oldatok jellemzői.

A laboratóriumi munka során gyakran előforduló feladat vizes oldatok pontos hidrogénion-koncentrációjának (pH-jának) meghatározása. Vizes oldatok hidrogénion-koncentrációjának meghatározását az elektródpotenciálok koncentrációfüggése (lásd *Nernst-Peters egyenlet*) alapján ún. *direkt potenciometriás módszerrel* is elvégezhetjük.

A *potenciometria* az elektrolitoldatba merülő elektród felületén kialakuló elektródpotenciál mérésén alapuló elektroanalitikai módszer. A potenciometriának két módszere ismeretes: a.) *direkt potenciometria*, amikor a kérdéses ion potenciálját mérjük, és abból számítjuk ki a keresett alkotórész koncentrációját, valamint b.) a *potenciometriás titrálás*, amelynél viszont a potenciál változását mérjük a titrálás végpontjának meghatározása érdekében.

Az elektródpotenciál mérése elvben minden olyan esetben lehetővé teszi a mennyiségi meghatározást, amikor a mérendő ionra nézve reverzibilisen működő indikátorelektrod rendelkezik. Korábban direkt potenciometria segítségével elsősorban pH-meghatározást végeztek, ma már számos egyéb ionfajta (pl. kloridion, bromidion, nátriumion, káliumion, stb.) mérése is lehetséges ezzel a módszerrel.

A pH direkt potenciometriás meghatározása az ismeretlen hidrogénion-koncentrációjú oldatból készített hidrogénelektrod potenciáljának mérése útján lehetséges. A hidrogénelektrod elektródpotenciálja (*E*) és az oldat hidrogénion-koncentrációja (aktivitása) közötti összefüggést a *Nernst-Peters egyenlet* írja le:

$$E = E^0 + \frac{R \cdot T}{2 F} \ln \frac{[H^+]^2}{p_{H_2}}$$

ahol

E = a hidrogénelektrod aktuális elektrodpotenciálja

E^0 = a standard hidrogénelektrod elektrodpotenciálja (Amennyiben $p_{H_2} = 101,325$ kPa, akkor megegyezés szerint bármely hőmérsékleten $E^0 = 0$.)

R = az egyetemes gázállandó

T = a termodinamikai hőmérséklet

p_{H_2} = a hidrogéngáz parciális nyomása

A fentiek alapján ($p_{H_2} = 101,3$ kPa parciális nyomás esetén):

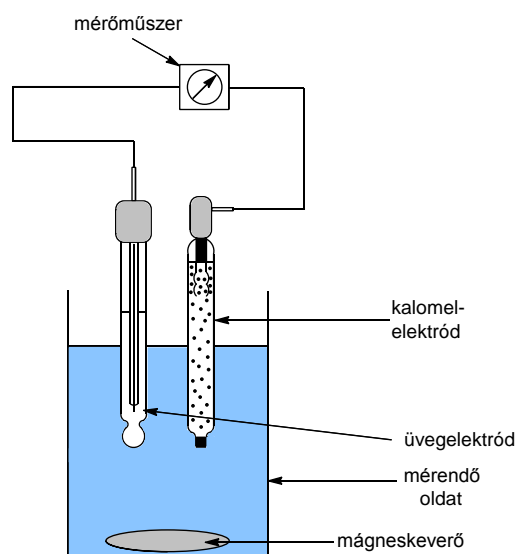
$$E = \frac{R \cdot T}{F} \ln [H^+] = 0,059 \cdot \log [H^+]$$

illetve

$$E = -0,059 \cdot \text{pH}$$

Mivel egyetlen elektrod potenciálját nem lehet megmérni, az ismeretlen hidrogénion-koncentrációjú oldatból készített hidrogénelektrodot egy másik, ún. összehasonlító (referencia) elektróddal galvánelemmé kapcsoljuk össze, és annak EME értékéből kiszámoljuk az ismeretlen hidrogénion-koncentrációt. Összehasonlító elektródként állandó elektrodpotenciállal bíró, ún. másodfajú (fém/csapadék) elektródokat, pl. kalomel elektródot ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$), vagy Ag/AgCl -elektrodot használunk.

Mivel a hidrogénelektrod használata a mindennapi laboratóriumi gyakorlatban számtalan nehézséggel jár, ma már mérőelektrodként kizárólag, ún. *hidrogénion-szelektív elektródot* (rendszerint üvegelektrodot) használunk. Az üvegelektrodok működésének alapja, hogy ha üvegből vékonyfalú membránt készítünk és azt hidrogénionokat tartalmazó oldatba merítjük; az üvegmembrán két fala között fellépő potenciál az oldat hidrogénion-koncentrációját határozza meg. Következésképpen, ha egy ismeretlen hidrogénion-koncentrációjú oldatba üvegelektrodot merítünk és azt egy referenciaelektroddal (pl. ezüst - ezüst-klorid csapadékelektroddal) galvánelemmé kapcsoljuk össze, akkor az így összeállított galvánelem *elektromotoros erő* értékét az oldat hidrogénion-koncentrációja határozza meg (**III-9. ábra**).

III-9. ábra: Potenciometriás pH-mérőberendezés egyszerűsített vázlata

A mérőműszer olyan feszültségmérő, melynek bemenő ellenállása legalább ezerszer nagyobb, mint az elektrodoké. A készülékeken általában pH-skála található, és érzékenyséjük legalább 0,05 pH-egység, vagy 0,003 V megkülönböztetését teszi lehetővé.

A Gyógyszerkönyv által előírt vizsgálatok során - ha az adott cikkelyben más előírás nincs - akkor minden mérést ugyanazon a hőmérsékleten (20 °C – 25 °C) kell végezni. Ha hőmérsékleti korrekció szükséges, a készülék kezelési utasítását kell követni. A készüléket a mérés elvégzése előtt kalibrálni kell. A készülék kalibrálásához elsőként kálium-hidrogén-ftalát összehasonlító tompítóoldatot, majd egy ettől eltérő pH-jú tompítóoldatot használunk. Egy közbülső pH-értékű, harmadik tompítóoldatnak a műszer skálájáról leolvasott pH-ja legfeljebb 0,05 pH-egységgel térhet el a tompítóoldat deklarált pH-értékétől. Az elektrodokat ezután a vizsgálandó oldatba merítjük, majd a kalibrálással azonos körülmények között leolvassuk a pH-t. A pH-t legalább 3 percig mérjük és közben folyamatosan kevertetjük az oldatot. (A modern pH-mérők a mérés idejét a pH-változás idő szerinti változásának nagysága függvényében automatikusan szabályozza.)

Minden vizsgálandó oldatot és összehasonlító tompítóoldatot *R-szén-dioxid-mentes vízzel* kell készíteni. A Gyógyszerkönyvben szereplő néhány összehasonlító tompítóoldat pH értékét és a pH-értékek hőmérséklet-függését a **III-5. táblázat** mutatja be.

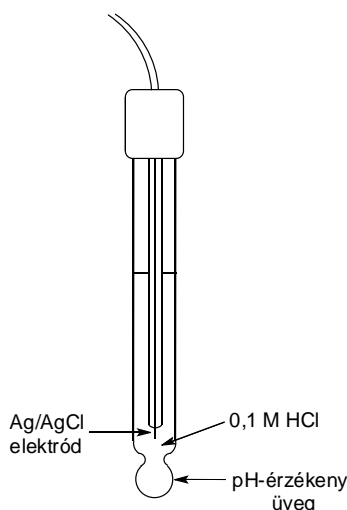
III-5 táblázat: Összehasonlító tompítóoldatok (Ph. Hg. VIII.)

| Puffer | pH (20 °C) | pH (25 °C) |
|---|------------|------------|
| 0,05 M kálium-teraoxalát-oldat | 1,68 | 1,68 |
| 0,05 M kálium-dihidrogén-citrát-oldat | 3,79 | 3,78 |
| 0,05 M kálium-hidrogén-ftalát-oldat | 4,00 | 4,01 |
| 0,05 M kálium-hidrogén-foszfát + 0,025 M dinátrium-hidrogén-foszfát-oldat | 6,88 | 6,87 |
| 0,087 M kálium-dihidrogén-foszfát + 0,0303 M dinátrium-hidrogén-foszfát-oldat | 7,43 | 7,41 |
| 0,01 M dinátrium-tetraborát-oldat | 9,23 | 9,18 |

Feladat. Ismeretlen hidrogénion-koncentrációjú oldat pH-jának potenciometriás meghatározása

A méréseket, ún. *kombinált üvegelektrod* alkalmazásával végezzük. A kombinált üvegelektrod (**III-10. ábra**) két, koncentrikusan egymásba helyezett és “alul” a mérendő folyadékba érő részénél összeömlesztett üvegcső. A belső csőre forrasztják a pH-érzékeny – gömb alakú – membránt. Ez a mérőelektrod. A külső cső falába forrasztják a kerámia szűrőt és ebbe nyúlik a tű alakú ezüst/ezüst-klorid összehasonlító (referencia) elektrod is.

III-10. ábra: Kombinált üvegelektrod



Kalibrálás. A készüléket az ON/OFF gomb megnyomásával bekapcsoljuk. Kivesszük az elektrodát a kálium-klorid-oldatból és desztillált vízzel alaposan leöblítjük, majd papírvatta segítségével szárazra töröljük. A CAL gomb segítségével kiválasztjuk a kalibráló oldatnak megfelelő pH-t. (pH = 4,00; 7,00 és 9,21 értékű hitelesített kalibráló oldataink vannak, ezek közül legalább két pH-értékre kalibráljuk a készüléket: 7,00 pH értékre minden esetben, ezen kívül 4,01-es pH értékre, ha savas pH-jú oldatot kívánunk készíteni, ill. 9,01-es pH értékre, ha lúgos pH-jú oldatot készítünk.) A száraz elektrodát a kalibráló oldatba helyezzük, majd a CAL gomb újabb megnyomásával elindítjuk a kalibrációt, és megvárjuk, míg a kalibrálást a készülék elvégzi. Ezt egy csipogó hang jelzi. Az elektrodát kivesszük a kalibráló oldatból és desztillált vízzel alaposan leöblítjük, majd papírvatta segítségével szárazra töröljük. A CAL gomb segítségével kiválasztjuk a következő kalibráló oldatnak megfelelő pH-t. A száraz elektrodát a kalibráló oldatba helyezzük, majd a CAL gomb megnyomásával elindítjuk a kalibrációt és megvárjuk, míg a kalibrálást a készülék elvégzi. Az elektrodát desztillált vízzel alaposan leöblítjük, papírvattával szárazra töröljük, mérésig az elektrodát desztillált vízbe helyezzük.

pH-mérés. Az elektrodát desztillált vízzel leöblítjük, papírvattával szárazra töröljük, és a mérendő oldat várható pH-értékéhez hasonló pH-jú összehasonlító tompítóoldatba (**III-5 táblázat**) oldatba helyezzük. A READ gombbal visszatérünk a kalibrálásból a pH-méréshez. A pH érték végleges, ha a tizedespont villogása megszűnik. A beállítás és a műszer működése akkor a legmegfelelőbb, ha a műszer ennek az összehasonlító tompítóoldatnak a mérés hőmérsékletére vonatkozó elméleti pH-értékével azonosat

mutat. Ha a mért és a jelzett érték közötti különbség nagyobb 0,1 pH egységnél, úgy a műszer használati utasításában leírtak szerint a mutatott pH-értéket az összehasonlító tompítóoldat pH-értékére állítjuk.

A műszernek az előbbieken leírt beállítását legalább egyszer megismételjük. Amennyiben a megismételt mérés során a műszer az összehasonlító tompítóoldat elméleti pH-értékével 0,1 pH-egységen belül megegyező pH-értéket mutat, úgy a fentiek szerint elvégezzük a meghatározandó oldat pH-jának mérését.

Mérés után az elektródát desztillált vízzel alaposan leöblítjük, és a következő mérésig 3 M KCl oldatban tároljuk. A készüléket az ON/OFF gomb megnyomásával kikapcsoljuk.

Feladat. *Natrii hydroxidum* (Ph. Hg. VIII.) azonossági vizsgálatának és tartalmi meghatározásának elvégzése

A nátrium-hidroxid készítmény – levegőn állva a levegő szén-dioxid tartalmával nátrium-karbonátot képez. Ezért a közönséges körülmények között tárolt nátrium-hidroxid mindig tartalmaz nátrium-karbonát szennyezést.



A Gyógyszerkönyv azonossági vizsgálatként a vizsgálandó készítményből készült oldat potenciometriás pH-meghatározását (A) valamint nátriumion tartalmának azonosítását (B) írja elő.

A potenciometriás pH-meghatározás céljából 0,1 g vizsgálandó anyagot 10 ml R vízben oldunk, majd az oldat 1 ml-ét R vízzel 100 ml-re hígítjuk. Az oldat pH-ja legalább 11,0 kell, hogy legyen.

A Gyógyszerkönyv szerint elkészített oldat nátrium-hidroxidra nézve $2,5 \cdot 10^{-3}$ M koncentrációjú. Így „elméleti” kémhatása pH 11,4. A nátrium-hidroxid készítmény nátrium-karbonát tartalma csökkenti az oldat lúgosságát. Így a pH-mérés határértéke (pH 11,0) a nátrium-karbonát szennyezés mennyiségét maximálja.

Tartalmi meghatározás

A vizsgálandó anyag 2,000 g-ját kb. 80 ml *R szén-dioxid-mentes vízben* oldjuk. Az oldatot, 0,3 ml *R fenolftalein-oldatot* alkalmazva indikátorként, 1 M sósav-mérőoldattal titráljuk. A megtitrált oldathoz 0,3 ml *R metilnarancs-oldatot* adva 1 M sósav-mérőoldattal folytatjuk a titrálást.

A titrálás második részében fogyott 1 M sósav-mérőoldat 1 ml-ével 0,1060 g Na_2CO_3 egyenértékű.

A teljes titrálásban fogyott 1 M sósav-mérőoldat 1 ml-ével 40,00 mg NaOH-ban kifejezett összes lúg egyenértéke.

A Gyógyszerkönyv előírása szerint a nátrium-hidroxid NaOH-ban kifejezett összes lúgtartalma 97,0-100,5 %.

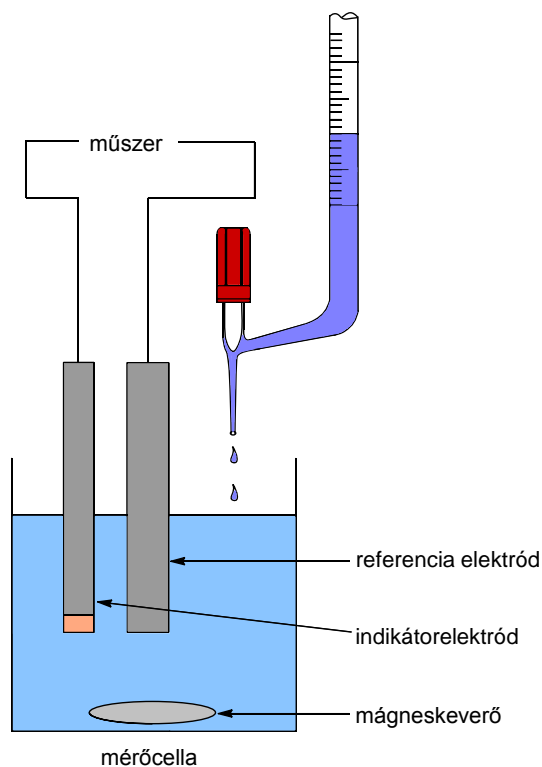
Egyenletek írásával értelmezze a titrálás kémiai alapjait!

Számításokkal igazolja a Gyógyszerkönyv Na_2CO_3 valamint NaOH tartalomra megadott számszerű értékeit!

III.9 Potenciometriás titrálás

A potenciometriás titrálás olyan térfogatós analitikai módszer, amelyben a titrálási reakcióban résztvevő ion(ok)nak vagy az adott rendszerben elektromosan semleges részecskének az adagolt mérőoldat hatására bekövetkező aktivitásváltozását az ion(ok)ra reverzibilis elektród potenciáljának a változása révén követjük. A potenciometriás titrálások során a potenciál mérése ugyanúgy történik, mint a direkt potenciometria esetén. A vizsgálandó oldatba belehelyezzük az indikátor- valamint a referencia elektródot, és erős kevertetés mellett titrálunk, miközben az egyes reagensrészletek hozzáadását követően megmérjük a potenciál értékét (**III-11. ábra**). Egyensúlyi cellafeszültségnek fogadjuk el a mérhető feszültséget, ha az időben nem változik, illetve az egyirányú változás sebessége 2 percenként legfeljebb 3 mV (azaz 0,005 pH vagy egyéb ion esetén pX egység).

III-11. ábra: Potenciometriás titrálóberendezés egyszerűsített vázlata



A potenciometriás titrálásokhoz olyan *indikátorelektrod*ot használunk, amely az elektródfolyamatban résztvevő anyag(ok) aktivitásával arányos potenciáljelet ad. A *összehasonlító elektród* a mintaoldat aktivitásától független, állandó potenciáljelet ad. A potenciometriás mérőcella a vizsgálandó oldatot, az indikátor- és összehasonlító elektródot tartalmazza. A cellafeszültség (elektromotoros erő) meghatározására a bevezetőben jellemzett feszültségmérőket használunk.

A potenciometriás titrálási görbék megszerkesztését a hagyományos titrálási görbékhez hasonlóan végezzük: a potenciál-mérőoldat térfogat értékpárok ábrázolásával nyerjük a titrálási görbét. A mérőműszer előzetes kalibrálását követően a mért potenciálértékekhez ionkoncentrációk (vagy azok tízes alapú negatív logaritmus értékei) rendelhetők.

A Gyógyszerkönyvben szereplő potenciometriás titrálások végpontjelzésére használatos elektródok a következők:

Neutralizációs mérések végpontjelzésére bármilyen hidrogénion-funkcióval rendelkező elektród alkalmas. A mérések során leggyakrabban *kombinált üvegelektrod*ot használunk.

Csapadékos titrálások végpontjelzése a csapadékot képező valamelyik ionra szelektív indikátorelektrod használatával történik. Például, a halogénionok ezüst-nitrát-mérőoldattal történő meghatározásánál *ezüstion-szelektív elektród*ot (ezüstelektrod)ot, higanycsapadékok képződésekor *higanyelektrod*ot stb. használhatunk.

Komplex képződési reakciók során indikátorelektrodként a meghatározandó fémionra nézve megfordítható (reverzibilis) elektródot – pl. elsőfajú elektródot, *fémion-szelektív membránelektrod*ot, illetve *redoxelektrod*ot használhatunk.

A *redoxititrálás*ok jellegzetes tulajdonsága, hogy a mólszámváltozás nélkül lejátszódó redoxreakciók lejátszódása esetén a titrálási görbe alakja független a meghatározandó anyag koncentrációjától, mert a potenciált az [Ox]/[Red] koncentráció-arány (aktivitás-arány) és nem az ionok abszolút koncentrációja határozza meg. Mólszámváltozással járó reakciók esetén (például $I_2 + 2 e^- \rightleftharpoons 2 I^-$) az oxidált [Ox] és redukált [Red] formák koncentrációi a megfelelő hatványokon szerepelnek, ezért a potenciál az anyagok abszolút koncentrációjától függ.

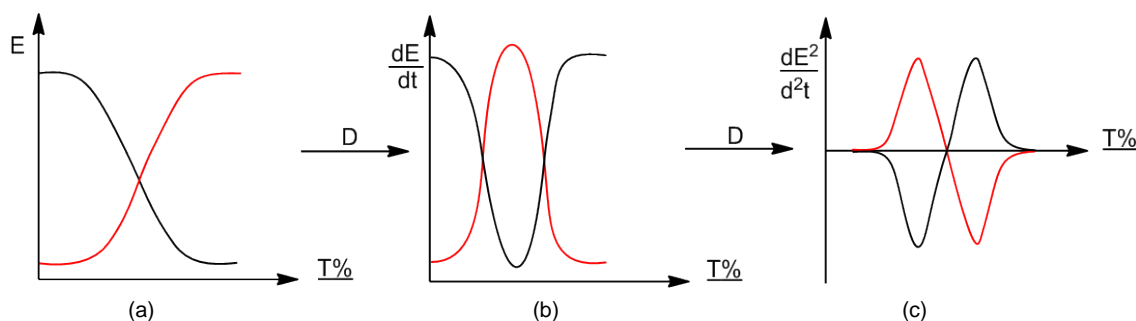
Az elektródok által mért ionkoncentrációk és az elektródok potenciálja közötti összefüggéseket a **III-6. táblázat** foglalja össze.

III-6 táblázat: Az elektródok által mért ionkoncentrációk és az elektródok potenciálja közötti összefüggések

| Módszer | Mért paraméter | Összefüggés |
|--------------------|----------------|---|
| Acidi-alkalimetria | pH | $E = E^0 - 0,059 \cdot \text{pH}$ |
| Argentometria | pAg v. pX | $E = E^0 + 0,059 \cdot \text{pAg}$ $E = E^0 - 0,059 \cdot \text{pX}$ |
| Kelatometria | pM | $E = E^0 + \frac{0,059}{n} \cdot \lg[M^{n+}]$ |
| Redoximetria | E | $E = E^0 + \frac{0,059}{n} \cdot \lg \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]}$ |

A titrálások végpontjainak meghatározása a szigmoid alakú titrálási görbék *inflexiós pontjának* meghatározása alapján történik. Kedvező esetben, ha a titrálási görbe szimmetrikus – az inflexiós pont egybeesik az egyenértékponttal.

A titrálási görbe (potenciál-mérőoldat térfogat összefüggés/függvény) ismeretében az inflexiós pont helyét a *függvényanalízis módszerével* meghatározhatjuk. Ehhez a függvény első és második differenciálhányados meghatározása szükséges. A görbe inflexiós pontjaiban ugyanis az első differenciálhányadosnak szélsőértéke van, míg a második differenciálhányados értéke zérus (**III-12. ábra**).

III-12. ábra: Titrálási görbék és differenciál görbék

A titrálás végpontjának az első, illetve a második differenciálhányados maximum-, illetve zérushelyének meghatározásán alapuló módszer csak akkor ad helyes eredményt, ha a titrálási görbe szimmetrikus (amikor a meghatározandó anyag és a mérőoldat megegyező együtthatókkal szerepel a mérés alapjául szolgáló egyenletben), továbbá ha a potenciált meghatározó folyamat reverzibilis.

A titrálási görbe megszerkesztéséhez és a végpont meghatározásához a közelítő, ún. *differenciahányados-módszert* is alkalmazhatjuk. Ekkor a végpont környezetében a 0,1 ml-es mérőoldat-részletek adagolására bekövetkező cellafeszültség-változásokat, vagyis a mért cellafeszültség-értékek különbségeit ábrázoljuk a mérőoldat mennyiségének függvényében. Az így kapott görbe maximuma az inflexiós pont.

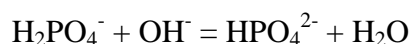
A vizes oldatokban lejátszódó reakciók analitikai alkalmazásai mellett a Gyógyszerkönyv előírásai között egyre nagyobb szerepet kapnak a nemvizes közegben végrehajtott mennyiségi mérések.

A nemvizes közegben végrehajtható meghatározások többsége sav-bázis reakción alapul. A mérések egy része a vizes oldatokban használt indikátorokkal is végrehajtható, de sokkal általánosabban alkalmazhatók a műszeres módszerek, főleg a potenciometria.

Nemvizes közegben lényegében ugyanazokat az indikátorelektrodokat használjuk, mint vizes oldatokban, azzal a különbséggel, hogy az elektród előkészítése (kondicionálása) az adott nemvizes oldószerben való áztatással történik. Redoxirendszerekhez ez esetben is platinaelektrodot használunk.

Feladat: *Natrii dihidrogenophosphas dihydricus* (Ph. Hg. VIII.) tartalmi meghatározása fenolftalein indikátor és potenciometriás végpontjelzés alkalmazásával

Az alkálifém primér foszfátok vizes oldatban alkalimetriásan megtitrálhatók. A meghatározás alapja a dihidrogén-foszfát-ion hidroxidionnal lejátszódó reakciója:



Az egyenértékpont pH értéke a foszforsav pK_2 (6,92) és pK_3 (11,74) értéke felhasználásával a

$$\text{pH} = \frac{pK_2 + pK_3}{2}$$

összefüggés alapján kiszámítható (pH = 9,33).

A VII. Magyar Gyógyszerkönyv szerint a titrálás fenolftalein indikátor alkalmazásával végzendő:

Pontosan mért 1,50 g vizsgálandó anyagot frissen kiforralt és lehűtött vízzel 100,00 ml-re oldunk. Az oldat 10,00 ml-ében 2,0 g *nátrium-kloridot* oldunk. Az oldatot 5 csepp *I-fenolftalein-oldat* hozzáadása után *0,1 n nátrium-hidroxid-mérőoldattal* titráljuk.

1,00 *0,1 n nátrium-hidroxid-mérőoldattal* 15,601 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ egyenértékű.

A fenolftalein csak akkor jelzi megfelelően az egyenértékpontot, ha a NaH_2PO_4 hidrolízisét – ami kb. 9,3-as pH-t eredményezne – nátrium-klorid hozzáadásával visszaszorítjuk.

A készítmény tartalmi meghatározására a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv potenciometriás végpontjelzést ír elő:

A vizsgálandó anyag 2,500 g-ját 40 ml *R vízben* oldjuk. Az oldatot potenciometriás végpontjelzést alkalmazva *karbonátmentes 1 M nátrium-hidroxid-mérőoldattal* titráljuk.

1 ml *1 M nátrium-hidroxid-mérőoldattal* 0,120 g NaH_2PO_4 egyenértékű.

Végezzük el a kiadott készítmény tartalmi meghatározását mindkét módszerrel! Hasonlítsuk össze és értelmezzük az eredményeket!

III.10 Az oldat kémhatása, közelítő pH-értéke és néhány indikátor színe közötti összefüggés.

A Gyógyszerkönyv által előírt vizsgálatok során gyakori követelmény a vizsgálandó anyag meghatározott töménységű vizes oldata hidrogénion-koncentrációjának (pH értékének) közelítő jellemzése. Az előírt töménységű oldatok közelítő pH-értékét általában az egyes vizsgálatokban megkívánt savasság vagy lúgosság mértékének megfelelően megválasztott sav-bázis indikátor színe alapján határozzuk meg.

A különböző pH-tartományokat definiáló gyógyszerkönyvi nevezéktant, valamint a különböző tartományok (pl. gyengén lúgos, erősen lúgos, stb.) ellenőrzésére használandó indikátorokat, és az indikátoroknak a vizsgálat megfelelősége esetén látható színét a **III-7. táblázat** foglalja össze.

Ha az alábbi táblázatban nincs más előírás 10 ml vizsgálandó oldatot 0,1 ml indikátoroldattal elegyítünk.

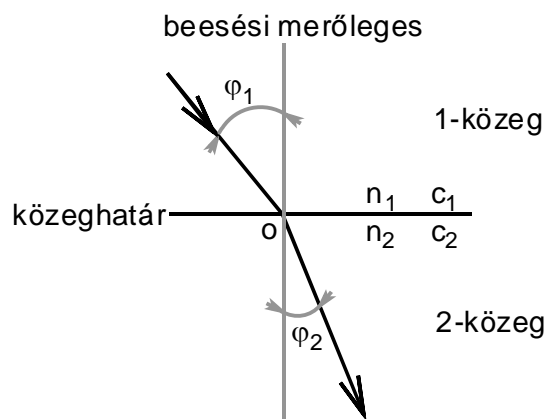
III-7 táblázat:

| Kémhatás | pH | Indikátor | Szín |
|-------------------------|----------|--|---|
| lúgos | >8 | <i>R piros lakmuszpapír</i> <i>R timolkék-oldat</i> (0,05 ml) | kék szürke vagy ibolyáskék |
| gyengén lúgos | 8,0-10,0 | <i>R fenolftalein-oldat</i> (0,05 ml) <i>R timolkék-oldat</i> (0,05 ml) | színtelen vagy rózsaszínű szürke |
| erősen lúgos | >10 | <i>R fenolftaleines papír</i> <i>R timolkék-oldat</i> (0,05 ml) | piros ibolyáskék |
| semleges | 6,0-8,0 | <i>R metilvörös-oldat</i> <i>R fenolvörös-oldat</i> (0,05 ml) | sárga sárga vagy rózsaszínű |
| metilvörösre semleges | 4,5-6,0 | <i>R metilvörös-oldat</i> | narancsvörös |
| fenolftaleinre semleges | <8 | <i>R fenolftalein-oldat</i> (0,05 ml) | színtelen: 0,05 ml 0,1 M lúg hozzáadása után rózsaszínű vagy piros |
| savas | <6 | <i>R metilvörös-oldat</i> <i>R1 brómtimolkék-</i> <i>oldat</i> | narancsvörös vagy piros sárga |
| gyengén savas | 4,0-6,0 | <i>R metilvörös-oldat</i> <i>R-brómkrezolzöld-</i> <i>oldat</i> | narancsvörös zöld vagy kék |
| erősen savas | <4 | <i>R kongóvörös-papír</i> | zöld vagy kék |

III.11 Törésmutató

Ha a fénysugár két optikailag különböző közeg határfelületéhez ér, melyben a terjedési sebessége különböző ($c_1 \neq c_2$), akkor általában a visszaverődésen kívül törés is fellép, azaz a második közegbe bejutó hullám terjedési iránya megváltozik, megtörik (**III-13. ábra**). A *törésmutató* (n) az anyagok fénytörésének a mértéke.

III-13. ábra: A beesési szög és a törési szög összefüggése



A *Snellius-Descartes* törvény kimondja, hogy a fény egy homogén közegből egy másik homogén közegbe átjutva úgy törik meg, hogy a beeső illetve a visszavert fénysugarak beesési merőlegessel bezárt szögeinek szinuszaik úgy aránylanak egymáshoz, mint a törőfelület két oldalán lévő közegek törésmutatói:

$$n_1 \sin \varphi_1 = n_2 \sin \varphi_2$$

ahol:

n_2 : a 2-es közeg abszolút törésmutatója,

n_1 : az 1-es közeg abszolút törésmutatója.

A fénytörés oka az, hogy a két közegben *eltérő a fény terjedési sebessége*. A fénynek vákuumban legnagyobb a terjedési sebessége ($c_0 = 3 \cdot 10^8$ m/s). Ha a fény *légiüres térből egy másik közegbe lép át*, akkor a sebessége (c) csökken, iránya megváltozik. A fény a *törési szöge* (φ_2) - a beesési merőlegeshez mért szög - kisebb, mint a *beesési szöge* (φ_1), azaz a fény a beesési merőlegeshez törik. Az így meghatározható törésmutató a közeg *abszolút – légiüres térrel szembeni - törésmutatója* (n), a következő képlettel adható meg:

$$n = \frac{\sin \varphi_1}{\sin \varphi_2}$$

Mérésekkel és elméleti úton is igazolható, hogy a törésmutató ugyanakkora, mint a két közegben mérhető terjedési sebességek hányadosa. Ha a fény vákuumbeli sebességét c_0 , az adott anyagban mérhető fénysebességet c jelöli, akkor egy anyag *abszolút törésmutatója* az előbbieket alapján:

$$n = \frac{c_0}{c}$$

Ha a fény nem vákuumból lép át a másik közegbe, hanem egyéb közegből (1) valamilyen más közegbe (2), akkor a törésmutató az ún. *relatív törésmutató*, amely a következő képletekkel adható meg:

Két közegre vonatkozó *relatív törésmutató*nak $n_{2,1}$ nevezzük azt a viszonyszámot, amely megadja az 1 közegből 2 közegbe haladó fénysugár beesési szögéhez illetve törési szögéhez tartozó szinuszok hányadosát (*Snellius-Descartes törvény*). A fénysugarak megfordíthatóságának elve alapján a sugár 2 közegből 1 közegbe történő haladása esetén a beesési szög φ_2 , a visszaverődési szög pedig φ_1 lesz. Mivel

$$n_{2,1} = \frac{\sin \varphi_1}{\sin \varphi_2}$$

így

$$n_{1,2} = \frac{\sin \varphi_2}{\sin \varphi_1}$$

A fénysugarak megfordíthatóságának elve alapján igazolható, hogy

$$n_{2,1} = \frac{1}{n_{1,2}}$$

ahol:

$n_{2,1}$ = a 2-es közegnek az 1-es közegre vonatkozó törésmutatója,
 $n_{1,2}$ = az 1-es közegnek a 2-es közegre vonatkozó törésmutatója

Mindezeket felhasználva igazolható, hogy ha a fény az n_1 abszolút törésmutatójú anyagból jut át az n_2 abszolút törésmutatójú anyagba, akkor az $n_{2,1}$ törésmutató megegyezik az abszolút törésmutatók hányadosával:

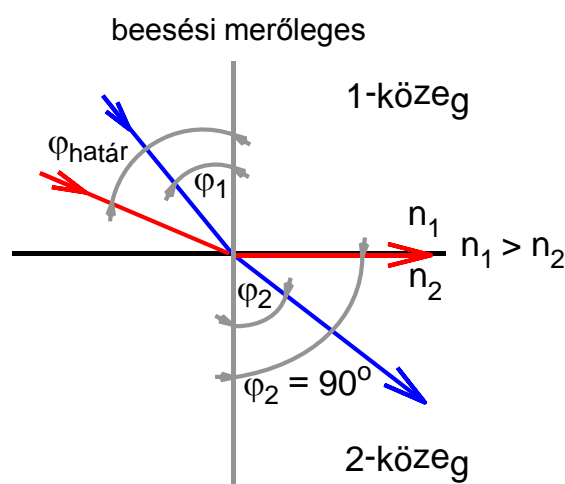
$$n_{2,1} = \frac{n_2}{n_1}$$

ahol:

n_2 = a 2-es közeg abszolút törésmutatója,
 n_1 = az 1-es közeg abszolút törésmutatója.

Két különböző közeg közül az *optikailag ritkább* az, amelyben a fény terjedési sebessége nagyobb, viszont az abszolút törésmutatója kisebb. Ha a fény *egy ritkább közegből optikailag sűrűbb közegbe jut*, akkor a sebessége csökken ($c_2 < c_1$) és a fénysugár a „beesési merőleges felé” törik, azaz $\varphi_2 < \varphi_1$. Így értelemszerűen ha a fény optikailag sűrűbb közegből ritkábbba lép át, akkor a sebessége nő ($c_2 > c_1$) és a „beesési merőlegestől törik”, azaz $\varphi_2 > \varphi_1$. A törésmutató függ a mért közeg *hőmérsékletétől*, *nyomástól*, az *anyag minőségétől* illetve az alkalmazott *fény hullámhosszától* is. A törésmutató hullámhossztól való függését *diszperzió*nak nevezzük. A legtöbb esetben a mért törésmutatót a nátrium emissziós spektrum D_1 vonalának hullámhosszára vonatkoztatják, amely 589,3 nm. A törésmutató jelölésénél ezt is fel kell tüntetni, így ekkor n_D -vel jelölik a vizsgált anyagnak ezt a tulajdonságát.

A törésmutató meghatározása az ún. *törési határszög* mérésén alapszik. A mérés alapja, az a – fenti törvényszerűségek felismeréséhez vezető - megfigyelés, hogy ha a fénysugár *az optikailag sűrűbb közegből az optikailag ritkább közegbe lép át*, akkor a „beesési merőlegestől” törik, azaz a törési szög nagyobb lesz, mint a beesési szög (**III-14. ábra**).

III-14. ábra: A törési határszög

Ebben az esetben, ha a *beesési szöget* (φ_1) addig növeljük, amíg a tört fénysugár iránya a beesési merőlegesre merőleges ($\varphi_2 = 90^\circ$), akkor a fény nem lép be a második közegbe, hanem annak felülete mentén halad tovább. Azt a beesési szöget (φ_1), amelyhez tartozó törésszög (φ_2) 90° *törési határszögnek* (φ_h) nevezzük. A határszög értéke a két közeg törésmutatójából kiszámítható:

$$\sin \varphi_h = n_{2,1}$$

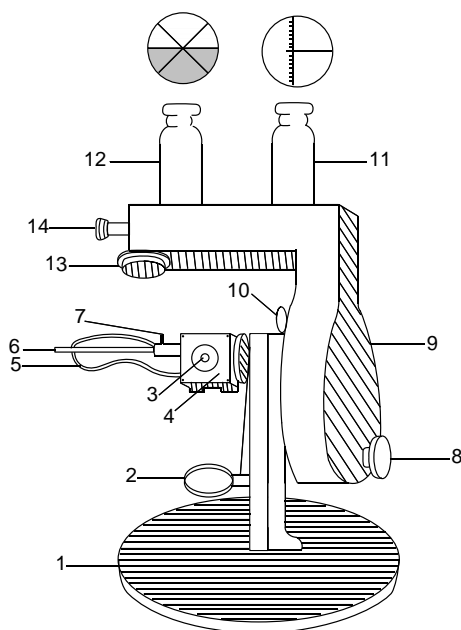
ahol

φ_h = a törési határszög, valamint

$n_{2,1}$ = a (2) közeg (1) közegre vonatkoztatott törésmutatója

Ha a törési határszögnél (j_h) nagyobb beesési szöggel érkezik a fénysugár, akkor törés helyett *teljes visszaverődés* (totális reflexió) jön létre, azaz a beeső hullám a beesési szöggel megegyező visszaverődési szöggel az (1) közegbe tér vissza, nem jut át a két közeg határán. A törési határszöget a szakirodalom a *teljes visszaverődés* (total reflexió) *határszögének is nevezi*. A mérés során az a szög keresendő, ahol még éppen nem történik meg a visszaverődés.

A törésmutató meghatározására a refraktométerek szolgálnak. A refraktométerek a törésmutató meghatározására szolgáló berendezések, melyek a *teljes visszaverődés határszögének* meghatározásán alapulnak. A törésmutató-meghatározás egyik fontos eszköze az *Abbe-féle* refraktométer (**III-15. ábra**). Lényeges alkotórészei az ún. Abbe-féle kettős prizma, egy végtelenre állított T távcső és az ún. kompenzátor.

III-15. ábra: Abbé-féle refraktométer

- 1: műszerállvány; 2: forgatható tükör; 3: mérő- és segédprizma-pár;
 4: prizmatokok; 5: prizmatokokat összekötő gumicső; 6: hőmérőtartó tok;
 7: a temperáló folyadék ki és bevezetésére szolgáló csővégek; 8: tárcsa;
 9: műszertest; 10: skálamegvilágító tükör; 11: leolvasó távcső (skála)
 szemlencsével; 12: beállító távcső (szálkereszt) szemlencsével;
 13: kompenzátor; 14: kompenzátor állító csavarja (nóniusz)

A mérendő folyadék egy cseppjét a refraktométer két nagy törésmutatójú prizma ($n_D=1,750$) közé kell helyezni, melyek közül a felső a mérésre, az alsó a minta megtartására és megvilágítására szolgál. Az alsó prizma a forgatható tükörről (2) monokromatikus fénynyaláb esik, amely a prizma közötti folyadék rétegbe hatol. Az alsó prizma felülete matt, és ha a vizsgálandó folyadék törésmutatója kisebb, mint a prizmaé (ez a mérés feltétele) a felső prizmából a távcsőbe már csak a teljes visszaverődés szögével, vagy annál kisebb szöggel érkező fénysugarak jutnak. Az érzékelő távcsőben a totális reflexiónak a sötét és világos látótér éles határvonala felel meg. A határvonalat a távcső fonalkeresztjére állítva a törésmutató közvetlenül leolvasható.

Homogén fény helyett (összetett) fehér fényt alkalmazva, a törésmutató hullámhossztól való függése miatt a látótér az éles határvonal helyett vékony spektrumsávból áll. A színszórást a készülékbe épített ún. kompenzátorral lehet megszüntetni. A kompenzátor két ún. *Amici-prizma* ből áll, amely a nátrium D-vonalát nem téríti el, a két prizma eredő színszórását viszont a prizma relatív helyzetének megváltoztatásával szabályozni lehet. Méréskor a készüléket úgy kell beállítani, hogy az *Amici-prizma* k színszórása a mérő prizma ből és a köztük lévő folyadék ből álló rendszer színszórásával ellentétesen egyenlő legyen, és a határvonalat élesen lássuk. Ilyen beállításnál a törésmutatót a nátrium D-vonalának megfelelő hullámhossznál mértük, tehát n_D -vel kell jelölni. A kompenzátor állásából pedig a diszperzió határozható meg.

Mivel a törésmutató függ a hőmérséklettől, pontos mérésnél a prizma t állandó hőmérsékleten kell tartani. Használat után a prizma t gondosan meg kell tisztítani (alkoholos vagy benzines vattával megtörölni majd megszáritani).

Feladat: *Glycerolum* (Ph. Hg. VIII.) törésmutatójának meghatározása Abbé-féle refraktométerrel

A törésmutató meghatározására a teljes visszaverődés határszögét mérő Abbé-féle refraktométert használjuk.

A készülék megvilágítására – a színszórást kompenzáló, beépített prizmarendszer révén – természetes fehér fényt is használhatunk. A műszer skáláját, amelyen a törésmutató értékeket le lehet olvasni, a mérés elvégzése előtt a műszerhasználati leírás szerint hitelesíteni kell. A prizmafelület tisztaságát *R* víz törésmutatójának meghatározásával ($n_D^{20} = 1,3330$) ellenőrizzük.

Az *Abbe*-féle refraktométer tartó- és fedőprizmáját alkalmas oldószerrel alaposan tisztítsuk meg! Állítsuk vízszintesre a matt prizmat, néhány csepp folyadékot pipetta segítségével vigyünk rá, majd óvatosan – a folyadék kifolytatása nélkül - zárjuk vissza. Annyi vizsgálandó folyadékot vigyünk a tartóba, hogy az a prizmat éppen elfedje!

A törésmutató leolvasásához a kompenzátort úgy kell beállítani, hogy a látótér sötét és világos része szegély nélkül, éles határvonalon találkozzék, és a határvonal a prizma megfelelő elforgatásával a fonalkeresztre essék. A műszer nóniusszal ellátott skáláján az előírt hőmérsékleten (20 °C) mért és a nátrium D vonalára ($\lambda = 589,3$ nm) vonatkoztatott törésmutató-értéket ($n_D^{20^\circ\text{C}}$) közvetlenül olvashatjuk le.

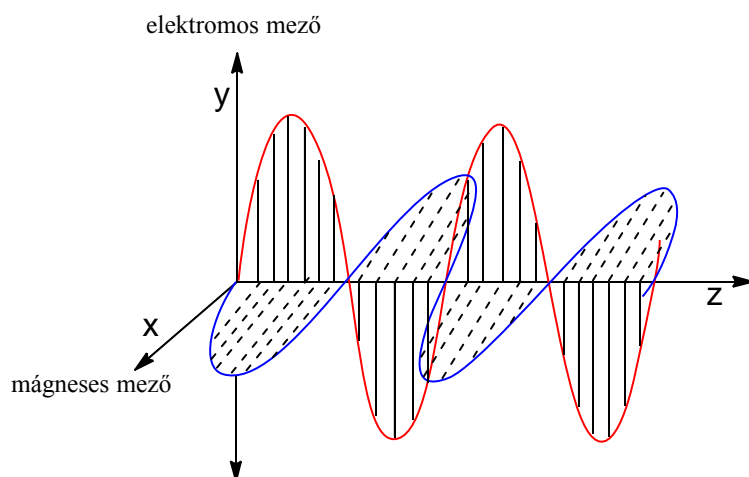
Határozza meg a kiadott oldatsorozat törésmutatóját ötszöri leolvasás átlagából! A Gyógyszerkönyv előírása szerint a vizsgált minta törésmutatója 1,470-1,475 közé kell eszen.

III.12 Optikai forgatóképesség

Az *optikai forgatóképesség* (*optikai rotáció*) a királis anyagoknak az a tulajdonsága, hogy a síkban polarizált fény rezgési síkját elforgatják.

A fény transzverzális elektromágneses sugárzás, melynek elektromos és mágneses térerősség vektora minden pontban és minden pillanatban egymásra és a fény terjedési irányára merőlegesen rezeg (**III-16. ábra**).

III-16. ábra: A fény, mint elektromágneses hullám

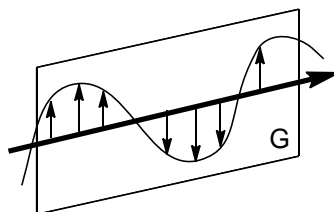


Általános esetben, ha a tér egy adott pontjában az idő függvényeként figyeljük az elektromos (ill. mágneses) térerősség vektorokat, akkor a vektorok *hossza* periodikus változást mutat, azonban *irányuk* rendszertelenül változhat.

Abban a speciális esetben, ha a térerősség vektorok *iránya* is valamilyen szabályos viselkedést mutat, *polarizált fényről* beszélünk. A fény lehet *síkban polarizált*, akkor a térerősség vektorok mindig ugyanabba a síkba mutatnak. A fény *cirkulárisan polarizált*, ha a térerősség vektorok egy kör kerülete mentén forgómozgást végeznek. A fény *elliptikusan polarizált*, ha a vektorok végpontjai egy ellipszist írnak le.

A *lineárisan* (vagy *síkban*) *polarizált fény* térerősség vektorai (elektromos és mágneses) mindig ugyanabban a síkban vannak. A lineárisan polarizált fény terjedési iránya és az elektromos vektornak erre merőleges iránya által meghatározott síkot nevezzük a *polarizáció síkjának* (III-17. ábra).

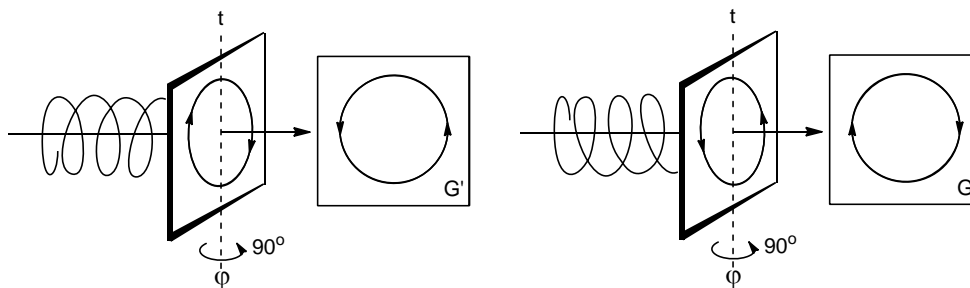
III-17. ábra: Síkban polarizált fény



A vékonyodó vonal iránya, a fény terjedési iránya. σ : a polarizáció síkja.

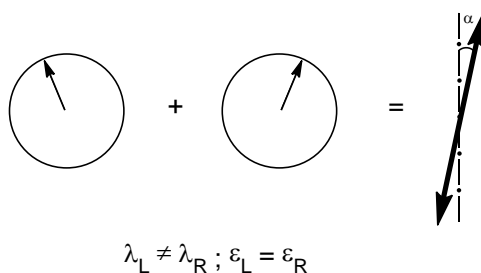
Amikor a lineárisan polarizált fény anyaggal lép kölcsönhatásba, úgy viselkedik, mint két azonos intenzitású, de ellentétes irányba, balra, ill. jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár eredője (III-18. ábra).

III-18. ábra: Cirkulárisan polarizált fény



Az optikailag aktív anyag *törésmutatója* különbözik a kétféle cirkulárisan polarizált fénysugárra, ezért azon keresztülhaladva a két, kezdetben azonos fázisú hullám fázisa – az eltérő sebességük miatt – különbözni fog. Ez a mintán (közege) áthaladt, a két cirkulárisan polarizált fénysugár eredőként előálló, síkban polarizált fény terjedési síkjának megváltozásához (az eredeti síkhoz képest vett a szögű elforduláshoz) vezet (III-19. ábra). Ez a változás – az *optikai forgatóképesség* – függ a fény hullámhosszától. A hullámhossz függvényében mérve az elfordulás szögét kapjuk meg az ORD (*optikai rotációs diszperzió*) spektrumot.

III-19. ábra: Optikai forgatóképesség



Tehát királis vegyületek akirális oldószerrel készült oldatán (vagy folyékony királis vegyületeken) lineárisan (síkban) polarizált fényt bocsátva át, a kilépő fény polarizációs síkja a belépőéhez képest elfordul - ez az *optikai forgatás (rotáció)* - mégpedig enantiomerek esetében úgy, hogy az egyik enantiomer vegyület esetében az óramutató járásával megegyező (+), a másik enantiomer esetében az óramutató járásával ellentétes (-) irányba fordul el a polarizáció síkja.

Azonos körülmények között (azonos oldószer, azonos koncentrációjú oldatok, azonos rétegvastagság, azonos hullámhosszú fény, azonos hőmérséklet) az egyik enantiomer ugyanolyan mértékben forgat óramutató járásával megegyező, mint a másik óramutató járásával ellentétes irányba. A fentiek értelmében az optikai forgatás mértéke függ az anyagi minőségtől, a rétegvastagságtól (küvetta úthossza) és az optikailag aktív anyag oldatának koncentrációjától, valamint a fény hullámhosszától.

Az óramutató járásával megegyező irányú forgatóképességet ("jobbra-forgató") pozitívnak, míg az óramutató járásával ellentétes irányú forgatóképességet ("balra-forgató") negatívnak tekintjük, és (+), illetve (-) jellel jelöljük.

A *fajlagos optikai forgatóképesség* ($[\alpha_m]^\lambda$) az a radiánban (rad) kifejezett elforgatási szög, amelyet t hőmérsékleten, λ hullámhosszon mérünk, és a folyadék vagy az 1 kg/m^3 koncentrációban optikailag aktív anyagot tartalmazó oldat 1 m-es rétegvastagságára vonatkoztatunk. Gyakorlati okokból a fajlagos optikai forgatóképességet ($[\alpha_m]^\lambda$)-t általában milliradián négyzetméter per kilogrammban ($\text{mrad} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$) fejezzük ki.

A Gyógyszerkönyv a következő hagyományos definíciókat használja.

Homogén folyadékok *optikai forgatóképessége* a polarizációs sík fokokban ($^\circ$) kifejezett elforgatási szöge (α) a nátriumszínkép D-vonalának hullámhosszán ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) 1 dm rétegvastagságban és $20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on mérve. Oldatok vizsgálatakor az oldatkészítés módját az egyes cikkelyek írják elő.

Folyadékok *fajlagos optikai forgatóképessége* ($[\alpha]_D^{20}$) a polarizációs sík fokokban ($^\circ$) kifejezett elforgatási szöge (α), amelyet a nátriumszínkép D-vonalának hullámhosszán ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) $20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on mérünk, 1 dm rétegvastagságra vonatkoztatunk és a g/cm^3 -ben kifejezett sűrűséggel osztunk.

Oldott anyagok *fajlagos optikai forgatóképessége* ($[\alpha]_D^{20}$) a polarizációs sík fokokban ($^\circ$) kifejezett elforgatási szöge (α), amelyet az anyag oldatában a nátriumszínkép D-vonalának hullámhosszán ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) $20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on mérünk, és 1 dm rétegvastagságú, 1 g/ml töménységű oldatra számolunk. Oldott anyagok *fajlagos optikai forgatóképességét* mindig az oldószer és a koncentráció megjelölésével együtt kell megadni.

A Gyógyszerkönyvben használt hagyományos rendszerben a *fajlagos optikai forgatóképesség értékét* mértékegysége, a fok milliliter per deciméter gramm $[(^\circ) \cdot \text{ml} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$ nélkül adjuk meg.

Az átszámítási faktor a Nemzetközi Mértékegységrendszerből (SI) a gyógyszerkönyvi rendszerre a következő:

$$[\alpha_m]_\lambda^t = [\alpha]_\lambda^t \cdot 0,1745$$

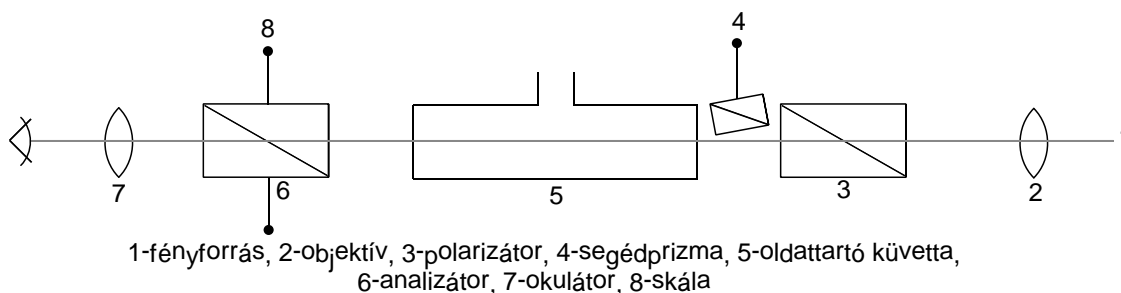
A cikkelyek egyes esetekben az elforgatás szögének mérését 20 °C-tól eltérő hőmérsékleten és más hullámhosszon is előírhatják.

Az optikailag aktív anyagok forgatóképességét polariméterrel határozzuk meg. A polariméter három fő részből áll:

- a síkben polarizált fényt előállító *polarizátorból*;
- az optikailag aktív anyag (vagy annak optikailag inaktív oldószerrel készült oldata) befogadására szolgáló, a két végén üveglemezekkel lezárt, ismert hosszúságú *polarizátorcsőből*;
- az *analizátorból*, amely az elforgatott polarizációsík helyzetének megállapításra szolgál.

A polariméterek elvi felépítését a *Lippich-féle* félárnyékkészülék példáján a **III-20. ábra** mutatja be.

III-20. ábra: *Lippich-féle* félárnyék-polariméter segéd-nikolprizmával



A polarizátorban, a síkban polározott fény előállítására polarizátorként (3) kettősen törő prizmat alkalmaznak. Az erre a célra alkalmas *Nicol*-prizmat kalcit vagy kvarc egykristályból készítik. Ha megfelelően csiszolt prizmat monokromatikus fénnel világítjuk meg, akkor a fénynyaláb két sugárra bomlik fel, melyek közül csak az egyik tud áthatolni a prizmán. Ez a polarizált fény sugar halad át a vizsgálandó anyagot tartalmazó küvettán (5). A polariméterekben analizátorként a polarizátorhoz hasonló prizmat használnak. Az analizátorból kilépő fény intenzitása (I) a polarizátor és az analizátor polarizációs síkjai közötti szög (η) függvénye:

$$I = I_0 \cdot \cos^2 \eta$$

ahol

I = az analizátorból kilépő fény intenzitása

I_0 = az analizátorba belépő fény intenzitása

η = a polarizátor és az analizátor polarizációs síkjai által bezárt szög

Ha a prizmák között nincs optikailag aktív anyag, akkor abban az esetben kapunk maximális intenzitást a látómezőben, amikor a két prizma polarizációs síkjai által bezárt szög 0° vagy 180° . A *Lippich-féle* félárnyék-polariméterben a polarizátor után a látómező egyik felén egy kisebb *Nicol*-prizma vagy, melynek polarizációs síkja d szöget zár be a polarizátoréval. Az analizátort körbe forgatva ezért a látótér egyenletesen (de nem teljesen) sötét. Ez a félárnyék. A készülék nullpontját úgy állítjuk be, hogy küvetta desztillált vízzel megtöltve, beállítjuk a félárnyékot. Ehhez az elforgatáshoz viszonyított további elforgatás lesz az elforgatás szöge abban az esetben, ha optikailag aktív anyaggal töltjük meg a polarizálócsövet.

A Gyógyszerkönyv előírása szerint a polariméter $0,01^\circ$ leolvasására alkalmas legyen. A műszer beosztását rendszerint hitelesített kvarclemezzel kalibrálják. A beosztás linearitása szacharóz-oldatokkal ellenőrizhető.

Feladat. *Acidum tartaricum* (Ph. Hg. VIII.) fajlagos optikai forgatóképességének meghatározása.

Pontosan mért, szárított anyagra számolt 5,00 g anyagot R vízzel 25,0 ml-re oldunk, és a kapott oldat optikai forgatóképességét Lippich-féle félárnyék polariméterrel meghatározzuk.

Vizsgálat. Beállítjuk a polariméter „nulla-pont”-ját és megmérjük a polarizált fény elforgatási szögét a nátriumszínekép D-vonalának hullámhosszán ($\lambda = 589,3$ nm) $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on. A méréseket más hőmérsékleten is lehet végezni, de csak akkor, ha a hőmérsékleti korrekciót a cikkely feltünteti. A készülék „nulla-pont”-jának beállításához zárt csövet használunk; folyadékoknál üres, szilárd anyagok esetében pedig az előírt oldószerrel megtöltött csövet alkalmazunk.

A fajlagos forgatóképességet az alábbiak szerint számoljuk ki:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{100 \cdot \alpha_{\text{D}}^{20}}{l \cdot c}$$

ahol

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = a fajlagos forgatóképesség ($\text{fok} \cdot 10 \cdot \text{dm}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$)

α_{D}^{20} = a $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on és 589,3 nm hullámhosszon fokokban ($^\circ$) mért elforgatási szög

l = a polarimétercső hossza (dm)

c = az oldott anyag tömegkoncentrációja ($\text{g}/100\text{cm}^3$)

A Gyógyszerkönyv előírása szerint a vizsgált minta fajlagos optikai forgatóképessége $+12,0$ és $+12,8$ között kell legyen.

III.13 Abszorpciós spektrofotometria az ultraibolya és látható (UV-Vis) színek tartományban

III.13.1 A spektrofotometria elméleti alapjai

Az analitikai spektroszkópia módszerei a vizsgált mintából származó, kisugárzott, vagy a mintával kölcsönhatásba lépő elektromágneses sugárzást használják fel a minta anyagi minőségének, mennyiségi összetételének, illetve az anyag szerkezetének vizsgálatára.

Az elektromágneses sugárzással kapcsolatos spektroszkópai jelenségek értelmezésénél annak hullám- és részecskesajátságai is szerepet kapnak. A fény elektromágneses sugárzásként történő leírása *James C. Maxwell* nevéhez fűződik: a mágnessé és elektromos mező egymásra és a fény terjedésére merőleges irányban oszcillál (**III-16. ábra**).

Az elektromágneses sugárzás, mint hullám jellemezhető:

1. *hullámhosszal* (λ): a szinusz hullám két egymás utáni, azonos fázisú pontjai közötti távolság;
2. *frekvenciával* (ν): az egy másodpercre eső hullámok száma; illetve
3. *hullámszámmal* (ν^*): az egy méterre eső hullámok számával.

Az egyes tényezők közötti kapcsolatot az alábbi összefüggések adják meg:

$$\nu \cdot \lambda = \frac{c}{n}$$

$$\nu^* = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu \cdot n}{c}$$

ahol

ν = a frekvencia

ν^* = a hullámszám

λ = a hullámhossz

c = a fény sebessége vákuumban ($3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$)

n = a közeg törésmutatója

A fény bizonyos spektroszkópai folyamatokban részecske természetet mutat. Az elektromágneses részecskéi (kvantumai) *a fotonok*. A foton energiája (E) egyenesen arányos a sugárzás frekvenciájával:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda \cdot n}$$

ahol

E = a foton energiája

h = a Plank-féle állandó ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}$)

A spektroszkópai jelenségek egy részében a kibocsátott (emittált), illetve elnyelt (abszorbeált) elektromágneses sugárzás, a foton energiája, a kölcsönhatásban résztvevő atomok, illetve molekulák elektron-energiaállapotának, rezgési, illetve forgási energiaállapotának adott megváltozásával hozható összefüggésbe.

$$E_2 - E_1 = E_{\text{foton}}$$

ahol

E_2 = a magasabb energiaállapot energiája

E_1 = az alacsonyabb energiaállapot energiája

E_{foton} = az elnyelt foton energiája

A spektroszkópiai módszerek feloszthatók az elektromágneses sugárzás hullámhossza szerint (**III-8. táblázat**).

III-8 táblázat: A vizsgált sugárzás alapján megkülönböztetett spektrális eljárások

| Energia (J) | Elnevezés | A kölcsönhatás helye | Spektrális eljárás |
|-------------------------|--------------------------|--|------------------------|
| 10^{-16} - 10^{-18} | gamma-sugarak | atommag | gamma-spektroszkópia |
| 10^{-19} - 10^{-17} | röntgensugarak | atommag, belső elektronhéj | röntgen-spektroszkópia |
| 10^{-18} - 10^{-19} | ultraibolya (UV) sugarak | belső elektronhéj, vegyértékelektronok | UV-spektroszkópia |
| 10^{-19} | látható fény | vegyértékelektronok | VIS-spektroszkópia |
| 10^{-19} - 10^{-21} | infravörös (IR) sugarak | molekulák, kémiai kötések | IR-spektroszkópia |
| 10^{-21} - 10^{-23} | mikrohullámú sugárzás | molekulák, molekularotáció | EPR-spektroszkópia |
| 10^{-25} - 10^{-26} | rádióhullámok | magspin | NMR-spektroszkópia |

A táblázatban felsorolt módszerek közül jelen segédanyagban csak az ún. *optikai spektroszkópiai módszerekkel*, vagyis az ultraibolya (UV), látható (Vis) és infravörös (IR) hullámhossz tartományokat felhasználó módszerekkel foglalkozunk részletesebben. Az optikai spektroszkópiában az elektromágneses sugárzás kifejezés helyett azonos értelemben használjuk a sugárzás és a fény megjelölést is.

Az optikai spektroszkópia fontosabb alapjelenségei a következők:

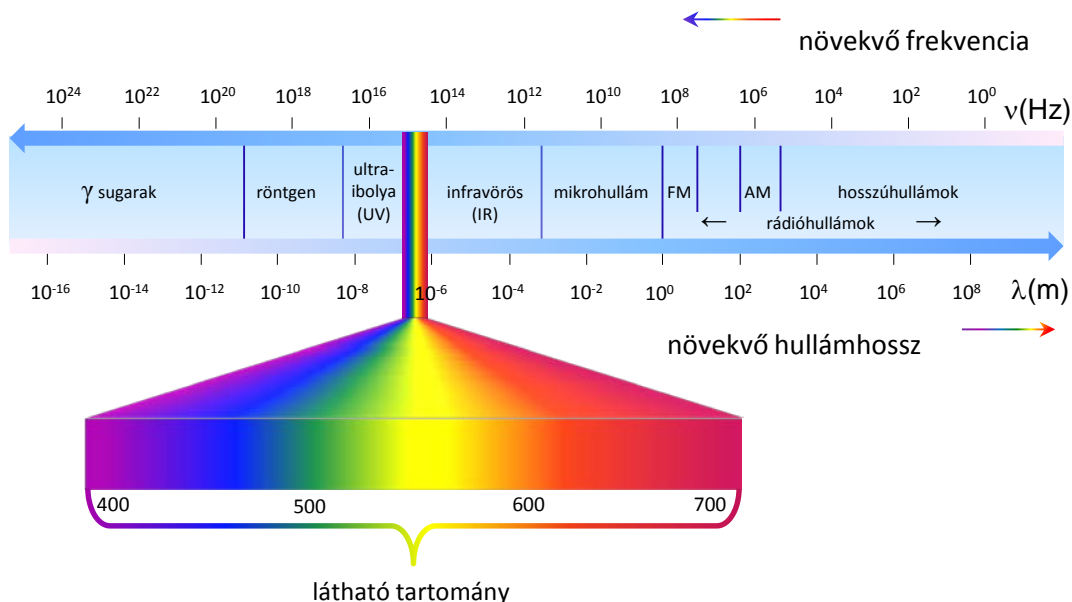
- a.) fényelnyelés (*abszorpció*)
- b.) fényvisszaverődés (*reflexió*)
- c.) *fényszórás*
- d.) *fénytörés*
- e.) *optikai forgatás*
- f.) fénykibocsátás (*emisszió*)

Az elnyelt, illetve a kibocsátott fotonok energiája a vizsgált atom vagy molekula minőségére, szerkezetére vonatkozóan ad információt. Az időegység alatt elnyelt, illetve kibocsátott fotonok száma, az elektromágneses sugárzás intenzitása, illetve intenzitás-változása, a kölcsönhatásban részt vevő atomok vagy molekulák számától, azaz a koncentrációtól függ és így a mennyiségi meghatározás alapja.

III.13.2 Az ultraibolya és látható spektrometria alapjai

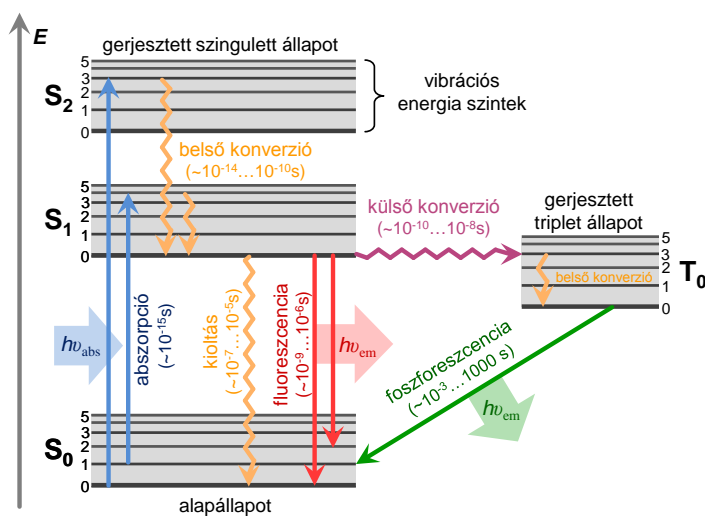
Az elektromágneses spektrum a 10^{-16} m hullámhossztartományba eső gamma-sugárzástól a 10^8 m hullámhossztartományba eső rádióhullámokig terjed (**III-21. ábra**). Az elektromágneses spektrum látható (Vis) tartománya a spektrum 350-780 nm közé eső szakasza.

III-21. ábra: Az elektromágneses spektrum tartományai



Az elektromágneses sugárzás és a molekulák (atomok) kölcsönhatása során a molekula elektronenergiája, illetve a molekula *rezgési* és *forgási* energiaállapota változhat meg. A molekula energiaállapotának alakulását a gerjesztés során és az átmeneteket az ún. Jablonski-diagram foglalja össze.

III-22. ábra: Jablonski diagram



Az energiakülönbség a forgási állapotok között a legkisebb. Ezek az állapotok már a kis energiájú mikrohullámú és távoli infravörös sugárzással is létrehozhatók ($25\text{--}500\text{ cm}^{-1}$; $20\text{ }\mu\text{m} - 400\text{ }\mu\text{m}$), ezért ebben a hullámhossz tartományban észlelhetjük a tisztán *forgási (rotációs) spektrumokat*.

A rezgési átmenetek gerjesztéséhez nagyobb energiájú sugárzás ($500\text{--}10000\text{ cm}^{-1}$; $1 - 20\text{ }\mu\text{m}$) szükséges. Egy adott rezgési állapot gerjesztése általában több forgási állapot gerjesztésével is együtt jár. Így keletkezik a *rezgési-forgási (vibrációs-rotációs) spektrum*.

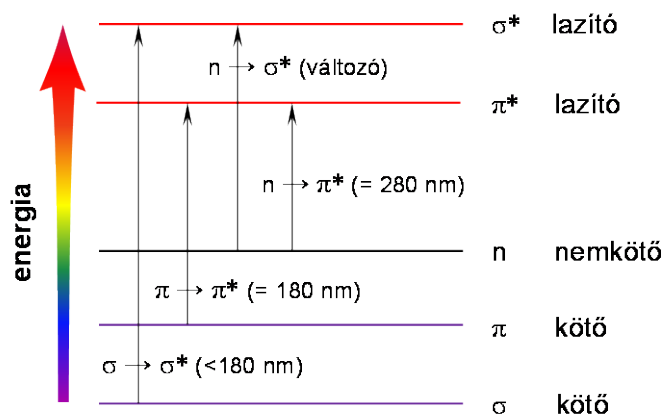
A legnagyobb energia az elektrongerjesztéshez szükséges, ami a *látható és ultraibolya sugárzással* ($12500\text{--}50000\text{ cm}^{-1}$; $200\text{--}800\text{ nm}$) hozható létre. Egy adott elektronátmenethez számos rezgés és forgási állapotváltozás is társul, ezért a molekulák elektronszínképe (pontosabban elektron-rezgési-forgási spektruma) sávos szerkezetű.

Átmenet keletkezhet energia felvétellel (abszorpció) illetve kisugárzással (emisszió). A triplet-szinglet vagy szinglet-triplet átmeneteket összefoglaló néven *inter-system crossing*-nak (ISC) hívjuk. A vibrációs átmenetek az egyes energiaállapotok szubstruktúráján belül következnek be.

Amikor egy foton gerjeszt egy molekulát, egy elektron az állapotot jellemző energiaszintről (E_1) egy magasabb (E_2) energiaszintre kerül. Emisszió bekövetkezésekor a folyamat fordítottja játszódik le: a magasabb energiaszintről az alacsonyabb energiaszintre legerjesztődő elektron a szintek közötti energiakülönbségű fotont bocsát ki. Előfordul, hogy az elnyelt foton energiája nagyobb, mint a kisugárzott fotoné, ilyenkor fluoreszcenciáról beszélünk.

A többatomos molekulák elektrongerjesztési spektrumának keletkezését a molekulapályák közötti átmenetekkel magyarázhatjuk. A **III-23. ábra** a kovalens kötést létrehozó σ és π elektronok, valamint a nemkötő elektronpárok jellemző molekulapályáinak energiaszintjeit és lehetséges átmeneteket mutatja be.

III-23. ábra: Különböző típusú elektrongerjesztések energiaátmenetei






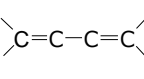
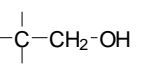



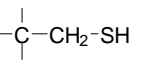




Amint az ábrán látható, legnagyobb gerjesztési energia a $\sigma \rightarrow \sigma^*$ átmenetekhez szükséges, ilyenek a telített szénhidrogénekben fordulnak elő. Ugyanakkor az ezen átmeneteket előidéző sugárzás hullámhossza túl alacsony (távoli UV) ahhoz, hogy ezek az átmenetek megjelenhessenek az UV-Vis abszorpciós spektrumokban. Kiseb gerjesztési energiát igényelnek a $\pi \rightarrow \pi^*$ átmenetek, melyek a telítetlen kettős és hármas kötések tartalmazó, valamint az aromás vegyületek vizsgálata során játszanak szerepet. Gerjesztésük az ultraibolya és a látható spektrumtartományba tartozó

sugárzással történik. Szerkezetkutatás szempontjából a legjelentősebb abszorpciós sáv. Hasonló energiájú sugárzást igényelnek az $n \rightarrow \sigma^*$ átmenetek, melyek a heteroatomot (N, O, S, stb.) tartalmazó telített vegyületekre jellemzőek, melyek gerjesztése során azok magános elektronpárjának egyike gerjesztődhet lazító pályára. A legkisebb energiájú sugárzás a heteroatomot tartalmazó telítetlen vagy aromás vegyületek $n \rightarrow \pi^*$ átmeneteihez szükséges. A telítetlen kötésben résztvevő vagy telítetlen rendszerrel konjugálódó heteroatomot tartalmazó (pl. $>C=O$, $-NO_2$ csoportok) molekulákra jellemző. A sáv intenzitása általában kicsi.

A fenti típusoknak megfelelő, abszorpciót okozó csoportokat, kromoforoknak nevezzük. Azt az energia tartományt, amelynél egy adott kromofor elnyel, elnyelési sávnak nevezzük. A szerves gyógyszervegyületekben leggyakrabban előforduló kromoforokat is jellemző elnyelési sáv értékeiket a **III-9. táblázat** foglalja össze.

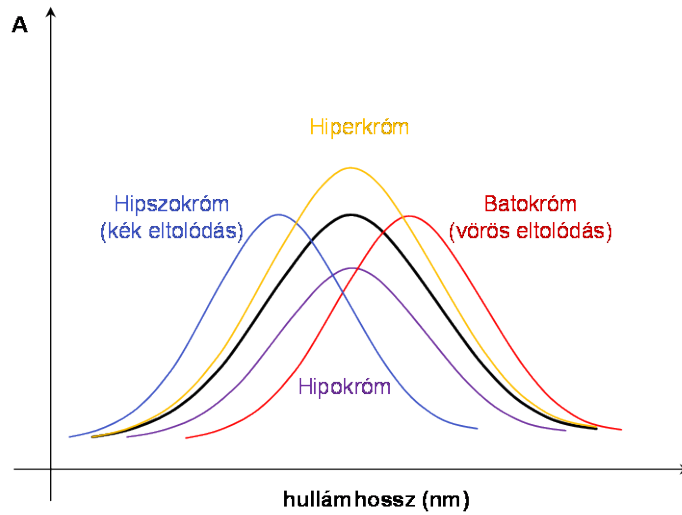
III-9 táblázat: Leggyakrabban előforduló kromoforok és jellemző elnyelési sáv értékeik

| Kromoforok abszorpciója UV tartományban | | | |
|--|--|---|--|
| $n - \pi^*$ átmenetek | $\pi - \pi^*$ átmenetek | $n - \sigma^*$ átmenetek | $\sigma - \sigma^*$ átmenetek |
|  $\lambda_{\max} = 160 \text{ nm}$ |  $\lambda_{\max} = 168 \text{ nm}$ |  $\lambda_{\max} = 177 \text{ nm}$ |  $\lambda_{\max} = 125 \text{ nm}$ |
|  $\lambda_{\max} = 208 \text{ nm}$ |  $\lambda_{\max} = 214 \text{ nm}$ |  $\lambda_{\max} = 184 \text{ nm}$ |  $\lambda_{\max} = 135 \text{ nm}$ |
|  $\lambda_{\max} = 167 \text{ nm}$ |  $\lambda_{\max} = 255 \text{ nm}$ |  $\lambda_{\max} = 227 \text{ nm}$ | |
| | |  $\lambda_{\max} = 173 \text{ nm}$ | |
| | |  $\lambda_{\max} = 204 \text{ nm}$ | |

Az elnyelési sávhoz tartozó elektronátmenet energiáját a kromofor anyagi minősége mellett a vele kölcsönhatásban lévő egyéb csoportok is befolyásolják. Például a kromofor csoport közelében elhelyezkedő nemkötő elektronokban gazdag csoportok (pl.: hidroxilcsoport, aminocsoport) a kromofor fényelnyelését a nagyobb hullámhosszak irányába tolják el (*auxokróm hatás*). Az ilyen eltolódást *batókróm eltolódás*nak nevezzük. Ha a kromofor csoport mellett a molekula pozitív töltésű centrumot tartalmaz, a kromofor fényelnyelése a kisebb hullámhossz irányába tolódik el. Ez a *hipszokróm eltolódás*. A molekula szerkezetének változása a kromofor szerkezetének megváltozása nélkül is növelheti, illetve csökkentheti a kromofor fényelnyelését. Előbbi esetben *hiperkróm*, utóbbiban pedig *hipokróm hatásról* beszélünk (**III-24. ábra**). Célszerű okok miatt (pl.: oldószerhatás, ld.: később) az

ultraibolya és látható spektrofotometriában az abszorbancia meghatározás során alkalmazott hullámhossztartomány 190 és 780 nm közé esik, így szerves molekulák esetén főként a konjugált kettős kötések, hármas kötések és heteroatomokat tartalmazó molekularészek működnek kromoforként.

III-24. ábra: Spektrális eltolódások



III.14 Az abszorbancia meghatározása

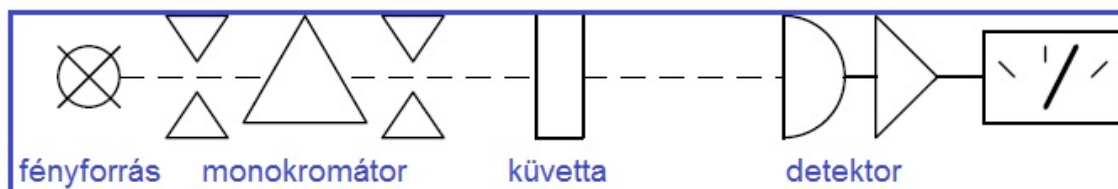
III.14.1 Spektrofotométerek felépítése és működése

A spektrofotométer olyan optikai berendezés, amely a monokromatikus fény intenzitásának illetve az intenzitás változásának nagy pontossággal való mérését teszi lehetővé. A mérés hullámhossz tartománya szerint ismerünk ultraibolya, látható és infravörös tartományban mérő spektrofotométereket. A látható és az ultraibolya tartományban használatos spektrofotométerek olyan optikai rendszerek, amelyek a 200-800 nm hullámhossz-tartományban monokromatikus sugárzás előállítására alkalmasak, és magukban foglalják az abszorbancia mérésére alkalmas berendezést is.

Az UV-Vis spektrofotométerek fő részei

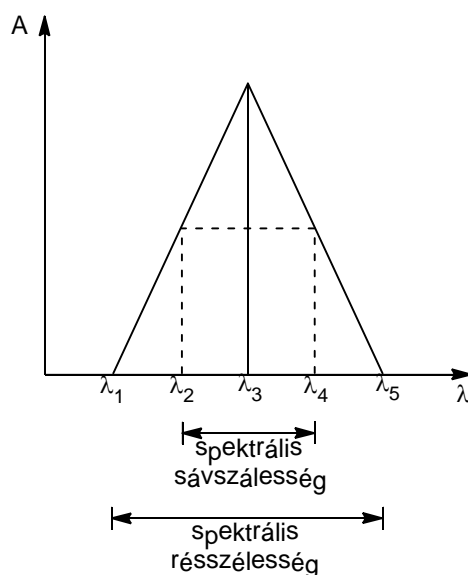
- a fényforrás,
- a fény felbontására szolgáló optikai egység (monokromátor),
- a mintatartó kivetta,
- a detektor, valamint
- a jel- és adatfeldolgozó elektronika, valamint a számítógép (**III-25. ábra**).

III-25. ábra: Az UV-Vis spektrofotométer felépítésének egyszerűsített rajza



A látható spektrumtartományban való mérés céljaira volfrámszálas izzólámpát, illetve annak egy hosszabb élettartamú változatát, a volfrám-halogén lámpát használjuk fényforrásként. Az ultraibolya spektrumtartományban szinte kizárólag deutérium lámpát alkalmazunk. A nagy fényerejű xenon kisülési cső mind az ultraibolya, mind pedig a látható tartományban alkalmas fényforrás, ugyanakkor rövid élettartama és nagy hőleadása miatt csak olyan esetekben használják, amikor nagy fényerőre van szükség.

A spektrofotometriás mérésekhez a lehető legszűkebb hullámhossztartományra korlátozódó sávzélességű fényre van szükségünk, amelyet a kevert fényű fényforrás sugárnyalábjából a *monokromátor* állít elő. A monokromátor belépő részére eső, tükör vagy lencse segítségével párhuzamosított sugárnyaláb a diszperziós elemre (prizma vagy optikai rács) jutva a hullámhossztól függő mértékű eltérítést szenved. Az így nyert eltérített, a monokromátor kilépő részére juttatott (monokromatikus) fényt használjuk fel a spektrofotometriás mérések során. A monokromátorokat elsősorban az „előállított” fény spektrális tisztasága alapján jellemezhetjük, amelyet a belépő és kilépő rész szélessége, valamint a monokromátor diszperziós sajátságai határoznak meg. (A kereskedelmi forgalomban lévő spektrofotométerek monokromátorait a spektrális sávzélességgel jellemzik, amely néhány készüléknél bizonyos határok között tetszés szerint állítható. A kisebb sávzélességgel rendelkező készülékek kitűnő minőségű spektrumok felvételére alkalmasak.) Ha a kilépő részen távozó fénynyaláb spektrális eloszlását megvizsgáljuk, kis résszélesség esetén a **III-26. ábrán** bemutatott, idealizált, háromszöghöz jutunk.

III-26. ábra: A spektrális sáv szélesség egyszerűsített ábrázolása

Az ábrán bemutatott, szimmetrikus intenzitás-hullámhossz eloszlást akkor kapunk, ha a teljes spektrumtartományban azonos diszperziót biztosító monokromátorral dolgozunk, valamint a be- és kilépő rést azonos szélességűre nyitjuk.

A spektrofotométer hullámhossz skáláján a maximális intenzitáshoz tartozó hullámhossz (λ_3) olvasható le. A csúcshintenzitás feléhez tartozó hullámhosszok különbségét ($\lambda_4 - \lambda_2$) a monokromátor spektrális sáv szélességének nevezzük. A résen belépő és kilépő fénynyaláb leghosszabb és legrövidebb hullámhosszainak különbségét ($\lambda_5 - \lambda_1$) gyakran a monokromátor résszélességeinek nevezik.

Amennyiben olyan műszert használunk, amelynek a résszélessége változtatható az adott hullámhosszon, a Gyógyszerkönyv előírása szerint a spektrális résszélesség okozta hiba elkerülése érdekében az abszorpciós sáv félszélességéhez képest keskeny résszélességet kell beállítani, amely azonban elég széles ahhoz, hogy nagy I_0 értékeket kapjunk. A résszélességet ezért mindig úgy kell megállapítani, hogy a leolvasott abszorbancia a rés további szűkítésével ne változzon.

A Gyógyszerkönyv előírása szerint a készülékek *hullámhossz-skáláját rendszeresen ellenőrizni kell*. A hullámhossz-skálát az R holmium-perklorát-oldat abszorpciós maximumai és a hidrogén-, deutérium- vagy higanygőzlámpa vonalai alapján hitelesíthetjük (**III-10. táblázat**). A megengedett eltérés az ultraibolya színek tartományban ± 1 nm, a látható színek tartományban pedig ± 3 nm.

III-10 táblázat: A hullámhossz-skála ellenőrzésére használt abszorpciós maximumok

| | |
|----------------|-----------------------|
| 241,15 nm (Ho) | 404,66 nm (Hg) |
| 253,7 nm (Hg) | 435,82 nm (Hg) |
| 287,15 nm (Ho) | 486,0 nm (D β) |
| 302,25 nm (Hg) | 486,1 nm (H β) |
| 313,16 nm (Hg) | 536,3 nm (Ho) |
| 334,15 nm (Hg) | 546,07 nm (Hg) |
| 361,5 nm (Ho) | 576,96 nm (Hg) |
| 365,48 nm (Hg) | 579,07 nm (Hg) |

A készülék *abszorbancia-ellenőrzése céljából* a Gyógyszerkönyv megfelelő szűrők használatát írja elő. Az *R kálium-dikromát-oldat* **III-11. táblázatban** megadott hullámhosszokon mért fajlagos abszorpciós koefficiense a táblázatban megadott határértékeken belül kell, hogy legyen. Az abszorbancia értékekre megengedett eltérés $\pm 0,01$.

III-11 táblázat: Az *R kálium-dikromát-oldat* (Ph. Hg. VIII.) fajlagos abszorpciós koefficiensei

| Hullámhossz (nm) | Fajlagos abszorpciós koefficiens ($A_{1\text{ cm}}^{1\%}$) | Megengedett határérték |
|------------------|--|------------------------|
| 235 | 124,5 | 122,9-126,2 |
| 257 | 144,5 | 142,8-146,2 |
| 313 | 48,6 | 47,0-50,3 |
| 350 | 107,3 | 105,6-109,0 |

A spektrofotometriás mérések során a minták vizsgálata folyadék állapotban történik. Az oldószerek használhatóságát azok fényáteresztő képessége befolyásolja. A leggyakrabban használt oldószerek méréshatárait (1 cm-es küvettában vízzel szemben mért $A_{1\text{ cm}} = 1$ értékeit) a **III-12. táblázat** mutatja be:

III-12 táblázat: Néhány gyakran alkalmazott oldószer UV-méréshatárának hullámhossza (nm)

| | | | |
|-------------|-----|-------------|-----|
| Acetonitril | 190 | Metanol | 205 |
| Víz | 190 | Dioxán | 220 |
| Hexán | 195 | Diklórmétán | 230 |
| Izooktán | 198 | Kloroform | 240 |
| Ciklohexán | 200 | Etilacetát | 260 |
| 96% etanol | 205 | Aceton | 330 |

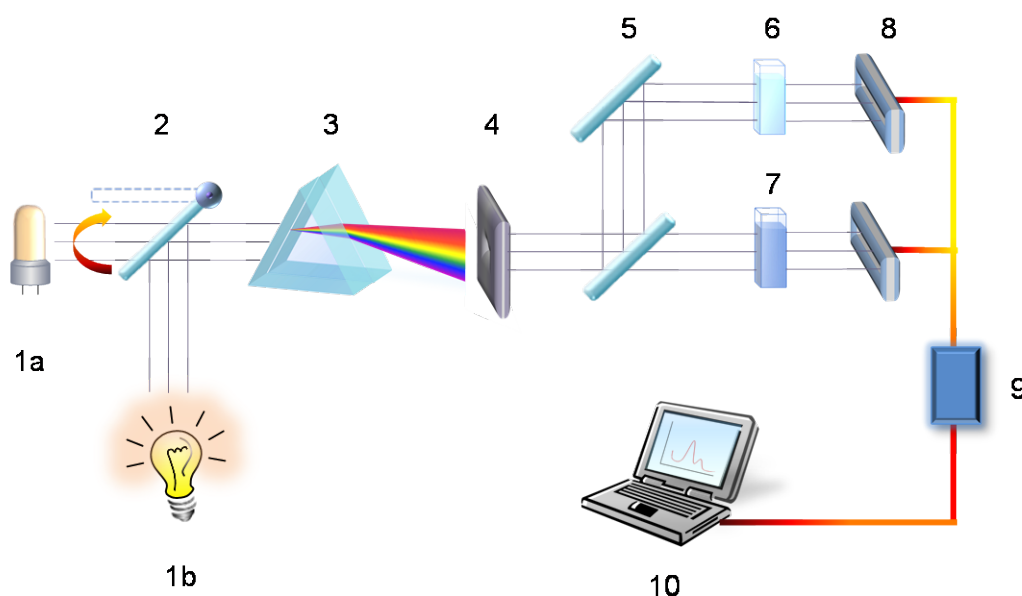
Statikus mintabevitel esetén a mintát a fényútba helyezett *küvettába* tesszük. Speciálisan kialakított küvettákkal megoldható az ún. áramlásos mintabevitel is (átfolyó küvetta). A küvetta befogadására szolgáló küvettatartó kialakítása biztosítja azt az igen fontos követelményt, hogy a küvetta felületére merőlegesen essen rá a sugárnyaláb. Leggyakrabban négyzetes hasáb alakú 10 mm-es rétegvastagságú küvettát alkalmazunk. A pontos mérések érdekében igen fontos, hogy a rétegvastagság valóban megegyezzen a deklarált értékkel. Az UV-Vis spektrofotometriában használatos küvetták üvegből vagy kvarcból készülnek. A kvarcküvetták a teljes spektrumtartományban használhatók, míg az olcsóbb üvegeküvetták csak a látható tartományban való mérésre alkalmasak. (Kisebbségi igényű vizsgálatok esetén látható tartományban egyszer használatos műanyag küvetta is használható.) A mérendő oldatok bepárlódásának illetve az oldószergőzők készülék belsejébe való bejutásának megakadályozására a küvettákat fedővel látjuk el.

A Gyógyszerkönyv előírása szerint a küvetták rétegvastagságának megengedett eltérése $\pm 0,005$ cm. Ha a vizsgálati oldatnak és a kompenzáló folyadéknak szánt küvettákat ugyanazon oldószerral töltjük meg, azonos transzmittancia-értékeket kell kapnunk. Az esetleges eltérést megfelelően korrigálni kell.

A spektrofotometriás meghatározások során a fényintenzitás mérése elektromos jellé való átalakítás útján történik. Erre a célra szolgálhat a fotocella, az elektronsokszorozó, vagy újabban a szilíciumcella illetve a diódasor (diode-array) detektor. Ez utóbbi *detektortípus* lehetőséget ad az abszorpciós spektrum folyamatos, valamennyi hullámhosszon egyidejűleg történő regisztrálására. A detektorban nyert elektromos jelet elektronikus erősítésnek kell alávetni. A korszerű készülékek digitális kijelzővel épülnek fel, amely direkt abszorbancia leolvasást tesz lehetővé.

A működési elv illetve a felépítés szerint megkülönböztetünk *egysugarmentes*, *kétsugarmentes* (III-27. ábra), valamint szakaszosan működő és folyamatosan működő automatikusan regisztráló spektrofotométereket. A mindennapi gyakorlatban a leggyakrabban kétsugarmentes és diódasoros fotométereket alkalmazunk.

III-27. ábra: Kétsugarmentes UV-Vis spektrofotométer vázlatos rajza



(1a: deutérium lámpa, 1b: halogén-volfrám lámpa, 2: tükör, 3: diszperziós egység, 4: kilépő rés, 5: tükör, 6: referencia küvetta, 7: minta küvetta, 8: tükörrendszer, 9: detektor, 10: adatfeldolgozó egység.)

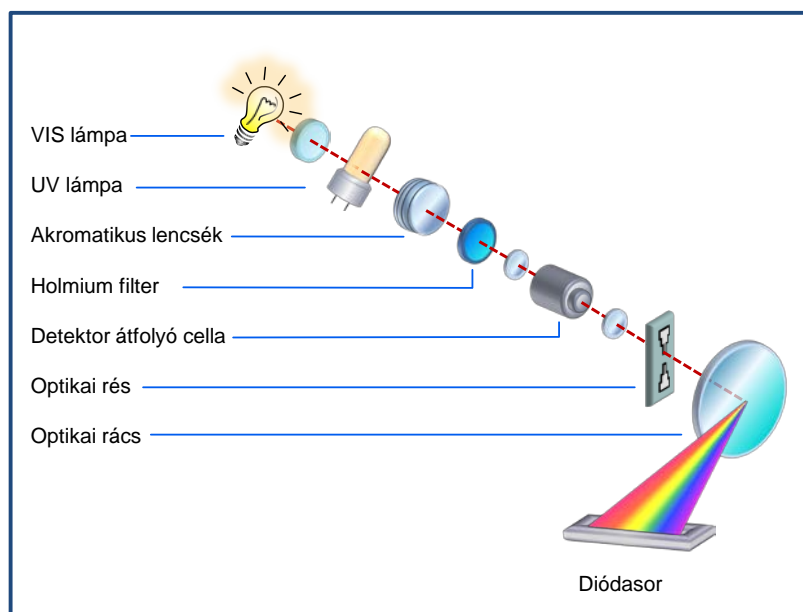
Az *egysugarmentes* készülékekben egyszerre csak egy küvetta helyezhető el az ún. közvetlen kitérésű készülékek használata esetén a mérés során először az összehasonlító oldatot tartalmazó küvetta helyezük a fényútba, erre nullázzuk a műszert ($T\% = 100$, $A = 0$), majd a mérendő oldatot tartalmazó küvetta helyezve a fényútba, az összehasonlító oldathoz képest mérjük a fényintenzitás csökkenését. E készüléktípus előnye az olcsóság, egyszerű felépítés, a legtöbb esetben kis méret, kevés hibaforrás. Sorozatelemzésekhez, gyári, gyártásközi ellenőrzésekhez jól használhatók. A kompenzációs elven működő készülékekben a detektorból kikerülő elektromos jel egy kompenzációs áramkörre kerül, amelyben az egyensúlyi helyzetet egy nullműszer jelzi. E készüléktípusok igen pontos mérést tesznek lehetővé.

A *kétsugarmentes* készülékeknél a sugárforrásból kilépő fényt két fényútra bontják fel, amelyekből az egyik a referenciaoldaton, a másik a mintán halad keresztül.

Így gyakorlatilag két fényintenzitás azonos időben hasonlítható össze. Ezzel kiküszöbölődik a tápfeszültség, az elektronika, a sugárforrás esetleges ingadozásából származó hiba. A mintatér után a két fényutat egyesítik, és a fényt egy detektorral alakítják elektromos jellé. Ez a gyakorlatban azt jelentené, hogy két fényjel (minta és „vak”) felváltva jelenik meg a detektoron, és a feldolgozó elektronika ezt a periodikus jelet demodulálva képezi az abszorbancia jelet ($A = \log I_0/I$).

A diódasoros detektorral rendelkező spektrofotométerekben egy (jellemzően 512 vagy 1024 elemből álló) diódasor érzékeli a küvettából kilépő fényt, amely egy ún. polikromátorból érkezik (**III-28. ábra**). E készülékekben a rács/prizma felbontja a fényt, de nem kell kiválasztani egy hullámhosszt, hanem a diódasor, és a hozzá kapcsolt elektronika egyszerre elemezheti a teljes áteresztési spektrumot.

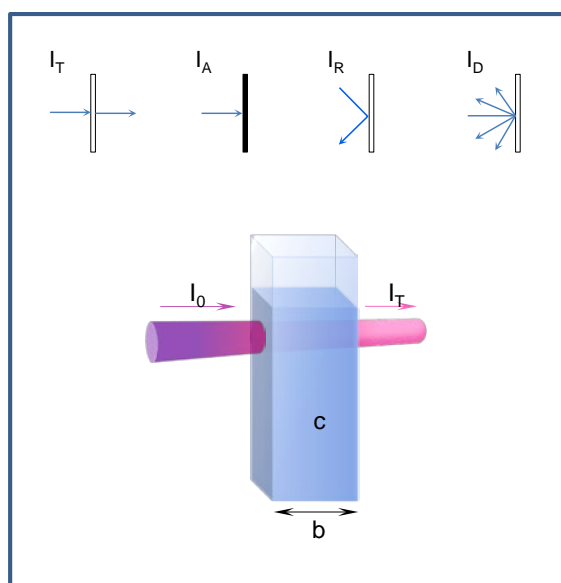
III-28. ábra: Diódasoros spektrofotométer vázlatos rajza



Az ilyen elven működő spektrofotométerekben a mintán meglehetősen nagy energiájú fény halad át, ezért előfordulhat, hogy a fény a küvettában fotokémiai reakciókat (pl. izomerizáció, dimerizáció) indít be. A műszer nagy előnye, hogy a spektrum felvétele igen gyors 0,5-1 másodperc (a kétsugaras spektrofotométerek esetén ez az idő – a hullámhossztartomány függvényében – 60-90 másodperc).

III.14.2 A fény és a közeg kölcsönhatásai

A vizsgálandó mintán ismert intenzitású fényt átengedve a fény elnyelődhet (*abszorpció*), a mintán áthaladhat (*transzmisszió*), visszaverődhet (*reflexió*) vagy szóródhat (*diffúz fényvisszaverődés*). Az abszorbeált (I_A), transzmittált (I_T), reflektált (I_R) illetve szórt fény (I_D) intenzitásának összege egyenlő a besugárzó fény intenzitásával (I_0).

III-29. ábra: Az oldat fényelnyelését meghatározó tényezők

Abszorpciós módszerekkel olyan anyagok vizsgálhatók, amelyek fényvisszaverése elhanyagolható (pl.: híg oldatok). Az abszorbeált fény intenzitását (I_A) a mintára eső fény intenzitásának (I_0) és az áteresztett fény intenzitásának (I_T) különbségéből számíthatjuk ki (**III-29. ábra**).

$$A = \frac{I_A}{I_0} = \frac{I_0 - I_T}{I_0} = 1 - T$$

$$A = \lg \frac{I_0}{I_T} = \lg \frac{1}{T}$$

$$T = \frac{I_T}{I_0}$$

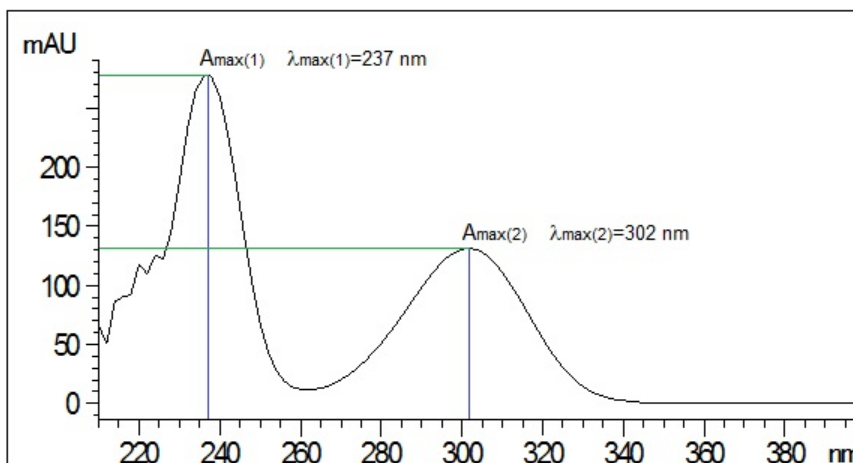
ahol

T = transzmittancia (fényáteresztő képesség),
 A = abszorbancia (fényelnyelés)

Az anyagok vizsgálata során *monokromatikus* fényt használunk, melynek energiáját a mérés során folyamatosan változtatva keressük meg azt a hullámhosszt, amely a minta gerjesztésére alkalmas. Az analitikai információt hordozó színképet *spektrum*nak nevezzük, amelyet grafikusán úgy jelenítünk meg, hogy a minta által abszorbeált fény intenzitását a gerjesztő sugárzás hullámhosszának függvényében ábrázoljuk (**III-30. ábra**).

A spektrum abszorpciós maximumainak megfelelő hullámhosszak jellemzőek az anyagi minőségre. Az abszorpciós spektrumok kvalitatív analitikai használhatósága ugyanakkor korlátozott, mivel a különböző kromoforokra jellemző széles abszorpciós sávok egymással átfedésben lehetnek, így nem rendelhetők egyértelműen egy adott funkciók csoportjához.

III-30. ábra: A szalicilsav abszorpciós spektruma (oldószer: acetonitril, koncentráció: 50 μ g/ml)



III.14.3 Az UV-VIS spektrofotometria kvantitatív alkalmazása

Az ultraibolya és látható spektrofotometria a kvantitatív analízis egyik legszélesebb körben alkalmazott módszere. A koncentrációmérés alapjául a *Lambert-Beer törvény* szolgál, mely szerint a mért abszorbancia (A) egyenesen arányos az oldatban lévő anyag koncentrációjával, valamint a rétegvastagsággal, amelyen a sugárzás áthalad:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

ahol

A = abszorbancia

a = fajlagos abszorpciós koefficiens vagy moláris extinkciós koefficiens,

b = rétegvastagság (a fényút hossza a küvetében, cm-ben kifejezve),

c = az anyag koncentrációja (1 g/100 cm³ vagy 1 mol/dm³ egységben kifejezve).

Fajlagos abszorpciós koefficiens: az 1 g/100 cm³ koncentrációjú oldat abszorbanciája.

Moláris extinkciós koefficiens: az 1 mol/dm³ koncentrációjú oldat abszorbanciája.

A fajlagos abszorpciós és a moláris extinkciós koefficiensek az oldott anyagra jellemző fizikai állandók, közöttük a következő matematikai összefüggés áll fenn:

$$\varepsilon = \frac{A_{1\text{ cm}}^{1\%} \cdot M}{10}$$

ahol

$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ = fajlagos abszorpciós koefficiens,

ε = moláris extinkciós koefficiens,

M = molekulatömeg.

Valamely koefficiens ismeretében - a mért fényelnyelésből - a minta koncentrációja elvileg kiszámítható. A gyakorlatban azonban a *Lambert-Beer törvény* korlátozott érvényessége miatt a pontos koncentráció meghatározás érdekében kalibrációs görbét kell felvenni a minták mérése előtt.

A Lambert-Beer törvény korlátai

1. A Lambert-Beer törvény csak *híg* oldatokra érvényes (10^{-5} - 10^{-2} mol/dm³ koncentráció tartományban). Töményebb oldatok esetén megváltozik az oldat törésmutatója, amellyel korrigálni szükséges.
2. A *kromofor* csoportot hordozó molekula *kémiai reakciói* (pl.: molekulák disszociációja, asszociációja, protonálódása, komplexképzési reakciója) is okozhatnak a Lambert-Beer törvénytől való eltérést. Koncentráció meghatározás során fontos, hogy a vizsgált vegyület teljes mennyisége azonos molekuláris formában legyen.
3. A Lambert-Beer törvény *csak monokromatikus* fény alkalmazása esetén érvényes. A monokromatikus fényt létrehozó eszközök különböző sáv szélességet képesek elérni. A nagyobb sáv szélesség eltérést okozhat, ha az abszorpciós spektrum emelkedő vagy leszálló szakaszán végezzük a mérést. A színek meredek szakaszán mért átlagos abszorbancia jelentős mértékben különbözhet a pontosan adott monokromatikus fényvel nyert abszorbanciától. E hiba kiküszöbölésére célszerű a színek elnyelési maximumának helyén végezni a koncentrációmérést.
4. Az *oldószercsere* különböző szinten stabilizálja egy adott molekula alap és gerjesztett állapotát, megváltozik a gerjesztéshez szükséges energia, így az abszorpciós spektrum is.
5. A Lambert-Beer törvény *csak molekuláris oldatokra* érvényes. A kolloid részecskék által okozott fényszóródás jelentős hibát okozhat.
6. A rendszer *hőmérséklete* is befolyásolhatja az abszorbanciát. Az elektronátmenetek energiájának változása az elnyelési sávok helyének, alakjának és intenzitásának megváltozásával járhat együtt. Tehát csak az azonos hőmérsékleten végzett mérések adatai hasonlíthatók össze.

Fontos megjegyezni, hogy a Lambert-Beer törvény érvényességi tartományában az abszorbancia additív tulajdonság. A vizsgálatoknál alkalmazott hullámhossznál elnyelő, egymás mellett előforduló komponensek fényabszorpciója összeadódik.

III.14.4 Az abszorbancia mérés gyakorlata

A spektrofotométer bekapcsolását követően nagy tisztaságú, spektroszkópiailag oldószert segítségével, ami átterest a vizsgálni kívánt hullámhossz tartományban (pl.: víz, n-hexán, etanol, acetónitil), kalibráló oldatsorozatot készítünk.

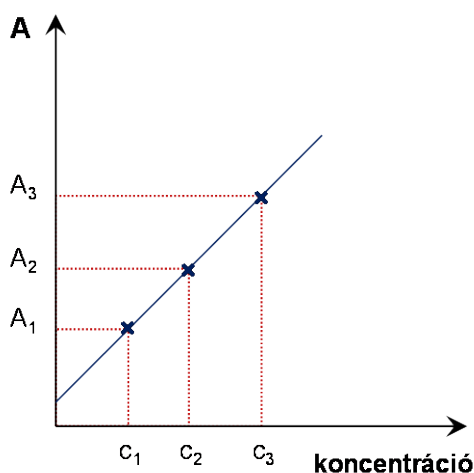
A kalibráló sor a meghatározandó anyagot ismert koncentrációban tartalmazó oldatok sorozata. A meghatározandó anyag valamely koefficiensének (fajlagos abszorpciós vagy moláris extinkciós) ismeretében a kalibrációs koncentrációtartomány jól megtervezhető. Ideális esetben a kalibráló oldatokhoz tartozó abszorbancia értékek az alkalmazott spektrofotométer optimális mérési tartományába esnek (pl.: $A = 0,2-0,7$).

Abszorbancia méréskor a vizsgálandó oldat fényelnyelését egy referencia („vak”, összehasonlító) oldathoz viszonyítjuk. A referencia oldat a mérendő komponens kivételével a vizsgálandó oldat összes többi összetevőjét tartalmazza. (A „vak” oldat sok esetben maga a mintaoldószert.)

Abszorbancia mérés előtt a spektrofotométerünk által átfogható hullámhossz tartományban 2-5 nm-es lépésekkel haladva végigmérjük a meghatározandó anyag elnyelését, majd egy λ -A grafikont, abszorpciós spektrumot veszünk fel. A mérést az abszorpciós maximumhoz tartozó hullámhosszon végezzük, mert ezen a hullámhosszon mérve lesz a legjobb a mérés érzékenysége.

A mérés kivitelezésekor ügyelni kell arra, hogy az intenzitásmérést a szórt fény zavarja, ezért az oldatnak tisztának, a kuvetta falának ujjenyomatmentesnek és száraznak kell lennie. A kuvettát minden egyes mérés előtt át kell öblíteni a mintaoldattal és körülbelül $\frac{3}{4}$ részig kell feltölteni. Illékony oldószerek használata esetén a kuvettát le kell zárni. A Lambert-Beer törvény értelmében a kalibráló oldatokhoz tartozó abszorbancia értékeket a koncentráció függvényében ábrázolva egy egyenest kapunk (**III-31. ábra**). A mért pontokra egyenest illesztve és az ismeretlen koncentrációjú oldat abszorbanciáját meghatározva az ismeretlen koncentráció az illesztett egyenes egyenletének ismeretében kiszámítható.

III-31. ábra: Az abszorbancia értékek koncentráció függvényében való ábrázolásával kapott kalibrációs egyenes

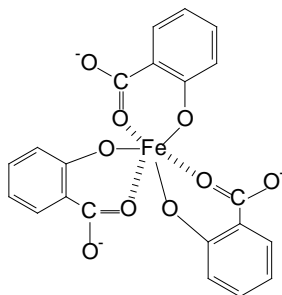


Feladat: Szalicilsav és acetilszalicilsav egymás melletti meghatározása porkeverékből, spektrofotometriás és alkalimetriás módszerekkel

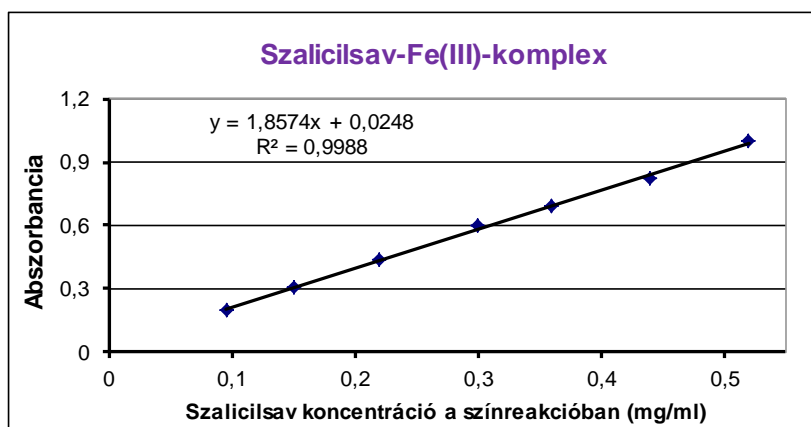
1. Szalicilsav szelektív meghatározása spektrofotometriásan

Pontosan mért, kb. 25 mg ismeretlen összetételű, szalicilsavat és acetilszalicilsavat tartalmazó porkeveréket 25,0 ml-es mérőlombikban, metanolban oldunk. (2 párhuzamos bemérést végzünk.)

Az oldatok 1,00 ml-éhez 4,00 ml 1%-os FeCl_3 -oldatot (oldószer: 0,1M HCl-oldat) adunk. Az elegyet összerázzuk, 15 percig sötétben inkubáljuk. A színreakció lejátszódása után 530 nm-en mérjük az oldat fényelnyelését. Összehasonlító oldatként 1,00 ml metanol 4,00 ml FeCl_3 -oldattal készült elegyét alkalmazzuk. Vas(III)-ionokkal 1:3 arányú ibolyaszínű komplex képződik a fenolos hidroxilcsoporttal, amelyet a szomszédos karboxilcsoport stabilizál (**III-32. ábra**).

III-32. ábra: A szalicilsav vas(III)-komplexe

Az alábbi kalibrációs görbe (**III-33. ábra**) alapján meghatározzuk a szalicilsav koncentrációját a színreakcióban, majd a pontos bemérés ismeretében kiszámítjuk a porkeverék tömegszázalékban kifejezett szalicilsav tartalmát.

III-33. ábra: A szalicilsav vas(III)-komplexének kalibrációs egyenese (a szalicilsav koncentrációjának függvényében ábrázolva).**2. Szalicilsav és acetilszalicilsav együttes mérése alkalimetriás titrálással**

Pontosan mért, kb. 10 mg porkeveréket mérünk Erlenmeyer-lombikba. Az anyagot 10 ml előzetesen semlegesített metanolban oldjuk. Az oldatot 5-6 csepp I-fenoltalein indikátor mellett 0,01M-os NaOH-mérőoldattal titráljuk.

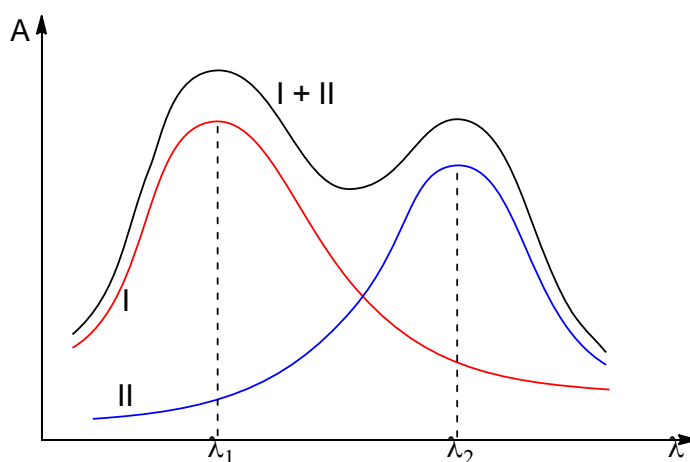
A porkeverék szalicilsav és acetilszalicilsav tartalma együtt mérődik (egyértékű savként). A gyakorlat első részében már meghatározott szalicilsav tartalom ismeretében kiszámolható a porkeverék acetilszalicilsav tartalma.

Végeredményként megadjuk a porkeverék tömegszázalékban kifejezett szalicilsav és acetilszalicilsav tartalmát. $M(\text{szalicilsav}) = 138,12$; $M(\text{acetilszalicilsav}) = 180,16$.

III.15 Többkomponensű rendszerek

A gyógyszerkészítmények jelentős része két vagy több meghatározandó hatóanyagot tartalmaz. A többkomponensű rendszerek spektrofotometriás mérésének alapjául az az elv szolgál, hogy a *Lambert-Beer törvény* érvényességi tartományában az abszorbancia additív tulajdonság. Amennyiben egy rendszerben egy adott hullámhosszon több komponens is rendelkezik fényelnyeléssel, akkor a mért abszorbancia az egyes komponensek abszorbanciájának összege (**III-34. ábra**).

III-34. ábra: Kétkomponensű rendszer UV-Vis spektruma



Több komponens egymás melletti meghatározásához szükség van az egyes komponensek abszorpciós spektrumára és valamennyi mérési hullámhosszon a komponensek fajlagos abszorpciós koefficiensére. A mérési hullámhosszak kiválasztásánál előnyben részesítjük a komponensek spektrumainak abszorpciós maximumait (illetve azokat a hullámhosszakokat, amelyeken csak az egyik komponensnek van fényelnyelése), majd ezeken a hullámhosszakon mérve meghatározzuk az egyes vegyületek fajlagos abszorpciós koefficiensét. Ezután annyi hullámhosszon végezve az abszorbancia mérést, ahány fényelnyelő komponens az adott készítményből készült oldat tartalmaz, a Lambert-Beer törvény segítségével az egymás mellett lévő komponensek koncentrációja meghatározható.

$$A_1 = a_{1,\lambda_1} \cdot c_1 \cdot b + a_{2,\lambda_1} \cdot c_2 \cdot b$$

$$A_2 = a_{1,\lambda_2} \cdot c_1 \cdot b + a_{2,\lambda_2} \cdot c_2 \cdot b$$

ahol

A_1 és A_2 = a mért abszorbancia értékek,

λ_1 és λ_2 = hullámhosszak, amelyeken az abszorbanciamérést végezzük,

a_{1,λ_1} és a_{1,λ_2} = az (1)-es komponens fajlagos abszorpciós koefficiensai λ_1 és λ_2 hullámhosszon,

a_{2,λ_1} és a_{2,λ_2} = a (2)-es komponens fajlagos abszorpciós koefficiensai λ_1 és λ_2 hullámhosszon,

c_1 és c_2 : az (1)-es és (2)-es komponens meghatározandó ismeretlen koncentrációja,

b : a rétegvastagság cm-ben kifejezve (egy mérésen belül állandó).

Feladat

1. *Spiritus salicylatus cum resorcino* oldat szalicilsav és rezorcin tartalmának egymás melletti meghatározása spektrofotometriás módszerrel

Spir. salic. c. resorc.

FoNo VII.

| | | |
|--------------------|-----------------------|-----------|
| <i>Összetétel:</i> | Resorcinum | 0,50 g |
| | Acidum salicylicum | 1,5 g |
| | Alcoholum dilutum 70% | ad 50,0 g |

Szalicilsav, rezorcin

A kapott oldatrészletet (~1,0 g) kvantitatív módon 100 ml-es mérőlombikba mossuk és 0,1 M sósavval jelre töltjük. Az oldat 10,00 ml-ét 100 ml-es mérőlombikban 10-szeresére hígítjuk. 0,1 M sósavat használva összehasonlító oldatként megmérjük a hígított oldat abszorbanciáját 273 és 303 nm-en. A mérés során 1 cm rétegvastagságú kvarcküvetét használunk.

273 nm-en a rezorcin és a szalicilsav egyaránt nyel el fényt, míg a 303 nm-en mért abszorbancia egyedül a szalicilsavtól származik.

| | | | |
|--|-----|--|-----|
| $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (303 nm): szalicilsav: | 213 | $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (273 nm): szalicilsav: | 45 |
| rezorcin: | 0 | rezorcin: | 152 |

A Lambert-Beer törvényt alkalmazva két egyenlet írható fel, melyekből a két ismeretlen (a szalicilsav és a rezorcin koncentrációja) kiszámítható.

$$A_{303} = 213 \cdot c_{\text{szalicilsav}} \cdot 1 + 0 \cdot c_{\text{rezorcin}} \cdot 1$$

$$A_{273} = 45 \cdot c_{\text{szalicilsav}} \cdot 1 + 152 \cdot c_{\text{rezorcin}} \cdot 1$$

2. *Koffeint és szalicilsavat* ismeretlen koncentrációban tartalmazó oldat vizsgálata spektrofotometriás módszerrel

a.) *Koffein és szalicilsav standardok UV-spektrumának felvétele, hígítási sorozat készítése*

A standard anyagokból törzsoldatot készítünk:

Pontosan mért, kb. 12,5 mg koffein standard anyagot 25,0 ml-es mérőlombikban, etanolban oldunk. Az oldat 1,00 ml-ét etanollal hígítjuk 25,0 ml-es mérőlombikban (1).

Pontosan mért, kb. 6 mg szalicilsav standard anyagot 25,0 ml-es mérőlombikba etanolban oldunk. Az oldat 1,00 ml-ét etanollal hígítjuk 25,0 ml-es mérőlombikban (1).

Az (1) oldatok felhasználásával felvesszük a standard anyagok UV-spektrumát, leolvassuk az abszorpciós maximum (λ_{max}) helyét. Összehasonlítóként etanolt használunk.

Az (1) oldatok felhasználásával öt oldatból álló hígítási sorozatot (kalibráló oldatsorozat) készítünk (száraz kémcsövekben) az alábbiak szerint:

- (2) 10,00 ml (1) oldat + 5,00 ml etanol
- (3) 5,00 ml (1) oldat + 5,00 ml etanol

- (4) 5,00 ml (2) oldat + 5,00 ml etanol
 (5) 5,00 ml (3) oldat + 5,00 ml etanol

A spektrofotométert mindkét anyag esetén az abszorpciós maximumhoz tartozó hullámhosszra állítjuk, majd lemérjük a kalibráló oldatok elnyelését. A leolvasott abszorbancia értékeket a koncentráció függvényében, milliméterpapíron ábrázoljuk. Statisztikai értékeléssel kiszámoljuk a kalibrációs egyenesek egyenleteit.

b.) *Fajlagos abszorpciós koefficiensek meghatározása*

A kalibrációs egyenesek egyenletei alapján statisztikai értékeléssel kiszámoljuk az abszorpciós maximumhoz tartozó fajlagos abszorpciós koefficiensek értékét.

| | λ_{\max} | $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ |
|-------------|------------------|-------------------------|
| Koffein | 274 nm | 475 |
| Szalicilsav | 233 nm | 763 |

c.) *Koffein és szalicilsav egymás melletti meghatározása UV-spektrofotometriás módszerrel*

Az ismeretlen koncentrációban koffeint és szalicilsavat tartalmazó oldatok 1,00 ml-ét 10,0 ml-es mérőlombikban etanollal hígítjuk. A hígítással kapott oldat fényelnyelését a két anyag abszorpciós maximumán mérjük.

Az előzetesen számolt, illetve a megadott fajlagos abszorpciós koefficiensek segítségével kiszámoljuk az ismeretlen oldat koncentrációját a két anyagra nézve.

Koffein fajlagos abszorbanciája a szalicilsav λ_{\max} helyén: 340

Szalicilsav fajlagos abszorbanciája a koffein λ_{\max} helyén: 104

Összefoglalva, a négy szükséges fajlagos abszorpciós koefficiens a következő:

| | | | |
|--|-----|--|-----|
| $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (274 nm): koffein: | 475 | $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (233 nm): koffein: | 340 |
| szalicilsav: | 104 | szalicilsav: | 763 |

A Lambert-Beer törvényt alkalmazva kétkomponensű rendszerről lévén szó, két egyenlet írható fel, melyekből a két ismeretlen (a koffein és a szalicilsav koncentrációja) kiszámítható.

$$A_{274} = 475 \cdot c_{\text{koffein}} \cdot 1 + 104 \cdot c_{\text{szalicilsav}} \cdot 1$$

$$A_{233} = 340 \cdot c_{\text{koffein}} \cdot 1 + 763 \cdot c_{\text{szalicilsav}} \cdot 1$$

III.16 Derivatív és differencia spektrofotometria

III.16.1 Derivatív spektrofotometria

Az 1990-es évektől forgalomba kerültek olyan spektrofotóterek, amelyek a spektrum felvételével egy időben képesek regisztrálni a spektrum különböző rendű deriváltjait is (első, második, harmadik és negyedik deriváltját). A deriválás során az eredeti függvény maximum- és minimumhelyei zéró értéket vesznek fel, az inflexiókból pedig maximum- és minimumhelyek lesznek. A derivatív spektrumok az eredeti spektrumhoz képest sokkal strukturáltabbak, alkalmasak az alapspektrumok minimális különbségeinek felnagyítására.

A derivatív spektrofotometria négy területen hozott előrelépést: (1) kvalitatív analízis, (2) monoton háttérpektrumok kiejtése illetve (3) átfedő széles sávok eliminálása keskeny sávval rendelkező anyag kvantitatív analízise és (4) többkomponensű rendszerek vizsgálata során. Pl.: aromás aminosavak meghatározása fehérjékben és enzimekben.

III.16.2 Differencia spektrofotometria

A differencia spektrofotometria módszert keverékek egy-egy komponensének szelektív meghatározására vagy háttérrel terhelt spektrum esetén egy komponens meghatározására használják. A technika lényege az, hogy a meghatározandó anyag törzsadatából két azonos térfogatú részt veszünk ki, majd az egyik oldatrészlettel olyan kémiai reakciót játszunk le, amely a meghatározandó komponens spektrumát eltolja, megszünteti vagy abban egy új sávot hoz létre. A reakció lejátszódása után mindkét oldatrészletet azonos térfogatra egészítjük ki, hogy koncentrációjuk egyenlő maradjon. Az így nyert két oldatot egy-egy küvetába töltjük, majd közülük az egyiket összehasonlító oldatnak használva felvesszük a másik oldat spektrumát. A kémiai reakció során változást el nem szenvedő anyagok abszorbanciája mindkét küvetában azonos lesz, így csak a reagáló komponens differenciaspektrumát fogjuk észlelni.

III.17 A spektrumot befolyásoló tényezők

III.17.1 A pH hatása a spektrumokra

A pH változás azon anyagok spektrumában okoz eltolódást, amelyek a hidrogénion-koncentráció változás hatására reverzibilis módon protont vesznek fel vagy adnak le. Jelentős spektrumváltozás akkor következik be, ha az érintett savként vagy bázisként viselkedő funkciós csoport n- és/vagy π -elektronjai részt vesznek a molekula konjugált elektronrendszerének kialakításában (pl.: benzokain, szalicilsav). A savas illetve bázikus csoportokat izoláltan tartalmazó molekulák hasonló körülmények közötti spektrumváltozása nem jellegzetes (pl.: morfin spektrumváltozása savanyítás hatására, protonált kodein spektrumváltozása lúgosítás hatására). A savi disszociációs állandó (K_s érték) ismeretében a savak és bázisok protonált illetve deprotonált formáinak egy adott pH-értékhez tartozó aránya könnyen kiszámítható (részletesebben lásd az V.1. fejezetben).

Reverzibilis sav-bázis egyensúly esetén létezik legalább egy olyan hullámhossz, amelynél az anyag valamennyi spektruma metszi egymást (*izobesztikus pont*). Ezen a hullámhosszon az abszorbancia független a pH-tól. Az izobesztikus pontnak megfelelő hullámhossz általában távol helyezkedik el a λ_{\max} -értékektől, így az ezen a hullámhosszon való mérés érzékenysége csökken.

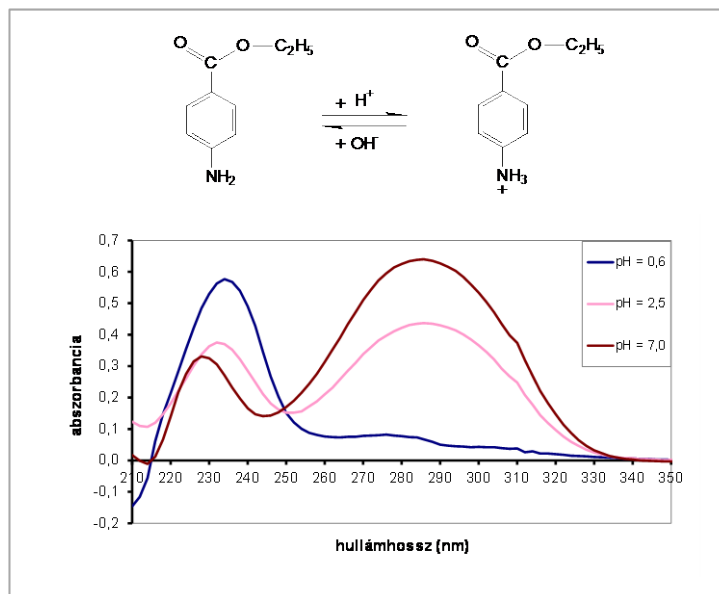
Feladat

1. Bázisos jellegű vegyületek UV-Vis spektrumának pH-függése

Benzocain ($pK_s=2,50$) spektrumának pH-függése (III-35. ábra)

Erősen savas közegben a nitrogén nemkötő elektronpárjának az aromás gyűrűre gyakorolt hatása megszűnik, erőteljes hipszokróm ($\lambda_{\max}=286 \text{ nm} \rightarrow \lambda_{\max}=276 \text{ nm}$) és hipokróm ($A=0,64 \rightarrow A=0,08$) eltolódás következik be.

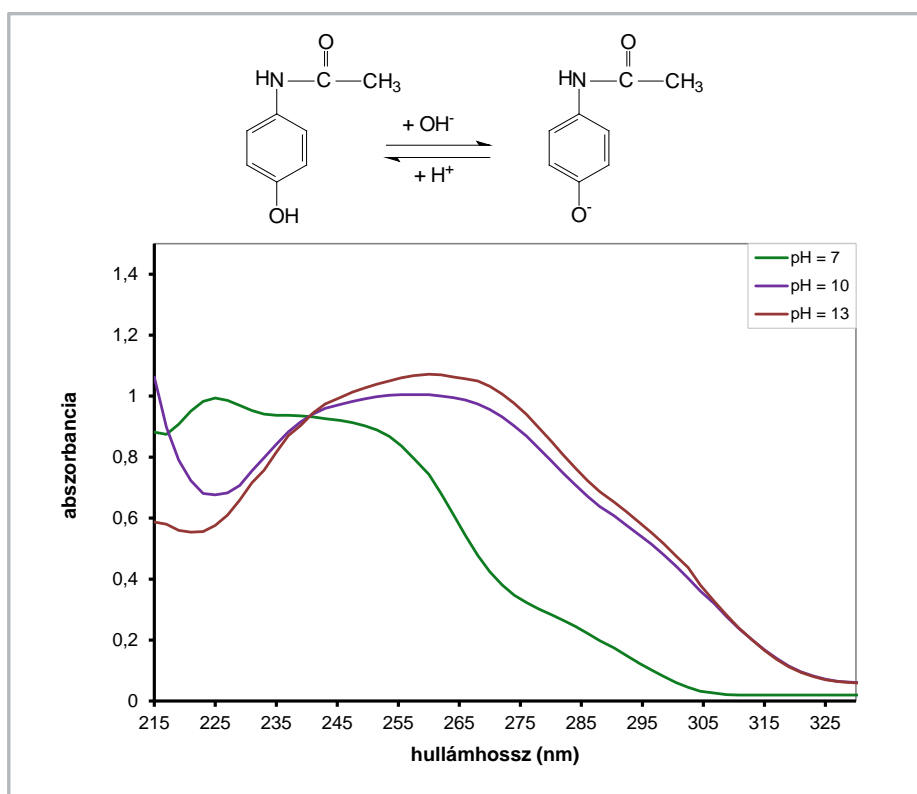
III-35. ábra: *Benzocainum* (Ph. Hg. VIII) UV-Vis spektrumának pH-függése



2. Savas jellegű vegyület UV-Vis spektrumának pH-függése

Paracetamolum ($pK_s=9,6$) UV-Vis spektrumának pH-függése (III-36. ábra)

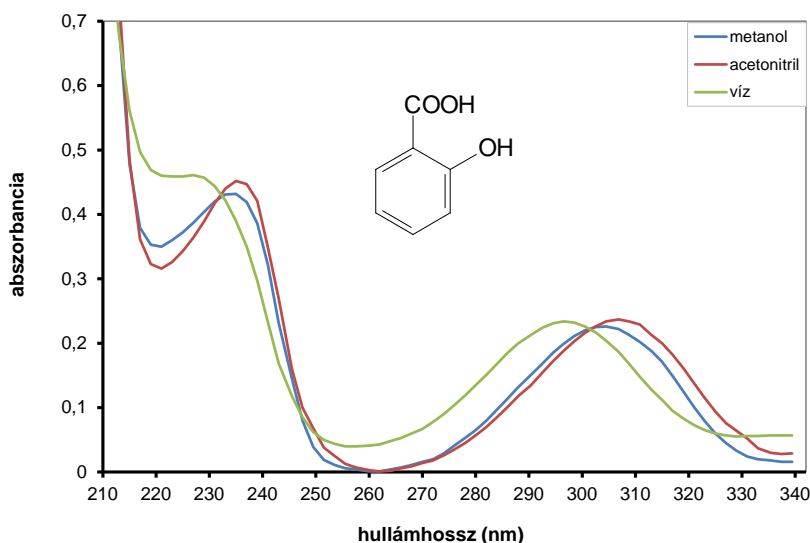
Lúgos közegben a fenolátanion negatívan töltött oxigénje sokkal inkább tud elektronokat küldeni az aromás gyűrű irányába, mint a szabad fenolos hidroxilcsoport, ezért a spektrum batokróm ($\lambda_{\max}=237 \text{ nm} \rightarrow \lambda_{\max}=262 \text{ nm}$) és hiperkróm ($A_{237}=0,837 \rightarrow A_{262}=0,972$) eltolódást szenved.

III-36. ábra: *Paracetamolum* (Ph. Hg. VIII.) spektrumának pH-függése**III.17.2 Az oldószer hatása a spektrumokra**

A szerves vegyületek spektrumai általában 20-40 nm félértékszélességű kiszélesedett sávokból állnak. Mivel a gyógyszermolekulák nagy része több UV/VIS tartományban gerjeszthető elektront tartalmaz, valamint ezek az elektronek adott kötési rendszerben többféleképpen gerjeszthetők, egy anyag spektruma általában több sávból áll, amelyek csak nagyon ritkán különülnek el egymástól teljesen. A finomszerkezet megjelenése illetve elmaradása több tényező eredménye. A molekulán kívüli tényezők közül lényeges megemlíteni az oldószerek hatását. Az oldott molekulával kölcsönhatásba nem lépő apoláris oldószerek (pl.: izooktán, hexán) a poláris oldószerekkel ellentétben kedvez a finomszerkezet megjelenésének. Az oldószerhatás bizonyos sávok eltolódását is eredményezheti (batokróm/hipsokróm illetve hiperkróm/hipokróm eltolódások). Így pl. az oldószer polaritásának növelése az $n \rightarrow \pi^*$ és az $n \rightarrow \sigma^*$ átmenetnek megfelelő sávok hipsokróm eltolódását, a $\pi \rightarrow \pi^*$ átmenetnek megfelelő sávok batokróm eltolódását idézi elő.

Példa: Acidum salicylicum spektrumának oldószertől való függése (**III-37. ábra**)

III-37. ábra: *Acidum salicylicum* (Ph. Hg. VIII.) UV-Vis spektrumának oldószertől való függése



III.18 Az UV-spektroszkópia felhasználása a gyógyszerkönyvben azonosítási vizsgálatra

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv gyakran alkalmaz UV-VIS spektrofotometriás vizsgálo módszert, főként a gyógyszervegyületek azonosítása és tartalmi meghatározása céljából.

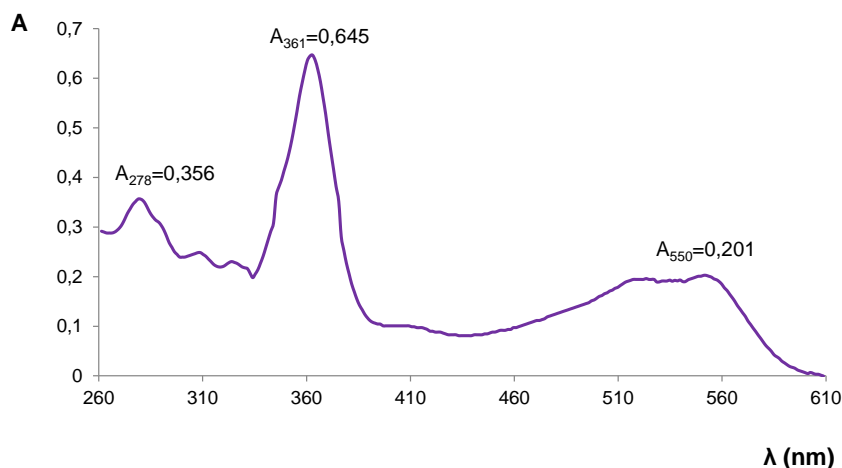
Az azonosítási feltételek két lehetőséget jelöl meg a Gyógyszerkönyv:

1. A vizsgált vegyületből az adott cikkelyben előírt módon oldatot készítünk, majd meghatározott hullámhossztartományban felvesszük az anyag spektrumát. Ezt követően az abszorpciós maximumon mért fajlagos abszorpciós koefficiens értékét kell összevetnünk a cikkelyben megadott értékkel vagy értéktartománnyal.
2. A vizsgált vegyület előírt módon elkészített oldatát a cikkelyben meghatározott abszorpciós maximum helyeken megmérjük, azonosítási esetén a mért abszorbanciák arányai a kívánt tartományba kell, hogy essenek.

Tartalmi meghatározáshoz hiteles standarddal való kalibráció alkalmazását írja elő a Gyógyszerkönyv. A kalibrációs egyenes egyenlete segítségével meghatározható a vizsgálandó anyag előírt módon hígított oldatának koncentrációja.

III.18.1 Cyanocobalaminum azonosítása Ph. Hg. VIII. szerint

2,5 mg anyagot *R* vízzel 100,0 ml-re oldunk. Az oldat spektrumát 260 és 610 nm között vizsgálva, 278 és 361 nm-en, valamint 547 és 559 nm között abszorpciós maximum található. A 361 nm-es és az 547-559 nm-es maximumon mért abszorbanciák aránya: 3,15 – 3,45. A 361 nm-es és a 278 nm-es maximumon mért abszorbanciák aránya: 1,70 – 1,90.

III-38. ábra: A cyanocobalaminum UV-VIS spektruma

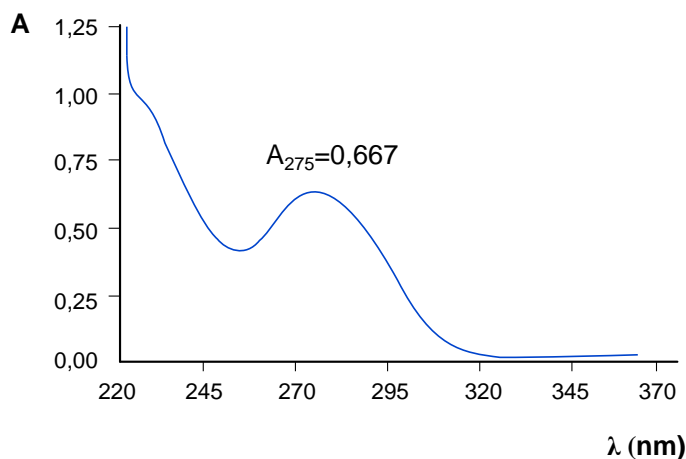
$$\frac{A_{361}}{A_{550}} = \frac{0,645}{0,201} = 3,21 \quad (3,15 - 3,45)$$

$$\frac{A_{361}}{A_{278}} = \frac{0,645}{0,356} = 1,81 \quad (1,70 - 1,90)$$

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv által megjelölt abszorpciós maximumokon mért abszorbanciák arányai a kívánt tartományokba esnek, így a vizsgált anyag eleget tesz a gyógyszerkönyvi előírásoknak, tehát *azonos*.

III.18.2 Aceclofenacum azonosítása Ph. Hg. VIII. szerint

50,0 mg anyagot R metanollal 100,0 ml-re oldunk. Az oldat 2,0 ml-ét R metanollal 50,0 ml-re hígítjuk. Az így nyert oldat spektrumát 220 és 370 nm között vizsgálva, 275 nm-en abszorpciós maximum található. Az abszorpciós maximumon mért fajlagos abszorpciós koefficiens 320-350.

III-39. ábra: Az aceclofenacum UV-VIS spektruma

Az 50,0 mg/100,0 ml koncentrációjú oldat 2,0 ml-ét 50,0-ml-re hígítva a kapott oldat koncentrációja 2,0 mg/100 ml lesz. A spektrumfelvételt követően megállapítható, hogy 275 nm-en abszorpciós maximuma van az anyagnak, $A_{275} = 0,667$.

Egyszerű aránypárt felhasználva a számításhoz:

$$\begin{array}{l} \text{Ha} \quad \quad \quad c = 2 \text{ mg/100 ml} \quad \quad \quad A = 0,667 \\ \text{Akkor} \quad \quad \quad c = 1000 \text{ mg/100 ml} \quad \quad \quad A = (A_{1\text{cm}}^{1\%}) = x \end{array}$$

$$x = \frac{1000 \cdot 0,667}{2} = 333,5 \quad (320 - 350)$$

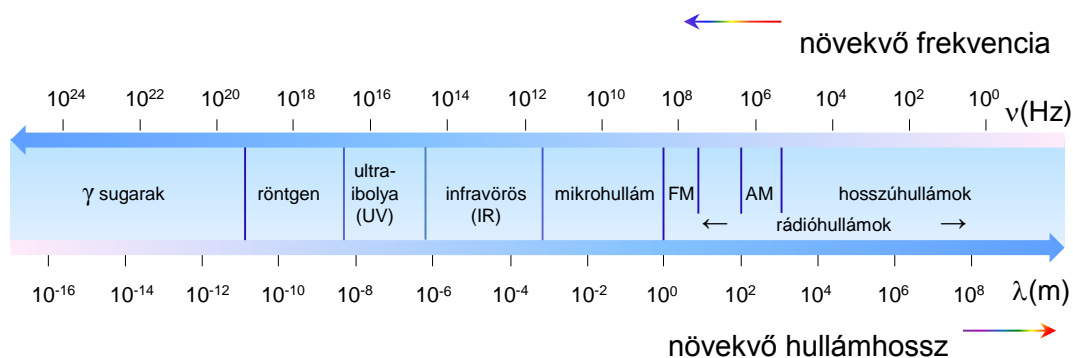
Az abszorpciós maximumon mért fajlagos abszorpciós együttható 333,5, ami a kívánt tartományba esik, így a vizsgált anyag eleget tesz a gyógyszerkönyvi előírásoknak, tehát *azonos*.

III.19 Abszorpciós spektrofotometria az infravörös (IR) színtartományban

III.19.1 Az IR spektrofotometria alapjai

Az *infravörös spektroszkópia* az *infravörös sugárzás* (III-40. ábra) és az anyag kölcsönhatása során bekövetkező jelenségeket tanulmányozza. Az infravörös tartományba eső elektromágneses sugárzás (hullámhossza: 780 nm – 1000 μm , hullámszáma: 10 cm^{-1} – $12\,500 \text{ cm}^{-1}$ és frekvenciája: 300 GHz – 384 THz) nem hordoz elegendő energiát ahhoz, hogy az elektronokat gerjessze egy molekulában, ehelyett a *rezgési és forgási energiaállapotokat indukálja*. Az infravörös spektrumot analitikai szempontból közeli, közepes és távoli infravörös tartományokra oszthatjuk (III-13. táblázat).

III-40. ábra: Az elektromágneses spektrum tartományai



III-13 táblázat: Az infravörös spektroszkópia általános felosztása

| Tartomány | Jelölés | Hullámhossz (μm) | Hullámszám (cm^{-1}) | Frekvencia |
|-----------|---------|-------------------------------|---------------------------------|------------------|
| Közeli | NIR | 0,8-2,5 | 12500 - 5000 | 375 – 120 THz |
| Közepes | MIR | 2,5-25 | 5000-500 | 120 – 12 THz |
| Távoli | FIR | 25-500 | 500-25 | 12 THz – 600 GHz |

Az infravörös spektroszkópia alapulhat az IR sugárzás elnyelésén (*abszorpció*), visszaverésén (*reflexió*) és kibocsátásán (*emisszió*). Az IR spektroszkópiában az emissziós technika nem terjedt el. Leggyakrabban az abszorpciós technikát használjuk.

Ennek során a vizsgálandó anyag a sajátrezgéseinek megfelelő hullámhosszú fényt nyeli el és a spektrumban abszorpciós sáv jelenik meg. A spektrum általában a transzmittanciát vagy az abszorbanciát ábrázolja a hullámszám függvényében.

A kémiai kötésekben lévő atommagok rezgési amplitúdójának, azaz a kémiai kötés rezgési energiájának növeléséhez $5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ nagyságrendű energia szükséges - szemben a kötésben lévő elektronok magasabb energiaszintre történő gerjesztéséhez szükséges $100 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ nagyságrendű energia tartománnyal. Az előbbi ($5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) nagyságrendű energiát a *közeli infravörös* ($12500\text{-}5000 \text{ cm}^{-1}$) és a *közepes infravörös* ($5000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$) hullámszámú sugarak képviselik.

A molekulák rotációs energiájának növelését a kis hullámszámú ($500\text{-}25 \text{ cm}^{-1}$) *távoli infravörös* és mikrohullámú sugarak okozzák, melyek gerjesztéséhez szükséges energiakvantumok igen kicsik (kb. $10^{-3} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Egy többatomos molekula bármely elektronállapotában nagyszámú rezgési állapot létezik, és ezek mindegyike tovább osztódik rotációs szintekre. A rotációs finomszerkezet azonban csak gáz halmazállapotban figyelhető meg, ahol, a molekulák között nincs számottevő kölcsönhatás. Oldatban vagy szilárd formában a finomszerkezet egybeolvad egy sima vonalú rezgési rotációs sávzá, amely természetesen sokkal keskenyebb, mint az ultraibolya vagy látható tartományok elektronrezgési rotációs sávjai.

Az infravörös spektrumban azoknak a molekuláris rezgéseknek és forgásoknak gerjesztődése okoz abszorpciót, amelyek során *megváltozik a molekula dipólusmomentuma*. Ezért csak az elemi kétatomos gázoknak (pl. O_2 , N_2 , stb.) nincs infravörös spektruma, minden egyéb vegyületnek van.

A molekuláris rezgések funkcióját és ennek megfelelően a rezgési (vibrációs) spektrumban megjelenő abszorpciós sávok hullámszámát az atomok tömege és a közöttük ható erők szabják meg. Ezért az infravörös spektrumok nagymértékben individuálisak, azaz nincs két különböző vegyület, amelynek azonos IR spektruma lenne. Ezért az infravörös spektrum sokkal egyértelműbben használható azonosítási célokra, mint egyéb fizikai-kémiai tulajdonságok. A Gyógyszerkönyv a legtöbb szerves gyógyszeralapanyag ún. „Elsődleges” azonosság vizsgálati között előírja a bevizsgálandó készítmény és a megfelelő kémiai referencia-anyag (CRS) infravörös spektrumának összehasonlító vizsgálatát.

A rotációs spektrumok a távoli infravörös illetve a mikrohullámú tartományban jelentkeznek. Ezek a színeképek a közönséges infravörös technikával nem tanulmányozhatók, alkalmazásukkal a mikrohullámú technika foglalkozik.

A rezgési, vagy vibrációs színekép a spektrum 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} hullámszám tartományban, az ún. „*analitikai*” infravörös tartományban jelenik meg. A rotációs színeképekhez viszonyítva a rezgési (vibrációs) tartomány kisebb hullámhosszak felé történő eltolódás tükrözi, hogy a rezgési energiák a rotációs energiáknál nagyságrendekkel nagyobbak (**III-13. táblázat**).

A közepes (vagy analitikai) infravörös tartomány a vegyérték és a deformációs rezgések tartománya. A spektrumok két jellegzetesen különböző részletre bonthatók:

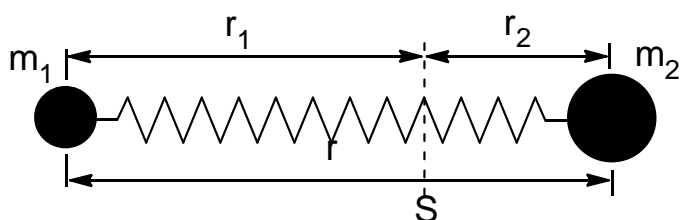
1. A *vegyértékrezgések tartománya* ($4000\text{ cm}^{-1} - 1500\text{ cm}^{-1}$), ahol jellegzetes funkciós csoportok rezgései jelennek meg. Ez a tartomány elsősorban nem magára a vegyületre, hanem a vegyületben található funkciós csoportokra jellemző.
2. Az ún. „*ujjlenyomat*” *tartomány* ($1500\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$), ahol az adott vegyületre jellemző, egyedi, deformációs rezgések jelennek meg.

A rezgő mozgás során a molekulát alkotó atomok egyensúlyi helyzetük körül rezgéseket végeznek, miközben a molekula tömegközéppontja helyben marad. A rezgés akkor jár elektromágneses sugárenergia abszorpciójával, ha rezgés közben megváltozik a molekula dipólusmomentumának valamelyik komponense.

Egy N atomból álló molekulának $N-6$ (lineáris molekula esetén $N-5$) független rezgése van. Ez abból következik, hogy minden atom a tér három irányába mozoghat szabadon. Ebből le kell számítani a teljes molekula együttes elmozdulását (3 irány) és elfordulását (3 irány, de lineáris molekula esetén – az atomok által meghatározott egyenes szerinti elfordulás kiesésével – csak 2 irány). A független rezgéseket *normálrezgéseknek* nevezzük. A normálrezgések során az egész molekula ugyanazzal a frekvenciával rezeg, ezt a frekvenciát nevezzük *normálfrekvenciának*.

A vegyértékrezgések szemléletes leírására megfelelő lehet a kétatomos molekulamodell. Kétatomos molekulák esetén a legegyszerűbb feltevés, hogy mindkét atom a mási felé, vagy attól eltávolodva mozog, egyszerű harmonikus mozgással. Más szóval, az egyensúlyi helyzettől való eltávolodás az idő szinuszos függvénye. A két pontnak ez a mozgása visszavezethető egyetlen tömegpontnak (amely a kétatomos rendszer redukált tömege - μ) az egyensúlyi helyzete körüli harmonikus rezgő mozgására. Így jutunk a harmonikus oszcillátor modelljéhez, amelynek törvényszerűségei jó közelítéssel leírják a kétatomos molekulák rezgési színekeit.

III-41. ábra: A harmonikus oszcillátor modellje



S: súlypont; r_1 , r_2 : a súlyponttól való távolságok

A harmonikus oszcillátor (**III-41. ábra**) rezgésekor a μ tömegű pontra az egyensúlyi helyzettől való távolsággal arányos F visszatérítő erő hat:

$$F = -k \cdot x$$

ahol

k = erőállandó

A harmonikus oszcillátor jellemző adata a rezgésszám (frekvencia), ami a klasszikus mechanika szerint a következő képlettel adható meg:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

ahol

k = erőállandó

μ = redukált tömeg

A redukált tömeg az m_1 és m_2 tömegek értékeiből a következőképpen számítható:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

A harmonikus oszcillátorra jellemző frekvencia (ν) helyett könnyen kiszámolhatjuk az infravörös spektroszkópiában használatos hullámszám (ν^*) értékét:

$$\nu^* = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

ahol

c = a vákuumban mért fénysebesség

Az összefüggésből kvantitatíve kitűnik, hogy a harmonikus oszcillátor rezgési frekvenciája annál nagyobb, minél nagyobb a rugó erőkonstansa – vagyis minél erősebb a rugó – és minél kisebb a redukált tömeg, illetve a golyók tömege. Kéttomos molekulára ezt úgy fogalmazhatjuk, hogy a molekularezgés annál nagyobb frekvenciájú, minél erősebb a két atom közötti kémiai kötés és minél kisebb a rezgő mozgást végző atomok tömege. Az erőkonstans tehát a kémiai kötés erősségét, a kötésrendet fejezi ki. Nagysága egyszeres kötés esetén 4-6 newton/cm közt lehet. Kétszeres kötés esetén 8-12 newton/cm közé eshet, vagyis a kétszeresére nőhet, háromszoros kötésnél pedig 12-18 newton/cm közti értéket vehet fel, ami háromszoros növekedésnek felel meg. Ha az összefüggésben szereplő konstansokat behelyettesítjük:

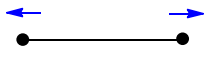
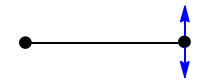
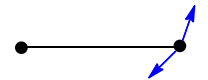
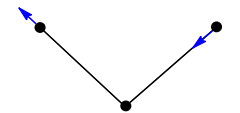
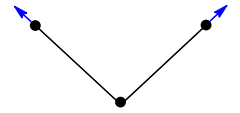

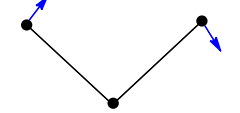

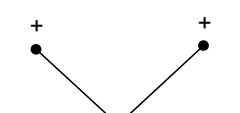
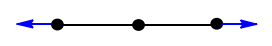
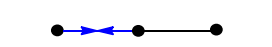
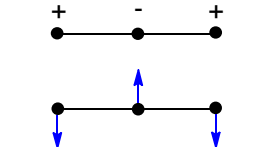
$$\nu^* = 1303 \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad [\text{cm}^{-1}]$$

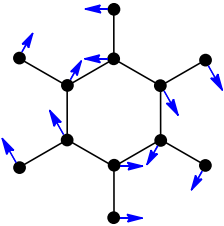
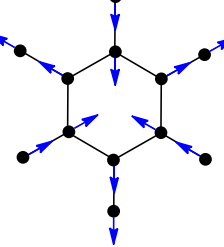
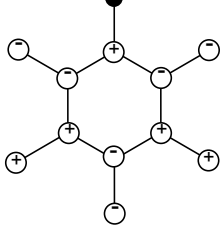
akkor kvantitatíve is követhetjük, hogyan alakul az infravörös abszorpció hullámszáma a kötésrendnek, valamint a rezgő atompár tömegének a változásával.

A normálrezgéseket első közelítésben két nagy csoportba sorolhatjuk: az egyik típus esetén az atomok a vegyértékkötés irányában mozdulnak el, így a kötéstávolságok periodikusan csökkennek, illetve nőnek. Ezeket a rezgéseket *vegyértékrezgések*nek nevezzük. A másik csoportba sorolható – ún. *deformációsrezgések* során a kötési szögek változnak periodikusan.

Mint a vegyértékrezgéseknek, mint a deformációs rezgéseknek több típusa lehetséges. Jelölésükre többféle rendszer alakult ki, de egyik sem vált általánosan elfogadottá. A Holly Sándor és Sohár Pál által javasolt jelölésrendszer logikus, áttekinthető. A legfontosabb rezgéstípusok bemutatását és Holly és Sohár által javasolt jelölését a **III-14. táblázat** foglalja össze.

III-14 táblázat:

| Csoport | Rezgéstípus | Elnevezés | Jelölés |
|---------------------------------|---|---|--|
| XY |  | Vegyértékrezgés | ν_{XY} , $\nu(=XY)$, $\nu_{X\equiv Y}$ |
| |  | Síkdeformációs rezgés | β_{XY} , $\beta(=XY)$ |
| |  | Síkra merőleges deformációs rezgés | γ_{XY} , $\gamma(=XY)$ |
| | | X – Y deformációs rezgés (ha nincs kitüntetett sík) | δ_{XY} |
| Nem lineáris XY ₂ |  | Aszimmetrikus vegyértékrezgés | $\nu_{as}XY_2$, $\nu_{as}(=XY_2)$ |
| |  | Szimmetrikus vegyértékrezgés | ν_sXY_2 , $\nu_s(=XY_2)$ |
| |  | Ollózó, szimmetrikus síkban deformációs rezgés (scissoring) | β_sXY_2 , $\beta_s(=XY_2)$ |
| |  | Kaszáló, aszimmetrikus síkban deformációs rezgés (rocking) | $\beta_{as}XY_2$, $\beta_{as}(=XY_2)$ |
| |  | Torziós, aszimmetrikus síkra merőleges deformációs rezgés (twisting) | $\gamma_{as}XY_2$ |
| |  | Bólogató, szimmetrikus síkra merőleges deformációs rezgés (wagging) | γ_sXY_2 , $\gamma_s(=XY_2)$ |
| Lineáris XY ₂ |  | Szimmetrikus vegyértékrezgés | ν_sYXY , $\nu_sY=X=Y$ |
| |  | Aszimmetrikus vegyértékrezgés | $\nu_{as}YXY$, $\nu_{as}Y=X=Y$ |
| |  | Elfajult deformációs rezgés (nincs kitüntetett sík) | δ_{YXY} , $\delta_{Y=X=Y}$ |

| Csoport | Rezgéstípus | Elnevezés | Jelölés |
|---|--|---|---|
| Gyűrűs vegyületek néhány jellemző rezgésmódja |  | Váz vegyértékrezgés | ν_{asCC} β_{asCC} γ_{asCC} |
| |  | A gyűrű síkjában végbemenő deformációs rezgés | Ezeket nem jelölik külön szimbólumokkal, hanem azt a kötéstípust tüntetik fel, amelynek rezgéscharaktere elsősorban (esetleg kizárólagosan) érvényesül benne. |
| |  | A gyűrű síkjára merőleges deformációs rezgés | |

III.19.2 Gyakorlati spektroszkópia

III.19.2.1 FT IR technika előnyei

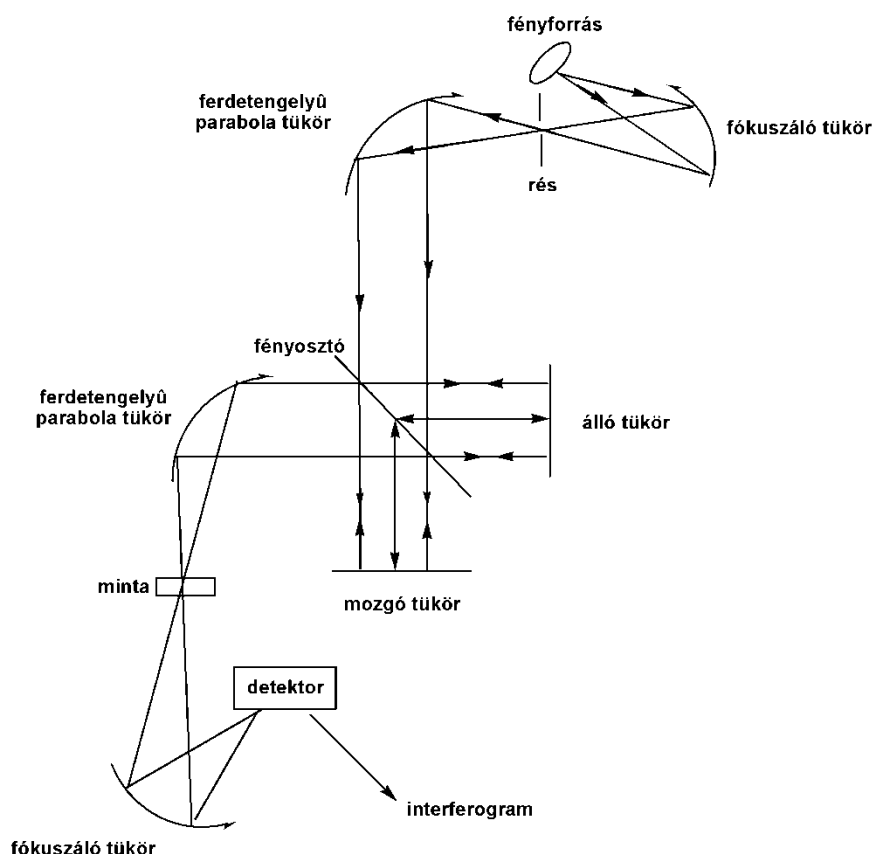
Általában a gyógyszerészi gyakorlatban a $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ terjedő ún. közép (analitikai) IR (medium IR: MIR) tartományt használjuk. A mai IR spektroszkópiái gyakorlatban csupán Fourier transzformációs – azaz FT IR – készülékek használatosak. Ezek számos előnyt kínálnak a régebben használt diszperziós készülékekkel szemben. Egyrészt itt a teljes frekvenciatartományban szimultán mérünk, ez igen nagy javulást ad a fontos jel/zaj viszonyban. Másrészt itt nincs rés, ami a fényerőt csökkentené, ezért a mérés érzékenysége igen megnő. Ezen felül a készülékekben lehetséges a fénysugarat egy bizonyos frekvenciával (amplitúdó moduláció) szaggatni, ami a szórt fényt minimalizálja. Végül a hullámszám-stabilitása meglehetősen jó, mivel ez a He-Ne lézer interferenciájából számítható (belső kalibráció). Ezen kívül a felbontóképesség igen megnő a diszperziós módszerhez képest. A spektrális felbontás igen jó (lehet $0,5\text{ cm}^{-1}$ is). Gyors mérési idő (30 sec) alatt kapunk értékelhető spektrumot. A mintaszükséglet igen csekély, $0,5\text{ mg}$ -ból tudunk spektrumot felvenni. Végül a módszer a számítógép segítségével lehetővé teszi a spektrumok szerkesztését (alapvonal korrekció, spektrumok összeadása, kivonása, tárolása, spektrumkönyvtár használata valamint spektrumok összehasonlítása).

III.19.2.2 A készülék működési elve

A készülék legfontosabb része az ún. Michelson féle interferométer. (III-42. ábra). A fényforrásból a sugárzás tükrök segítségével jut a fényosztóra, amely két részre osztja. Egyik rész átmegy rajta, a másik visszaverődik. Mindkettő egy tükröt ér el – mozgó és álló tükrő. A mozgó tükröt éri el az áteresztett fény, amely egyenes sebességgel

mozog, az állót a visszavert. A mozgó tükör maximális elmozdulása csak centimétereket jelent; a mozgató motor az egyetlen mozgó alkatrésze a spektrométernek. A két tükör a fénysugarakat visszaveri és ezek interferálnak a fényszóron. A tükör mozgása miatt a két fénysugár között út- és intenzitás különbség van. A sugárzás átjut a mintán és végül eléri a detektort. A kapott jel egy interferogram (a sugárzás intenzitása az útkülönbség függvényében).

III-42. ábra: Fourier transzformációs Michelson interferométeres IR spektrofotométer felépítése



A készülék egy He-Ne lézert is tartalmaz, ami biztosítja a hullámhossz skála pontosságát. A FT IR spektrométert számítógép vezérli. Az interferogramból Fourier transzformáció után keletkezik az egysugaras IR spektrum. A minta és a referencia spektrumából (a minta spektrumát pontonként elosztva a háttérrel) kapjuk a számítógép révén automatikusan a kétsugaras transzmittancia IR spektrumot, valamint a reciproklógaritmusából kapjuk az abszorbancia spektrumot.

III.19.2.3 Optikai anyagok (KBr, NaCl, KRS-5)

Ezek alatt a spektrométerekben használt lencsék, ill. prizmák értendők, de ugyancsak fontosak a folyadék- és gáz-felvételi technikában használt küvetta ablakok, valamint a szendvics felvételekhez alkalmazandó ablakok.

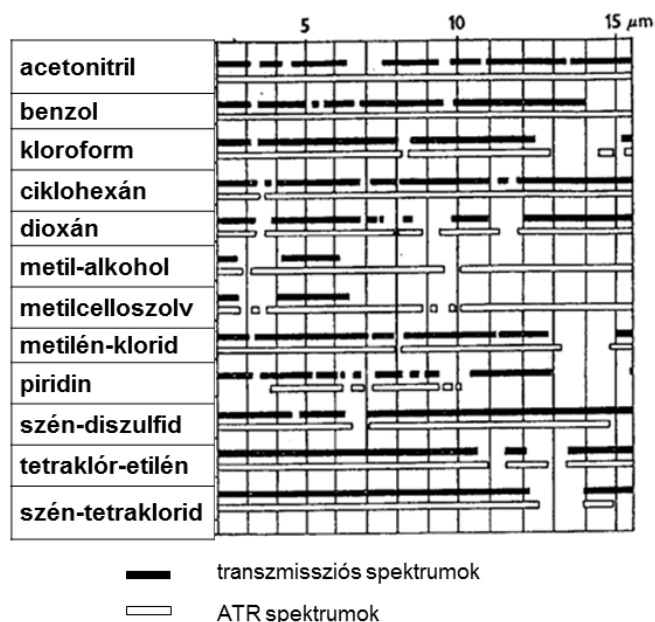
Ezek jellemzője, hogy az infravörös sugárzást átengedik, de a mechanikai szilárdságuk nem nagy és vízben oldódnak. Ezt a küvettnél feltétlenül figyelembe kell venni. A nátrium-kloridra és a kálium-bromidra ez mind érvényes, az utóbbi vízben rosszabbul oldódik és jobb mechanikai tulajdonságú, kevésbé törékeny. Optikai

tulajdonságai is jobbak – az IR tartomány alacsonyabb frekvenciánál jobban átereszt, hátránya a magasabb ára. Ezen kívül a KRS-5 név alatt használt tallium-jodid-bromidot kell említeni. Ennek előnye, hogy vízben nem oldódik, azonban lúgos oldatokra érzékeny, nagy a törésmutatója – ez nagy ún. reflexiós veszteséget jelent. Ezért is alkalmazzák az ATR (attenuated total reflexion technikában, lásd később). Nagy hátránya azonban, hogy igen toxikus!

III.19.2.4 Oldószerek

Az oldószerekkel szemben számos követelményt várunk el. Így jól kell oldaniuk a mintát, nem reagálhatnak vele, vagy a küvetta anyagával, spektroszkópiai tisztaságúak legyenek (ez rendszerint magas árat is jelent!) és optikailag megfelelők, azaz az IR tartományban áteresztők (III-43. ábra).

III-43. ábra: Az FT IR spektroszkópiában leggyakrabban használt oldószerek értékelhető színektartománya



Egyik oldószer sem felel meg ezeknek a feltételeknek teljesen. Az oldószerek elnyelését kompenzálni kell. Ha az oldószer elnyelése nagy egy bizonyos spektrális tartományban, akkor a minta saját sávjai nem láthatóak. Másrészt az oldószer a mintával kölcsönhatásba kerülve más elnyelést mutat. A Fourier technika lehetővé teszi, hogy az oldószer spektrumát kivonjuk a minta spektrumából. Így azonban ún. álmaximumokat kaphatunk a kölcsönhatások miatt. Ez a legkevésbé érvényes a CCl_4 és a CS_2 oldószerekre, amelyek ideális apoláris – a mintával nem kölcsönhatásba lépő – oldószerek. Sajnos a CCl_4 nagy hátránya, hogy igen mérgező és sokkal rosszabb oldószer, mint a kloroform.

III.19.2.5 Felvételi technikák

1. Szilárd anyagok

a.) *KBr sajtolási technika*

Ez a technika az egyik legelterjedtebb a gyógyszervizsgálatban is, noha az ATR módszer is egyre teret hódít. A módszer igen kis mennyiségű (0,5mg) mintát igényel, melyet KBr-dal, mint mátrixszal keverünk. A KBr jó minőségű (Merck KBr), melyet előtte 105 °C-on kiszárítunk, exikátorban hűtünk le és ott tároljuk. A KBr pasztilla készítéséhez 300 mg KBr-ot elegyítünk a fenti minta mennyiségével és ezt achátmozsárban a mintával eldörzsöljük. Ezt egy acélgyűrűbe öntjük, majd nagy vákuummal eltávolítjuk a levegőt. Ezután hidraulikus préssel igen nagy nyomáson (8 t/cm²) átlátszó pasztillává sajtoljuk a port. A kapott rendszer egy szilárd oldat, az összehasonlító – ugyancsak egy KBr pasztilla – amely nem tartalmaz mintát. A pasztilla nem használható, ha szabad szemmel vizsgálva áttetszősége nem egyenletes, vagy ha 2000 cm⁻¹ (5µm) környékén – amennyiben a vizsgálandó anyagnak itt nincs karakterisztikus abszorpciós sávja – kompenzáció nélkül mért transzmittanciája, ha nincs más előírás kisebb, mint 75%.

A módszer hátránya, hogy lehetőség van polimorf átalakulásra már a porítás során, ahol a polimorfok abszorpciója eltérő.

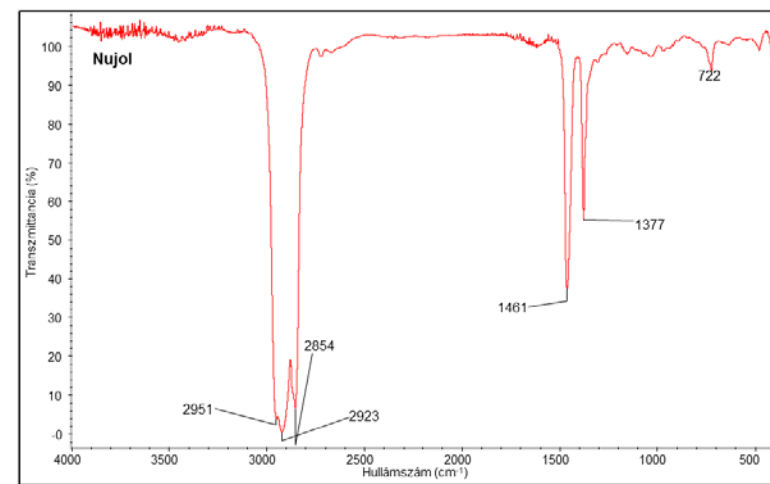
A KBr víztartalma ma az FT IR spektrométerek korában kevesebb problémát okoz, mivel azt a minta spektrumából kivonhatjuk. Ugyancsak problémát jelenthet a KBr víztartalma akkor, ha az nagy nyomáson kémiai reakciót indít el. Ezen felül maga a KBr is mint ionos vegyület nagy nyomáson bizonyos reakciókra hajlamos.

b.) *Filmképzés a megolvasztott szilárd anyagból KBr vagy NaCl lemezek között (vagy oldatból)*

Olvadékfilmet készíthetünk alacsony olvadáspontú anyagokból. Ezekből kis mennyiséget az óvatosan előre felmelegített ablakra – KBr vagy NaCl – olvasztunk és egy másik ablakkal összenyomva hűl ki a rendszer. Hasonlóan oldatból is készíthetünk filmet, ha az oldatot egy KBr ablakra cseppentjük fel, majd az oldószert elpárologtatjuk.

c.) *Szuszpenziós vagy mull technika*

Ennél a technikánál a mintát paraffin olajban (nujol: C₂₀₋₃₀ paraffin elegy) szuszpendáljuk el. (A minta 1-2 mg-ját achátmozsárban elporítjuk és pár csepp nujollal eldörzsöljük. Ezt a szuszpenziót egy KBr ablakra kenjük és egy másik ablakkal fedjük le.) Így a KBr pasztillánál a nagy nyomáson lejátszódó reakciókat elkerüljük, de a minta CH sávjait zavarják a nujol CH abszorpciós sávjai (**III-44. ábra**).

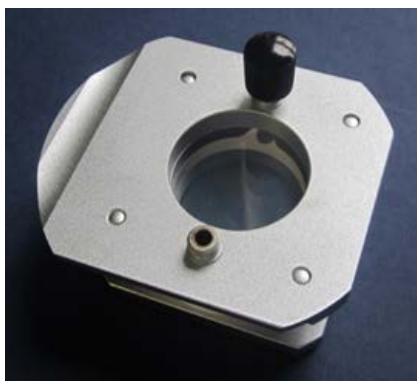
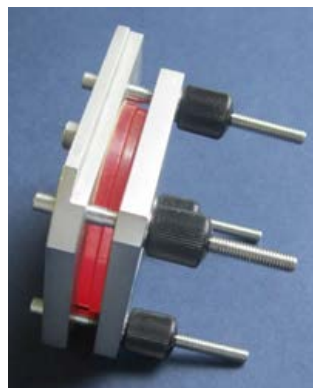
III-44. ábra: Nujol FT IR spektruma

Mintaelőkészítés – A szilárd anyagok esetén ez főleg szárítást jelent. A Gyógyszerkönyv előírása szerinti hőmérsékleten, azaz szobahőmérsékleten exikkátorban vagy magasabb hőmérsékleten fűthető csöexikkátorban.

2. Folyadékok és oldatok

A folyadékok felvételénél két lehetőségünk van. Nagyobb mennyiségű folyadéknál küvetát alkalmazunk, ennek rétegvastagsága lehet csupán néhány századmilliméter. A küvetta lehet szétszedhető vagy fix. Kevésbé illékony folyadéknál szétszedhető folyadék-küvetát (**III-45. ábra**) használunk. Előnye, hogy gyorsan, egyszerűen összeszerelhető, szétszedhető és tisztítható. Ezzel szemben pontossága rosszabb, mint a fix küvettáé.

A fix küvetákat használjuk az illékonyabb oldószerek esetén, mert ezek a rétegvastagságot igen pontosan tartják szemben a szétszedhető küvetákkal. A folyadék-küvetta megtöltése fecskendővel történik buborékmentesen. Hasonlóan fecskendővel végezzük a tisztítást is.

III-45. ábra: Folyadék-küvetta**III-46. ábra:** KRS-5 szendvics

Szendvicsfelvételek – Abban az esetben, ha a rétegvastagság nem fontos, vagy a minta mennyisége kevés, akkor két infra-áteresztő ablak – véglap (pl. KBr ablak) – között is felvehetjük a spektrumot. Az egyikre egy-két csepp folyadékot csepegtetünk és egy másik ablakkal buborékmentesen lezárjuk. (Ha a két ablak között levegőbuborék van,

akkor a spektrum nem használható!) Ez kb. egy 10-20 μm vastagságú réteget ad (**III-46. ábra**).

Az oldatfelvételeknek különleges jelentőségük van az intermolekuláris kölcsönhatások tanulmányozásában. A szilárd mintát különböző polaritású oldószerekben vizsgálva az intermolekuláris kölcsönhatások megszűnnek, míg az intramolekulárisak megmaradnak.

3. Gázfelvételek

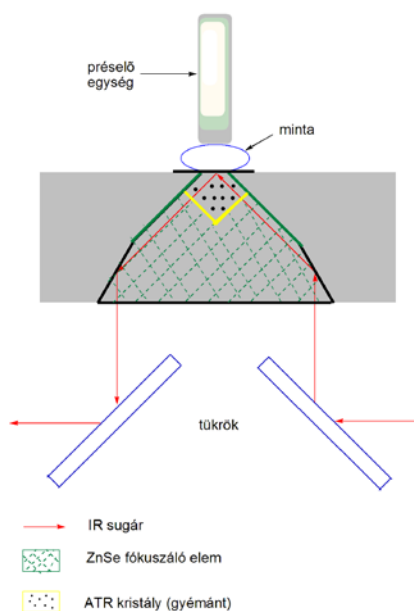
A gázok felvételénél hengeres falú gázküvetákat alkalmazunk, melyeknek ablakai – véglapok – IR áteresztőek (**III-47. ábra**). Ezek hossza változó (10 cm-től változik, de a nagyon hosszú küvetta nem alkalmazható a spektrométerekben.) A gázanalízisben az eredményeket befolyásolják az egyéb paraméterek: nyomás, az atmoszférikus CO_2 és nedvesség tartalom, stb. A küveták csappal vannak ellátva. A küvetát evakuáljuk, majd – a vizsgálandó gázt tartalmazó tartály és a küvetta közé megfelelő vezetékkel iktatva – a zárócsapon vagy a túszelepen át a kívánt nyomásra töltjük. Ha szükséges, a légköri nyomást a cellában infravörös-áteresztő gázzal (pl. R nitrogén vagy R argon) állítjuk be. A víz, a szén-dioxid, vagy az egyéb légköri gázok zavaró abszorpciójának elkerülése érdekében az összehasonlító gázküvetát evakuáljuk és infravörös-áteresztőgázzal töltjük meg.

III-47. ábra: Gázküvetta



4. Felületek vizsgálati módszerei Gyengített teljes reflexió (attenuated total reflexion = ATR v. multiple internal reflexion = MIR) technika

Az IR fény egy nagy IR törésmutatójú prizmán megy át. (Anyaga lehet KRS-5, ZnSe, ZnS, Ge, stb., **III-48. ábra**). A fénysugarak az 1. fázisból érkezik a 2. fázis határfelületére és a beesési szögük nagyobb, mint a határszög. Így a fázishatáron teljes reflexiót szenvednek. A többszörös teljes reflexió megsokszorozza az abszorpciót. A többszörös visszaverődés révén nő a módszer érzékenysége is. A spektrumok hasonlítanak a normál transzmissziós spektrumokra, noha részben más mechanizmussal jönnek létre. A módszer előnye, hogy nincs mintaelőkészítés, a minta visszanyerhető, vizes oldatok is vizsgálhatók, azonban gyengébbek a spektrumok, mint a transzmissziósak.

III-48. ábra: ATR egység

A mintát egy gyémántcella préseli hozzá a prizmaého ZnSe. Ezt "golden gate" egységnek nevezik, mivel a fény útja a nevezetes híd alakjához hasonlít. A gyógyszerészi analitikában a módszernek egyre nagyobb jelentősége van, alkalmazzák a felületek vizsgálatára – krém formában használt gyógyszerek tubusainál, rostoknál, kenőcsöknél, bevonatoknál, stb.

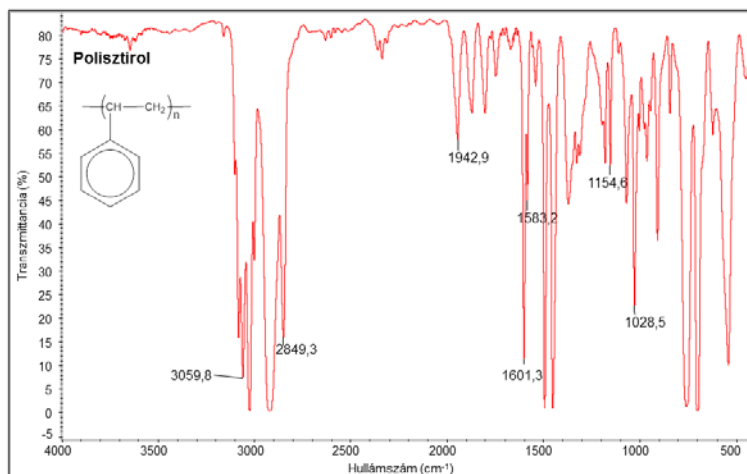
III.19.2.6 Az FT IR készülék kalibrálása. A hullámszám-skála hitelesítése

A hullámszám skála hitelesítését valamint a felbontóképesség ellenőrzését rendszeresen el kell végeznünk. A Gyógyszerkönyv előírása szerint a hullámszám-skálát polisztirol fóliával hitelesítjük. Háttérként a levegő spektrumát vesszük fel, majd a polisztirol fóliát helyezzük a fényútba és felvesszük ennek a spektrumát. A spektrum alapvonal korrekcióját elvégezzük. A polisztirol spektrumának a gyógyszerkönyv által megadott sávjainak transzmissziós minimumait, (abszorpciós maximumait) tüntetjük fel a lenti táblázatban (**III-15. táblázat**). Az aktuálisan mért értékeknek a megadott tűrésen belül kell megegyezniük a táblázatban szereplő értékekkel (**III-49. ábra**).

III-15 táblázat: Polisztirol-film transzmittancia minimumai az elfogadható tűréshatárokkal (Ph. Hg. VIII.)

| Hullámszám (cm^{-1}) | Tűréshatár |
|------------------------------------|--------------------------------|
| 3060,0 | ($\pm 1,5$) cm^{-1} |
| 2849,5 | ($\pm 1,5$) cm^{-1} |
| 1942,9 | ($\pm 1,5$) cm^{-1} |
| 1601,2 | ($\pm 1,0$) cm^{-1} |
| 1583,0 | ($\pm 1,0$) cm^{-1} |
| 1154,5 | ($\pm 1,0$) cm^{-1} |
| 1028,3 | ($\pm 1,0$) cm^{-1} |

III-49. ábra: Polisztirol film FT IR spektruma a hullámszám-skála hitelesítéséhez kellő sávokkal

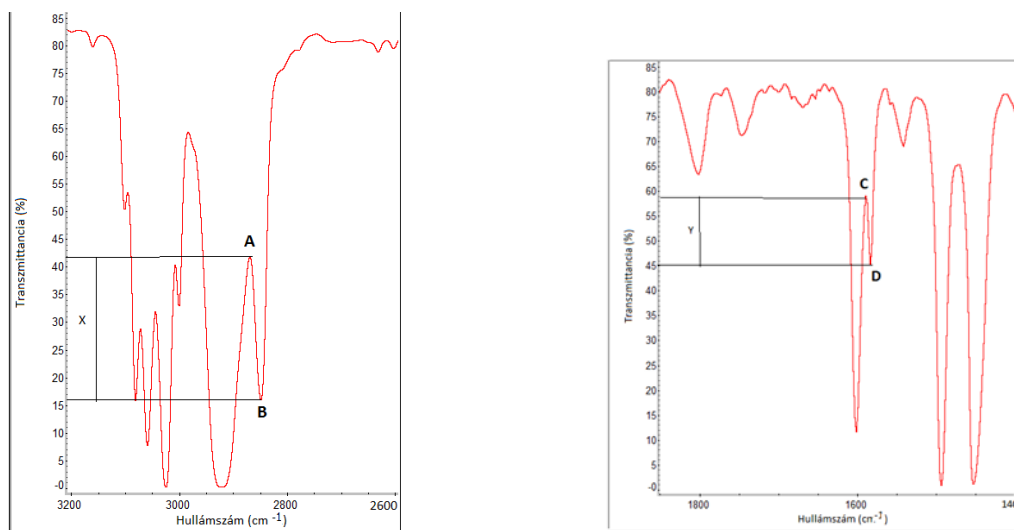


A Gyógyszerkönyv a vizsgálandó anyag és a referencia felvételénél még a következő kívánalmakkal él. A referencia és a vizsgálandó anyag spektrumának összehasonlításánál 3 polisztirol sávot (2849,5 cm⁻¹, 1601,2 cm⁻¹, 1028,3 cm⁻¹) a vizsgálandó anyag spektrumára kell igazítani és úgy összehasonlítani őket. (A hullámszám-skála 0,5%-án belül kell a vizsgálandó és a referencia spektrumának megegyeznie.) Ezen felül a sávok relatív méretének is meg kell egyeznie.

A felbontóképesség ellenőrzése

A Gyógyszerkönyv előírása szerint a vizsgálatához az előzőekben említett polisztirol fóliát alkalmazzuk. Az előzőekben leírt módon felvett polisztirol IR spektrumával dolgozunk. A Gyógyszerkönyv előírása szerint a 2870 cm⁻¹-nél található transzmissziós maximumon (A) és a 2849,5 cm⁻¹-en mért transzmissziós minimumon (B) mért százalékban megadott transzmittanciák különbsége nagyobb legyen, mint 18 (III-50. ábra; x távolság).

Emellett az 1589 cm⁻¹-nél lévő transzmissziós maximumon (C) és az 1583 cm⁻¹-nél lévő transzmissziós minimumon (D) mért százalékban megadott transzmittanciák különbsége nagyobb legyen, mint 12 (III-50. ábra; y távolság).

III-50. ábra: A felbontóképesség ellenőrzése (polisztirol film spektrum részletei)**III.19.2.7 Mennyiségi meghatározások IR spektrofotometriával**

Ezek fizikai alapja a *Lambert-Beer törvény*:

$$E = \lg I_0/I = \varepsilon c l$$

ahol

E = extinkció vagy abszorbancia

I_0 = beeső fény intenzitása

I = áthaladó fény intenzitása

c = koncentráció (g/cm³)

ε = extinkciós vagy abszorpciós koefficiens (cm²/g)

l = rétegvastagság (cm).

A módszer meglehetősen hullámszám függő. Az eredményes méréshez találnunk kell egy maximumot, ahol intenzív és szelektív abszorpció van, nincs átfedés más elnyelésekkel. Előnye, hogy több komponens egymás mellett mérhető gyors roncsolás mentes módon. Azonban az IR kvantitatív méréseket megnehezíti, hogy a spektrumok igen sok esetleg átfedő sávot tartalmaznak, ezért 3-4 komponensnél több összetevőt nem vizsgálhatunk. Az abszorpciós sávok intenzitása széles határok között változik, az érzékenységre nem tudunk általános adatot megadni. A mérési körülményeket standardizálnunk kell, az elérhető pontosság széles határokon belül változik (0,01-10%), mivel igen sok paraméter befolyásolja. A mérési módszerünk lehet az ún. base-line (alapvonal) módszer, amikor az elegyben a kísérőanyagok háttérabszorpcióját az alapvonal szerkesztésével küszöböljük ki. Használhatunk egy standard anyagot kalibrációs sorozatként, amely az elegyünk komponense, vagy egy belső standardot, amely egy intenzív elnyelésű inert, független anyag.


III.19.2.8 Karakterisztikus rezgési frekvenciák

A következő fejezetben a FT IR spektrumok értékeléséhez szükséges táblázatokat adjuk meg irodalmi források alapján. Ezen munkában felhasználjuk a karakterisztikus frekvenciákat (maximumokat), ezek intenzitását, valamint a sávok alakját. A táblázatokban a lényegesebb, intenzívebb sávokat adjuk meg, a kevésbé lényeges, gyengébb sávokat zárójelben találjuk (III-16-24. táblázat).


III-16 táblázat: Telített szénhidrogének jellemző IR maximumai

| Csoport | Rezgéstípus | Elnyelés (cm^{-1}) | helye | Megjegyzés |
|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------|---|
| —CH ₃ | $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ | 2960 | } | keskeny, intenzív; ν_{as} erősebb, mint ν_{s} |
| | $\nu_{\text{s}} \text{CH}_3$ | 2870 | | |
| | $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ | 1460 | } | közepesen keskeny, középerős; δ_{as} erősebb, mint δ_{s} |
| | $\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$ | 1380 | | |
| —CH ₂ — | $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ | 2925 | } | mint $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ és $\nu_{\text{s}} \text{CH}_3$ |
| | $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ | 2850 | | |
| | $\beta_{\text{s}} \text{CH}_2$ | 1470 | } | keskeny; közepes erősségű kissé széles; középestől erősig változó |
| | $\beta_{\text{as}} \text{CH}_2$ | 720 | | |

III-17 táblázat: Telítetlen szénhidrogének jellemző IR maximumai

| Csoport | Rezgéstípus | Elnyelés (cm^{-1}) | helye | Megjegyzés |
|---|------------------------------------|----------------------------------|-------|---|
| =CH ₂ | $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ | 3080 | } | éles; néha több, középerős sáv |
| | $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ | 2975 | | |
|  | $\nu \text{C}=\text{C}$ | 1680 – 1640 | | keskeny; intenzitása változó |
| =CH ₂ | $\beta_{\text{s}} (= \text{CH}_2)$ | 1420 – 1400 | | néha két sáv, változó intenzitással |
| =CH— | $\gamma (= \text{CH})$ | 990 és 910 | | közepes szélességű, rendszerint nagy intenzitású sávok |
| =CH ₂ | $\gamma (= \text{CH}_2)$ | | | |
| —C≡C | $\nu (\text{—CH})$ | 3450 – 3300 | | többnyire keskeny; gyenge |
| | $\nu \text{C}\equiv\text{C}$ | 2300 – 2100 | | keskeny; erőssége szimmetriafüggő |

III-18 táblázat: Aromás szénhidrogének jellemző IR maximumai

| Csoport | Rezgéstípus | Elnyelés helye (cm ⁻¹) | Megjegyzés |
|---|-----------------------------------|--|--|
|  | v CH | 3100 – 3000 | középerős; többnyire multipllett |
| | felhangok és kombinációs rezgések | 2000 – 1600 | gyenge; kisintenzitású sávrendszer |
| | v CC aromás | 1600 (1580) és | erős; keskeny, a sávok intenzitása (abszolút és relatív) változó |
| | vázvegyérték rezgés | 1500 (1450) | |
| | γ CC | 710 – 690 | erős; éles |
| γ (=CH) | 900 – 730 | erős; éles, a szubsztitúcióra jellemző sávok | |

III-19 táblázat: Alkoholok és fenolok jellemző IR elnyelése

| Csoport | Rezgéstípus | Elnyelés helye (cm ⁻¹) | Megjegyzés |
|---------|---------------------------------------|------------------------------------|---|
| –OH | vOH | 3650 – 2500 | az asszociáció fokától függ |
| | vOH „monomer” OH-sáv | 3650 – 3590 | éles; változó erősségű, primer, szekunder, tercier és fenolos OH némileg eltérő |
| | vOH „dimer” OH-sáv | 3550 – 3450 | széles; változó erősségű |
| | vOH „polimer” OH-sáv | 3400 – 3220 | igen széles; erős |
| | vOH intramolekuláris hidrogénhidkötés | 3600 – 3450 | a dimernél élesebb |
| | vOH kelátokban | 3200 – 2500 | széles |
| | v C–O(H) | 1230 – 1000 | erős |
| | primer –O(H) | 1050 | |
| | szekunder –O(H) | 1100 | |
| | tercier –O(H) | 1150 | |

Az asszociáció meglehetősen befolyásolja az OH-vegyületek IR elnyelését (monomer, dimer és polimer OH sávok), valamint az alkoholok rendűsége is befolyásolja a monomer sávot. Intermolekuláris H-hidak jelenlétét oldatspektrumok (apoláros oldószert, pl. kloroformot, felhasználva készítünk hígítási sorozatot) felvételével tudjuk tanulmányozni. Intermolekuláris H-hidak a hígítással megszűnnek és a polimer sávból először dimer, majd monomer keletkezik. Ezt a dimer és polimer abszorpciós maximumok fokozatos intenzitáscsökkenése (eltűnése) és a monomer sáv intenzitás növekedése kíséri. Intramolekuláris H-hidat létesítő csoportok IR maximumai a hígítással nem változnak. A minták nedvességtartalmának elnyelése 3600 - 3100 cm⁻¹ között van.

III-20 táblázat: Karbonil vegyületek IR abszorpciója (ν_{CO} sávok)

| Csoport | Elnyelés helye (cm^{-1}) | Megjegyzés |
|--|--|--|
| Ketonok $\begin{array}{c} \text{—C—} \\ \\ \text{O} \end{array}$ | 1715 | nyílt láncú, konjugálatlan ketonok |
| α, β – telítetlen keton | 1675 | |
| Ar—C— $\begin{array}{c} \\ \text{O} \end{array}$ | 1690 | |
| Ar—C—Ar $\begin{array}{c} \\ \text{O} \end{array}$ | 1665 | |
| ciklohexanonok ciklopentanonok | 1715 1745 | |
| Aldehidek $\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{—C—} \\ \\ \text{H} \end{array}$ | 1725 | (gyenge sáv 2820 – 2720 cm^{-1} között, dublet, ν_{CH}) |
| α, β – telítetlen aldehid | 1685 | |
| Ar—CHO | 1700 | |
| Karbonsavak —COOH | 1760 1710 | monomer dimer |
| ν_{OH} sávok monomer | 3550 | éles |
| ciklusos dimer | 3400 – 2400 | |
| R—COO^- karboxilátok | 1625 – 1500 1410 – 1300 | $\nu_{\text{as}} \text{CO}_2^-$ erős $\nu_{\text{s}} \text{CO}_2^-$ közepes |
| $\text{R—COOR}'$ észterek | 1750 – 1720 | konjugálatlan |
| konjugált észterek | 1730 – 1710 | |
| aromás észterek | 1720 | |
| δ – laktonok | 1735 | |
| γ – laktonok | 1770 | |

Karbonilvegyületek IR abszorpcióját befolyásoló tényezők

Az IR maximumokat sok tényező változtathatja. Így a fizikai állapot ($\text{CO}_{\text{gőz}}$ > $\text{CO}_{\text{folyadék}}$), a szomszédos atomcsoportok hatása ($-I$ effektussal bíró csoportok növelik a frekvenciát, míg a N mezomer effektusa csökkenti, ld. például a karbonsav-kloridok és az amidok példáját).

A konjugáció egy szomszédos $\text{C}=\text{C}$ -vel vagy aromás gyűrűvel kb. 20-30 cm^{-1} csökkenést okoz, míg a sáv intenzitása nő. Ezen felül a gyűrűfeszülés frekvencianövelő hatású. Az asszociáció ugyancsak befolyásolja a maximumokat (20-30 cm^{-1} csökkenést okoz a szabad $\text{C}=\text{O}$ -hoz képest).

III-21 táblázat: Aminok IR abszorpciója

| Csoport | Elnyelés helye (cm ⁻¹) | Megjegyzés |
|---|------------------------------------|---|
| R-NH ₂ primer amin | 3500 – 3300 (monomer) | νNH ₂ (2 sáv távolsága 100 cm ⁻¹), erős |
| $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{N}-\text{R} \end{array}$ szekunder amin | 3350 – 3310 | νNH, gyenge |
| $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{N}-\text{Ar} \end{array}$ és $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{Ar}-\text{N}-\text{Ar} \end{array}$ | 3450 – 3400 | νNH, gyenge |
| —NH_3^+ | 3000 és 2000 „ammóniumsáv” | ν NH ₃ ⁺ , erős, széles és igen gyenge sáv |
| $\begin{array}{c} + \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ | 2700 – 2250 „ammóniumsáv” | ν NH ₂ ⁺ , erős, széles (duplett) |
| $\begin{array}{c} + \\ \\ \text{NH} \end{array}$ | 2700 – 2250 „ammóniumsáv” | ν NH ⁺ , közép-erős, széles |
| =NH_2^+ | 2500 – 2300 „ammóniumsáv” | ν NH ₂ ⁺ , közép-erős, lehet több sáv |
| R-C=NH iminek | 1650 – 1600 | ν C=N, közép-erős |

III-22 táblázat: Amidok IR abszorpciója

| Csoport | Elnyelés helye (cm ⁻¹) | | Megjegyzés |
|---|------------------------------------|---------------------------|------------------|
| Amidok | Monomer (két sáv) 3500, 3400 | asszociált 3350 – 3200 | νNH ₂ |
| $\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{R}-\text{C} \\ \backslash \\ \text{NH}_2 \end{array}$ | 1690 | 1650 | amid I sáv |
| primer | 1600 | 1640 | amid II sáv |
| $\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{R}-\text{C} \\ \backslash \\ \text{NHR}' \end{array}$ | 3440 | 3300 3070 | νNH |
| szekunder | 1680 | 1655 | amid I |
| | 1530 | 1550 | amid II |
| $\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{R}-\text{C} \\ \backslash \\ \text{N} \begin{array}{l} \text{R}' \\ \text{R}'' \end{array} \end{array}$ | 1650 | 1650 | amid I |
| tercier | | | |
| Laktámok | | | |
| δ – laktámok | 1670 (monomer) | | amid I |
| γ – laktámok | 1700 (monomer) | | amid I |
| Karbamidok | 1660 | | amid I |

III-23 táblázat: Nitrogén- és oxigéntartalmú vegyületek IR abszorpciója

| Csoport | Elnyelés helye (cm ⁻¹) | Megjegyzés |
|----------------------|------------------------------------|--|
| R–NO ₂ | 1590 – 1530 | v _{as} NO ₂ , erős |
| alifás nitrovegyület | 1385 – 1340 | v _s NO ₂ |
| Ar–NO ₂ | 1530 – 1500 | v _{as} NO ₂ , erős |
| | 1370 – 1330 | v _s NO ₂ , erős |
| R O NO ₂ | 1660 – 1610 | v _{as} NO ₂ , erős |
| nitrátok | 1290 – 1250 | v _s NO ₂ , erős |

III-24 táblázat: Kéntartalmú vegyületek IR abszorpciója

| Csoport | Elnyelés helye (cm ⁻¹) | Megjegyzés |
|--|------------------------------------|--|
| R–S–H | 2600 – 2550 | v SH, gyenge |
| tioketonok, tiokarbamidok, tioészterek | 1220 – 1050 | vC=S erős, a szubsztituensek a v C=O-hoz hasonlóan befolyásolják |
| R–SO ₃ H | 1350 – 1340 | v _{as} SO ₂ erős |
| vízmentes szulfonsav | 1170 – 1150 | v _s SO ₂ erős |
| R–SO ₃ H | 1250 – 1120 | v _{as} SO ₂ erős |
| szulfonsav hidrátok és sók | 1080 – 1010 | v _s SO ₂ közepes |
| R–SO ₂ –N< | 1370 – 1310 | v _{as} SO ₂ erős |
| | 1180 – 1140 | v _s SO ₂ erős |

III.19.2.9 Azonosítás referenciaanyagok segítségével

Az FT IR spektrumok felhasználása a gyógyszeranalitikai munkában széleskörű.

A gyógyszerkészítésben, a természetes anyagok izolálásában szerkezet felderítésre, ezenkívül metabolitok kutatására, valamint toxikológiai vizsgálatokra, hatóanyag-segédanyag kölcsönhatás, gyógyszerkioldódás, polimorfia és stabilitás tanulmányozására is alkalmazzák ezt a módszert. Jelen fejezetben a gyógyszeralapanyagok vizsgálatánál szükséges azonossági vizsgálatot ismertetjük, amely igen sok esetben FT IR módszert alkalmaz.

A Gyógyszerkönyv a referenciaanyagok segítségével elvégzendő azonosítás körülményeit az alábbiak szerint írja elő:

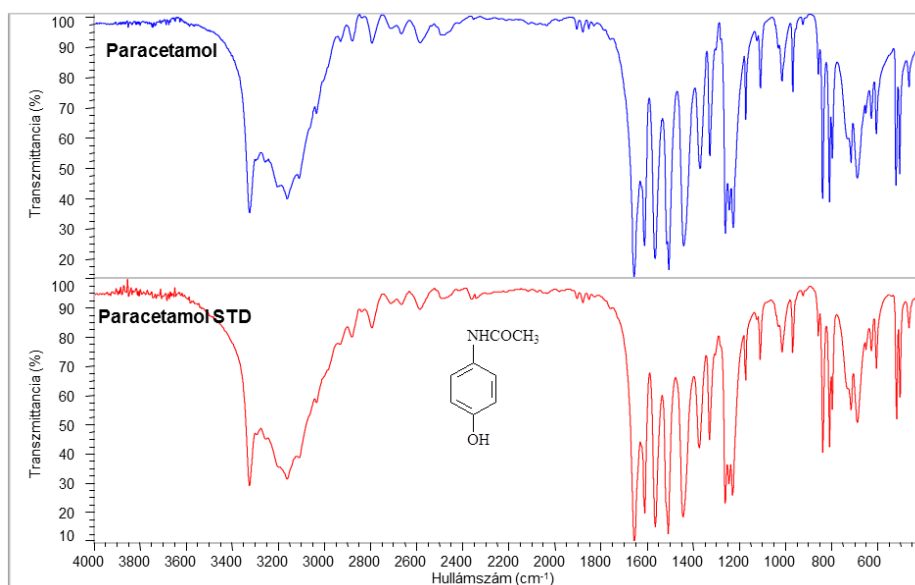
A vizsgálandó anyagot és a referenciaanyagot azonos módon készítjük elő, és a 4000-670 cm⁻¹ tartományban azonos mérési körülmények között felvesszük a spektrumokat. A vizsgálandó anyag spektruma – a transzmissziós maximumok helye és relatív mérete tekintetében – egyezzen meg a referenciaanyag (CRS) spektrumával. (A „CRS” rövidítés *Chemical Reference Standard*) az Európai Gyógyszerkönyvi Bizottság által elfogadott *Kémiai Referenciaanyagok*at jelöli.)

Ha a szilárd halmazállapotú anyagok spektrumaiban a transzmissziós maximumok helye eltér egymástól, akkor mind a vizsgálandó anyagot, mind a referenciaanyagot azonos módon kell kezelni, hogy azonos módosulatban kristályosodjanak vagy

jelenjenek meg, illetve a cikkelyben leírtak szerint kell eljárni, és a spektrumokat ismételtelen fel kell venni.

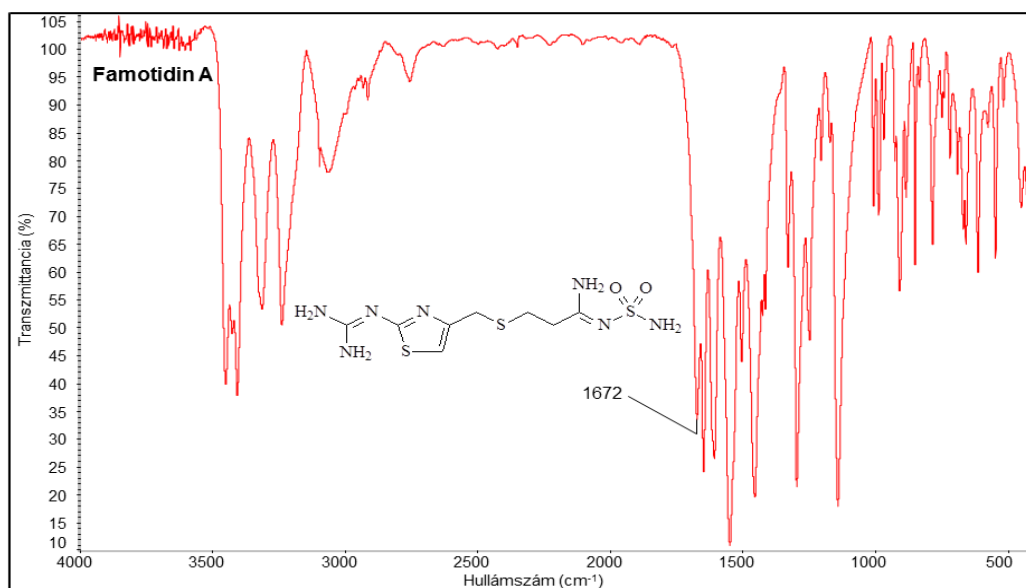
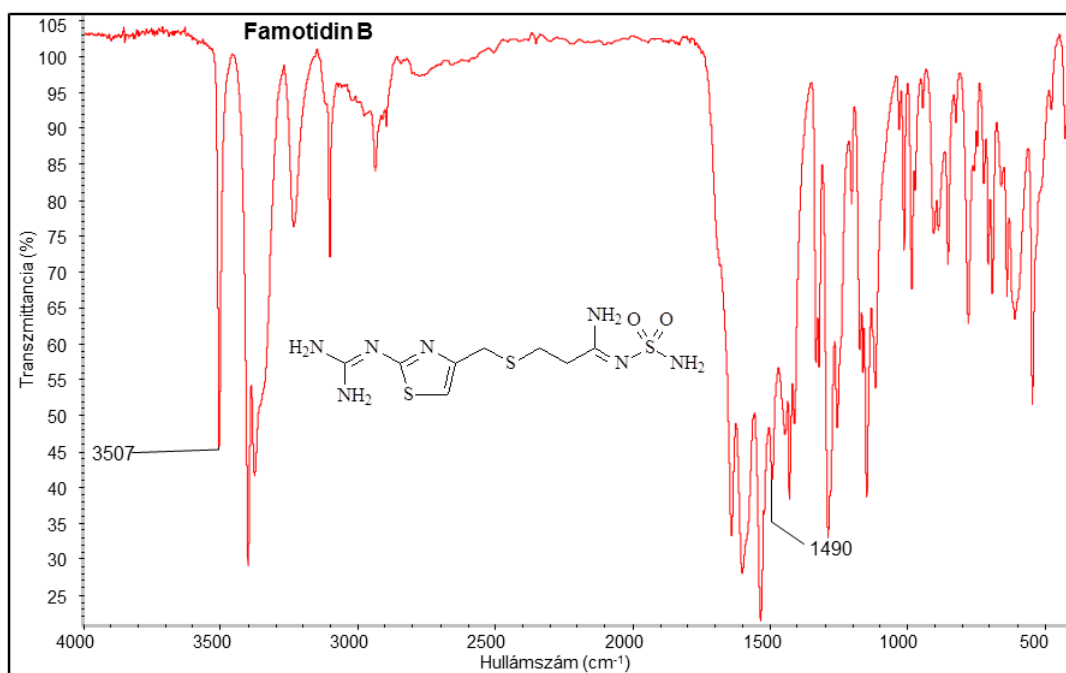
A vizsgálandó anyag és a referenciaanyag spektrumait a teljes spektrális tartományban összehasonlítjuk a referencia spektrumával. A software a két spektrum közti azonosságot %-ban adja meg (match %). A szilárd minták esetén általában a 95%-os azonosság esetén elfogadható a minta. A folyadékoknál a 90-95 % körüli egyezés már elfogadható (**III-51. ábra**). Egyes esetekben a referenciaspektrum jellemző transzmissziós minimumait adják meg, és a minta megfelelő minimumainak ezekkel a kísérleti hibák határain belül kell megegyezni.

III-51. ábra: Paracetamol minta és referenciaanyag (STD) FT IR spektruma.
Hasonlóság: 99,74%



III.19.2.10 Polimorfia vizsgálata

A polimorfíát a famotidin hatóanyag példáján mutatjuk be. Ez a vegyület két kristályformában nyerhető a kristályosítás módszerétől függően - vizet használva oldószerként, valamint oldószertől függően (Az "A" forma acetonitrilből, a "B" forma metanolból kristályosodik ki.) Az "A" formánál létezik egy extra maximum 1672 cm⁻¹-nél. Ez nem található meg a "B" formánál, míg a 3506 és 1490 cm⁻¹ sávok nem találhatóak meg az "A" formában. A két polimorf szerkezetében a tiazolgyűrű oldalláncának konformációjában van különbség (**III-52-53. ábra**). A két polimorf közül a termodinamikailag stabilabb az "A", míg a kinetikailag stabilabb a "B".

III-52. ábra: Famotidin „A” polimorf FT IR spektruma**III-53. ábra:** Famotidin „B” polimorf FT IR spektruma

Feladat: Szerkezetigazolás – néhány a spektrumgyűjteményben szereplő anyagok példáján

A szerkezetigazolás azt jelenti, hogy van egy feltételezett molekulaszervezet, amit alá akarunk támasztani. (A szerkezet meghatározásnál ezzel szemben nem tudjuk a molekula szerkezetét.)

Ebben a munkában felhasználjuk a spektrumatlazok táblázatait, azaz ún. karakterisztikus frekvenciákat-, maximumokat, ezek intenzitását valamint a sávok alakját. Természetesen le kell szögezni, hogy egy FT IR spektrum nem elégséges a

szerkezetigazoláshoz sem, hanem több módszer (^1H NMR, ^{13}C NMR, MS, UV és FT IR) eredményét alkalmazzuk. Ezen felül a szerves kémiai reakciókat FT IR spektrumokkal is követni tudjuk.

A következőkben ismertetendő spektrumgyűjteményben a legjellemzőbb és legbiztosabban asszignálható sávokat adtuk meg. Az áttekinthetőség is ugyancsak egy szempont, ezen gyűjtemény bemutatásánál. Emellett az ujjlenyomat-tartományban kevés sávot adtunk meg, mivel itt a pontos asszignáció igen nehéz.

1. Szalicilsav (X-1, X-8. ábra)

A spektrum jellegzetes sávja a 3239 cm^{-1} -nél a relatíve éles νOH vegyértékrezgéshez rendelhető (asszociált) sáv, de találunk még asszociált széles νOH sávokat 2600 cm^{-1} körül is. Az aromás gyűrű νCH rezgéseire több gyenge sáv rendelhető (pl. 3065 cm^{-1} -nél). A COOH csoporthoz tartozó νCO rezgés a legintenzívebb sáv a spektrumban 1658 cm^{-1} -nél (konjugált CO asszociálva).

A spektrum igen erős sávjai az aromás vázvegyérték-rezgések (1612 , 1579 , 1484 és 1445 cm^{-1}), ugyancsak jellegzetes sáv az OH csoporthoz tartozó $\nu\text{C-O(H)}$ sáv (1249 cm^{-1}).

2. Acetilszalicilsav (X-2, X-9. ábra)

Az acetilszalicilsav spektrumában szemben a kiindulási szalicilsavval eltűnik az éles νOH vegyértékrezgés, csak a széles asszociált OH sávok maradnak meg (2800 – 3300 cm^{-1}). A molekula két karbonilcsoportot tartalmaz, ezért két νCO frekvenciát találunk (1754 cm^{-1} észter és 1691 cm^{-1} konjugált karbonsav). A spektrumban igen intenzív sávokként jelentkeznek az aromás vázvegyérték-rezgések. Az észterekre jellemző sáv, a spektrumban a legerősebb, a $\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}$ rezgéshez rendelhető (1188 cm^{-1}).

3. Etinilösztadiol (X-3, X-10. ábra)

A spektrum egyik legintenzívebb sávja az asszociált νOH sáv (3400 cm^{-1}). A molekula jellegzetes része az etinilcsoport νCH rezgése, amely igen éles és intenzív sávot ad 3292 cm^{-1} -nél. A molekula szénvázának nagy részét a CH_2 csoportok teszik ki, ezért a $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ sávok és $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ is igen intenzívek (2937 és 2926 cm^{-1}), a szimmetrikus rezgések gyengébbek és a $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$ rezgéssel együtt találhatóak (2866 cm^{-1}). Az egyetlen aromás gyűrű νCH rezgése is jól felismerhető a spektrumban (3027 cm^{-1} körül). Az aromás vázvegyérték-rezgések, ha gyengébben ugyan, de megtalálhatóak (1587 és 1498 cm^{-1}).

4. Fenilbutazon (X-4, X-11. ábra)

A vegyület nem tartalmaz OH vagy NH csoportot, de a KBr víztartalmát mutatja a 3400 – 3600 cm^{-1} -nél lévő sáv. A két aromás gyűrűnek megfelelően jól kivehető az aromás $\nu(\text{CH})$ vegyérték-rezgések (2959 cm^{-1}). A viszonylag hosszú alkil láncnak megfelelően a $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ és $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ rezgések jól kivehetőek (2959 és 2929 cm^{-1}), a megfelelő metil rezgésekből $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$ észlelhető (2873 cm^{-1}). A karbonil sávok felhasadnak és egy intenzív dublet jelet kapunk 1717 és 1752 cm^{-1} -nél. Az aromás vázvegyérték-rezgések ugyancsak jellemző sávjai a spektrumnak.

5. Folsav (X-5, X-12. ábra)

A komplex molekulának megfelelően a spektrum is összetettebb. A vegyületben található több OH, NH ill. NH_2 csoportnak megfelelően a spektrumban egy éles νOH sáv (3549 cm^{-1}) valamint az NH_2 csoportokra jellemző dublett jelentkezik (3417 , 3324 cm^{-1}). Ezen felül az asszociált NH (és OH) csoportok szignáljai is megtalálhatóak igen széles sávokként (3131 és 2200 – 2600 cm^{-1}). A folsavban a két különböző típusú karbonil csoport közül a magasabb frekvenciánál találjuk a konjugálatlan savhoz rendelhető νCO rezgést (1694 cm^{-1}), míg az amid I sáv 1640 cm^{-1} -nél található a

spektrumban. Az aromás ill. heteroaromás gyűrűknek megfelelően két erős aromás vázvegyérték-rezgést találunk (1607 és 1485 cm^{-1}) a spektrumban.

6. Hidrokortizon (X-6, X-13. ábra)

A bonyolult szteroid molekula spektruma is igen összetett. A három különböző típusú OH csoport νOH sávja nem különül el, egy viszonylag éles, de asszociált sáv jelentkezik 3433 cm^{-1} -nél. A molekula nagy részét teszik az alifás metil- és metilén-csoportok. Így középérős sávokat találunk (2970 , 2934 és 2913 cm^{-1} -nél $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ és $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$), míg a gyengébb $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$ és $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ sávok 2879 cm^{-1} -nél találhatóak. A két keto-csoportból a konjugálatlan endociklusos keton jele 1713 és 1707 cm^{-1} -nél van, míg a konjugált endociklusos ketofunkció 1644 cm^{-1} -nél jelentkezik, mint a spektrum legerősebb jele. A konjugált C=C-hez rendelhető $\nu\text{C}=\text{C}$ 1611 cm^{-1} -nél ad jelet.

7. Szulfadimidin (X-7, X-14. ábra)

A viszonylag bonyolultabb molekula spektruma sávokban gazdag. A molekula NH_2 csoportját egy dublet jelzi, ahol a sávok 100 cm^{-1} távolságban vannak egymástól (νNH_2 3343 és 3332 cm^{-1}), valamint megtalálható egy asszociált νNH sáv is 3237 cm^{-1} -nél. Az aromás vázvegyérték-rezgések közül kettőt tudunk itt azonosítani (1640 és 1596 cm^{-1} -nél), a többi kevésbé intenzív. A molekula jellemző funkciós csoportja a szulfonamidcsoport két sávja eléggé biztonsággal asszignálható az ujjlenyomat-tartományban (1303 és 1147 cm^{-1} -nél).

III.19.2.11 Spektrumgyűjtemény

Ld. melléklet (X-1.)

IV Kromatográfia

IV.1 A kromatográfia alapjai

IV.1.1 Bevezetés

A kromatográfias elválasztási technikák soklépéses elválasztási módszerek, amelyeknél a minta komponensei két fázis, az álló- és a mozgófázis között oszlanak meg.

A „kromatográfia” elnevezés a görög „kromatosz” (=szín) szóból származik annak nyomán, hogy *Mihail Szemjonovics Cvet* orosz botanikus 1903-ban petroléteres növényi pigmenteket tartalmazó extraktumot választott el elsőként egy szemcsés kalcium-karbonáttal töltött üvegcső segítségével, melybe a növényi kivonatot öntve annak különböző alkotói az oszlop mentén színes gyűrűk formájában szétváltak. (A kromatográfia megfelelő detektálással szintelen anyagok elválasztására is alkalmas!) Valamennyi kromatográfias eljárás azon alapul, hogy a vizsgálandó komponenseket tartalmazó mozgófázis és az állófázis között *oldódás* vagy *adszorpció* folytán megoszlási egyensúly jön létre, melyre jellemző megoszlási hányados az egyes komponensekre eltérő lehet.

Ugyanakkor a kromatográfias módszerek közé sorolunk néhány, az említettektől eltérő kölcsönhatásokon alapuló elválasztástechnikai módszert is, melyek alapjául a részecskék töltéskülönbsége, a részecskeméret szerinti elválasztás illetve specifikus biológiai/biokémiai kölcsönhatások szolgálnak (**IV-1. táblázat**).

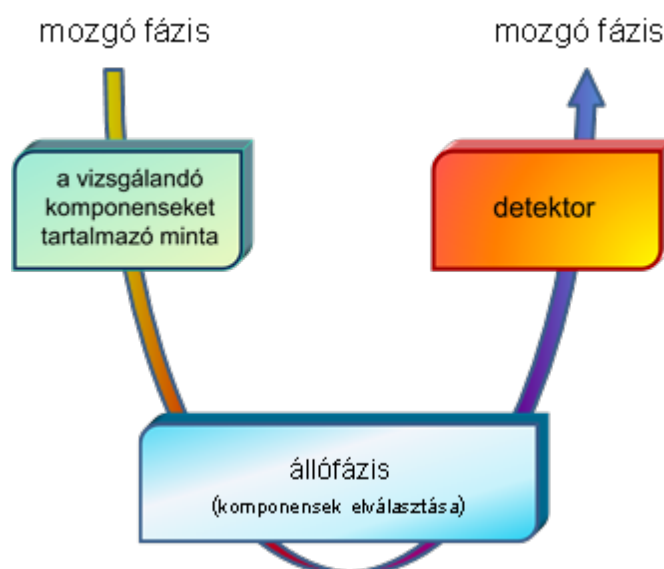
IV-1 táblázat: A kromatográfias módszerek csoportosítása az elválasztandó komponens és a kromatográfias rendszer között kialakuló kölcsönhatás szerint.

| Kölcsönhatás típusa | Elválasztechnikai módszer |
|---|--|
| Adszorpció | Papírkromatográfia (PC) Vékonyréteg kromatográfia (VRK, TLC) Gázkromatográfia (GC) Nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia (HPLC) Szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC) |
| Megoszlás | Gázkromatográfia (GC) Nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia (HPLC) Szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC) |
| Méretkizárás | Méretkizárásos kromatográfia (SEC) (→ Gélszűrés, Gélpermeációs kromatográfia) |
| Ioncsere | Ioncserés kromatográfia (IEC) |
| Specifikus biológiai/ biokémiai kölcsönhatás | Affinitás kromatográfia (AC) |
| Sztereo-kémiai kölcsönhatás | Királis kromatográfia |

A kromatográfiai módszer állófázisa lehet szilárd vagy folyadék (szilárd vagy géles hordozón), amely lehet oszlopba töltve, lemezre kenve vagy filmként szétterítve stb. A mozgófázis lehet gáz, folyadék vagy szuperkritikus fluid halmazállapotú. A technikai kivitelezéstől függően beszélhetünk oszlopkromatográfiáról (egydimenziós) vagy planáris (kétdimenziós) kromatográfiáról.

A mozgófázisban a komponensek eltérő sebességgel haladnak, így egymástól elválnak. Minél erősebb a vizsgálandó komponens kölcsönhatása az állófázissal, az annál lassabban képes együtt haladni a mozgófázissal, ugyanis az állófázisnak visszatartása (retenciója) van. Az állófázis végén/fölött elhelyezett érzékelő (detektor) jelzi a komponenseket valamely fizikai vagy kémiai tulajdonságuk mérésével (**IV-1. ábra**). A detektor által előállított jel kiértékelése teszi lehetővé az elválasztott komponensek *minőségi* és *mennyiségi* analizisét.

IV-1. ábra: A kromatográfia elve



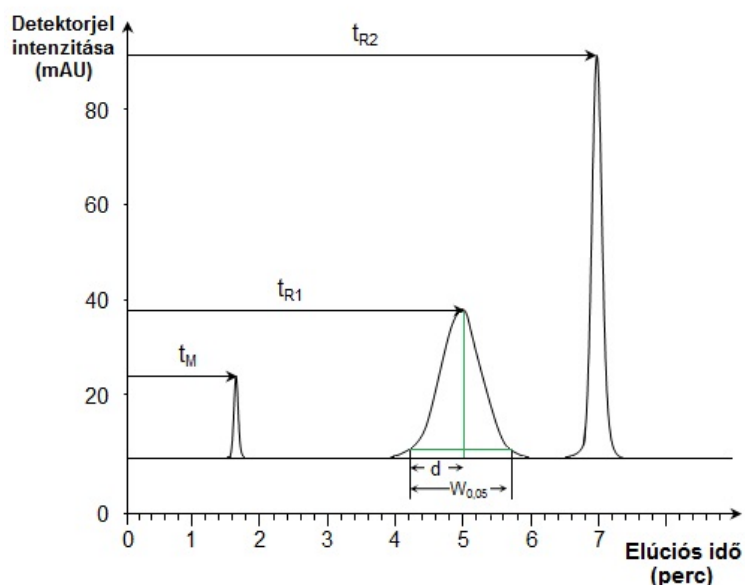
IV.1.2 Kromatográfiai jellemzők

IV.1.2.1 Retenció adatok

Kromatogram

Oszlopkromatográfia esetén az oszlopról (kolonnáról) eluálódó komponensek detektorjelének idő-függvénye, a mintakomponenseket reprezentáló csúcissorozat. Ideális esetben a kromatogramot az alapvonalon egymást követő Gauss-görbe alakú csúcsok (normális eloszlás) alkotják (**IV-2. ábra**).

IV-2. ábra: Komponenspár elválasztásának jellemzése

**Retenciós idő (t_R)**

Az az időtartam, ami a mintabevitel és a vizsgált komponens maximális koncentrációban (csúcsmaximum) való megjelenése között eltelik.

Holtidő (t_M)

Az az idő, ami a mintabevitel és egy vissza nem tartott, de detektálható komponens maximális koncentrációban való megjelenése között eltelik (pl.: káliumnitrát).

Redukált retenciós idő (t'_R)

A retenciós idő és a holtidő különbsége.

$$t'_R = t_R - t_M$$

Tömegmegoszlási arány (D_m), másnéven retenciós faktor (k') vagy kapacitásfaktor

Az adott kromatográfias rendszerben a vizsgált anyagra jellemző érték.

$$D_m = \frac{n_S}{n_M} = K_C \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

ahol

- n_S = az anyag mennyisége az állófázisban,
- n_M = az anyag mennyisége a mozgófázisban,
- K_C = egyensúlyi megoszlási hányados,
- V_S = az állófázis térfogata,
- V_M = mozgófázis térfogata.

$$D_m \text{ vagy } k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Visszatartási (retenciós) faktor (R_f)

A planáris kromatográfiában használt visszatartási faktor a mintafelvitel helyétől a folt közepéig (súlypontjáig) mért távolság és a felvitel helyétől az oldószerfront (mozgófázis) által megtett távolság hányadosa.

$$R_f = \frac{b}{a}$$

ahol

b = a vizsgált komponens által megtett út,
 a = az oldószerfront által megtett út.

Megoszlási hányados (K)

A komponens álló- és mozgófázisban kialakult egyensúlyi koncentrációinak aránya.

$$K = \frac{c_S}{c_M}$$

ahol

c_S = a komponens egyensúlyi koncentrációja az állófázisban,
 c_M = a komponens egyensúlyi koncentrációja a mozgófázisban.

IV.1.2.2 Kromatográfiás adatok

A kromatográfiás csúcsot a csúcs területével (A) vagy magasságával (h) és a csúcs félértékszélességével (w_h), valamint a csúcs két inflexiós pontja között mért szélességgel (w_i) jellemezhetjük (**IV-2. ábra**). Gauss-görbe alakú csúcsok esetén $w_h = 1,18 w_i$

Szimmetriafaktor vagy aszimmetria faktor (A_s)

A kromatogramok különböző okokból létrejövő torzulásainak jellemzésére használjuk. $A_s = 1,0$ érték szimmetrikus (ideális) csúcsot jelez. (Ph. Hg. VIII. követelménye szerint legyen $A_s = 0,8-1,5$ közötti érték.)

Egy csúcs szimmetriafaktorát az alábbi összefüggés alapján számíthatjuk ki:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} = \frac{B}{A}$$

ahol

$w_{0,05}$ = a csúcsmagasság huszadánál mért csúcshélesség,
 d = a csúcsmaximumból az alapvonalra bocsátott merőleges és a csúcs felszálló ága között, a magasság huszadánál mért távolság.

illetve

B = a csúcsmaximumból az alapvonalra bocsátott merőleges és a csúcs leszálló ága között, a magasság tizedénél mért távolság,
 A = a csúcsmaximumból az alapvonalra bocsátott merőleges és a csúcs felszálló ága között, a magasság tizedénél mért távolság.

Látszólagos elméleti tényérszám (N)

A kromatográfiás oszlop olyan elméleti tényérokra osztható, melyek mindegyikére megoszlási egyensúly írható fel. Minden egyes tényér után a fázisok szétválnak és a következő tényéron az újabb érintkezés hatására újabb egyensúly áll be. Az oszlop teljesítményére (látszólagos hatékonyságára) jellemző látszólagos elméleti tényérszámot az alábbi összefüggés alapján számíthatjuk ki:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

IV.1.2.3 Elválasztási adatok**Relatív retenció (r)**

A relatív retenciót az alábbi összefüggés szerint számíthatjuk ki:

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

ahol

t_{R2} = az érintett csúcs retenciós ideje,

t_{R1} = a referenciacsúcs (általában a vizsgálandó anyag csúcsának) retenciós ideje.

Planáris kromatográfiában t_{R2} és t_{R1} helyett R_{f2} és R_{f1} visszatartási faktorokkal számolunk.

Szelektivitás (α)

A kromatográfiás rendszer elválasztóképessége a szelektivitással jellemezhető. A komponensek megoszlását írja le az álló- és a mozgófázis között. Hatékony elválasztás esetén $\alpha > 1$ (IV-3. ábra).

$$\alpha = \frac{K_1}{K_2}$$

ahol

K_1 és K_2 = az elválasztandó komponensek megoszlási hányadosai.

Felbontás (R_s)

A kromatográfiás oszlop hatékonyságának jellemzésére szolgál, a két szomszédos csúcs közötti eltávolodást jellemzi. Analitikai szempontból $R_s > 1,5$ jó elválasztást jelent (IV-3. ábra).

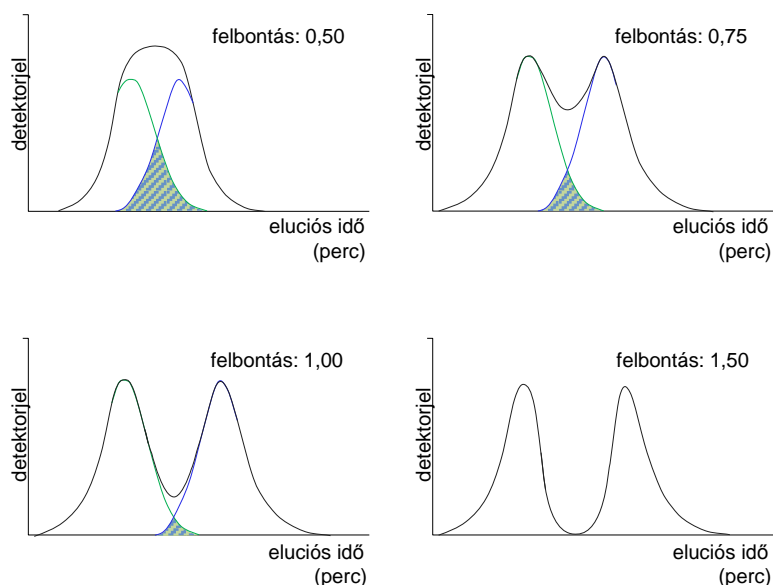
$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

ahol

t_{R1} és t_{R2} = retenciós idők,

w_{h1} és w_{h2} = a csúcsmagasságok felénél mért csúcsszélességek.

IV-3. ábra: A kromatográfiai elválasztás és szelektivitás összefüggése



A van Deemter-függvény

Az elválasztás során az állófázison lejátszódó termodinamikai és kinetikai folyamatok határozzák meg a tányérmagasságot és a sáv szélesedését. A *van Deemter*-egyenlet általánosan használt összefüggés a tányérmagasság leírására (IV-4. ábra).

$$H = A + \frac{B}{U_h} CU_h$$

ahol

H = egy elméleti tányér hossza

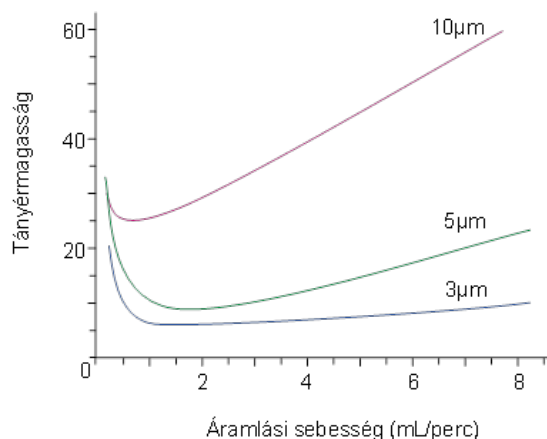
U_h = az eluens lineáris áramlási sebessége,

A = a sokcsatornás hatást jellemző tag,

B/U_h = a szemcsék közötti axiális diffúziót jellemző tag

CU_h = a külső anyagátadási gátlást, a szemcsék pórusaiban zajló diffúziót és az állófázis felületén lejátszódó adszorpciót-deszorpciót jellemző tag.

IV-4. ábra: A van Deemter görbe: 3, 5 és 10 μm szemcseméretű állófázis esetén

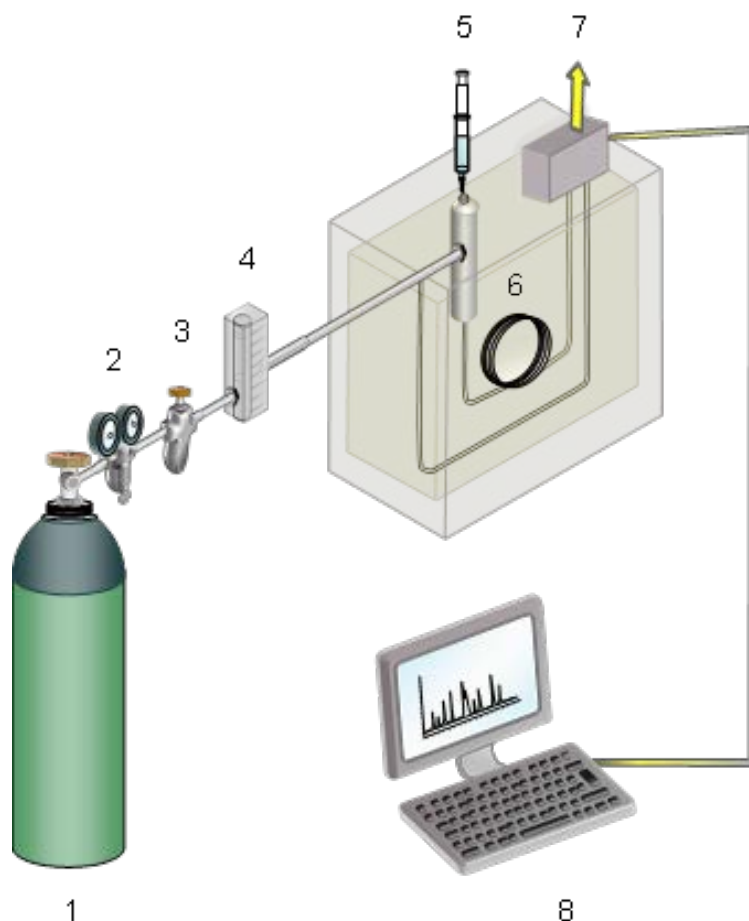


IV.2 Gázkromatográfia

A *gázkromatográfia* (GC) olyan kromatográfiai elválasztási technika, melynek alapja az anyagok megoszlásának különbözősége két, egymással nem elegyedő fázis között. A mozgófázis *gáznemű* anyag (vivőgáz), mely az állófázist tartalmazó oszlopon áramlik keresztül. Az eljárás olyan anyagok, illetve származékaik esetében alkalmazható, melyek az alkalmazott hőmérsékleten elpárolognak. A mintát, amely szobahőmérsékleten leggyakrabban folyadék, hirtelen elpárologtatva juttatjuk a kolonnára, melyet olyan hőmérsékletre melegítünk, hogy a minta az analízis teljes időtartama alatt gáz-/gőz-halmazállapotú legyen. A meghatározást állandó hőmérsékleten vagy adott hőmérsékletprogram szerint végezzük. A vivőgáz szabályozott áramlási sebességgel vagy nyomással áramlik át előbb az oszlopon, majd a detektoron (**IV-5. ábra**).

A gázkromatográfiai elválasztás *adszorpciós*, *megoszlásos* vagy *méretkizárásos* folyamatokon alapul.

IV-5. ábra: A gázkromatográf felépítése



(1-gázpalack; 2-reduktor; 3-áramlás és nyomásszabályozó egység; 4-gáztisztító; 5-mintabemérő egység; 6-kolonna; 7-detektor; 8-jelfeldolgozó)

IV.2.1 Vivőgázok (mozgófázisok)

A gázkromatográfiai mérés során a vivőgáz megválasztása elsősorban az alkalmazott detektortól függ. Hővezető képesség mérésen alapuló detektálásnál *hidrogén-* vagy *héliumgáz* alkalmazható, lángionizációs detektor használata esetén *nitrogén-* vagy *argongáz* a megfelelő.



A vivőgáz nagynyomású palackból nyomáscsökkentőn és tisztítón keresztül jut a készülékbe.

IV.2.2 Kromatográfiai oszlopok (kolonnák, állófázisok)

A gázkromatográf kromatográfiai elválasztást végző része az oszlop, másnéven kolonna, amely a kromatográf belsejében, egy fűthető térben helyezkedik el. Típusát tekintve az oszlop lehet *kapilláris* oszlop és *töltött* oszlop (IV-6. ábra).

A kapilláris kolonna igen vékony kvarccső, melynek belső falát *megosztófolyadék* vonja be. A töltött oszlop üvegből vagy fémből készül, megfelelő szemcseméretű porózus polimert vagy megosztófolyadékkal impregnált szilárd adszorbenst (hordozót) tartalmaz.

IV-6. ábra: A kapilláris és a töltött oszlopok összehasonlítása

| | Kapilláris kolonna | Töltött kolonna |
|----------------|---|--|
| |  |  |
| | vékony folyadékfilm | kis szemcseméretű szilárd hordozó |
| hosszúság: | 5 - 100 m | 1 - 6 m |
| belső átmérő: | 0,1 - 0,52 mm | 2 - 4 mm |
| filmvastagság: | 0,1 - 7,0 μm | 1 - 10 μm |
| kapacitás: | 50 μg | 10 μg |

A gázkromatográfiában alkalmazott *szilárd adszorbensekkel* szemben támasztott követelmény jelent az egyenletes szemcseméret, a kellő mechanikai szilárdság és a nagy fajlagos felület. Anyagát tekintve jó adszorbens lehet az aktív szén, az alumínium-oxid, a szilikagél illetve néhány szerves polimer (pl.: sztírol-divinil-benzol, akrilsav-poliészter, stb.).

Az elválasztásban döntő szerepet tölt be az a folyadékfilm, mely a kapilláris oszlop belső falát illetve a hordozó szemcsék felületét bevonja. Ezt a folyadékfilmet *megosztófolyadéknak* nevezzük. A megosztófolyadékok legtöbbje makromolekuláris anyag, melyek igen nagy hőstabilitással rendelkeznek.

Napjainkban döntően megosztószilárd gázkromatográfiai állófázisok vannak alkalmazásban.

Poláros mintakomponensek esetén poláros, *polietilén-glikol* (Carbowax) típusú megosztófolyadék használható, hőtűrésük maximum 200 °C. Apoláros anyagok elválasztására *szilikon* fázisú (leggyakrabban poli-dimetil-sziloxán) megosztófolyadék alkalmazása jelent megfelelő megoldást. A –Si–O–Si–O– szerkezethez kapcsolódó különböző funkciós csoportok (pl.: metil-, fenil-, cianocsoport, stb.) arányának változtatásával a polaritás széles skálán belül változtatható. A legtöbb szilikon állófázis 300-350 °C-ig hőtűrő.

IV.2.3 Mintabevitel (Injektálás)

A gázkromatográfias mintaadagolás során igen fontos, hogy a minta bejuttatása pillanatszerű legyen. Ha a minta folyékony halmazállapotú, közvetlenül a bejuttatást követően gáz-halmazállapotúvá kell váljon. Ennek eléréséhez kis térfogatú (mindössze néhány µl) minta adagolása szükséges, az injektor folyamatos termosztálása mellett.

IV.2.3.1 Közvetlen injektálás

A közvetlen injektálás az oldatok injektálásának szokásos módszere. Töltött oszlop esetén a mintabevitel megoldható közvetlenül az oszlop elejére történő úgynevezett *on-column* injektálással. Kapilláris kolonna használatakor azonban mintaáram-elosztásos *split* technikát alkalmazhatunk, mely során a minta egy elpárologtató kamrán keresztül a mintaáram-elosztóhoz kapcsolódik, ahol jelentős hányada lefűvődik, így kb. 1%-a jut csak az oszlopra.

IV.2.3.2 Gőztérinjektálás (head space)

IV.2.3.2.1 Dinamikus gőztérinjektálás (*purge and trap*)

Az injektorrendszer olyan eszközt tartalmaz, amely az oldat illékony komponenseit egy alacsony hőmérsékletű adszorbens oszlopra fűjja (sparging device). Az adszorbens oszlop gyors felfűtésével a visszatartott komponensek deszorbeálódnak és a mozgó fázisba jutnak.

IV.2.3.2.2 Statikus gőztérinjektálás

Az injektorrendszer termosztált mintafűtő kamrát tartalmaz, melyben a szilárd vagy folyadék halmazállapotú mintákat tartalmazó lezárt üvegcsék adott, a folyadék illetve szilárd fázis és a gőzfázis közti egyensúly beállításához szükséges ideig tartózkodnak. Az egyensúly beállása után az üvegcsé gőzterének előzetesen meghatározott része a gázkromatográfba öblítődik.

IV.2.3.3 Detektorok

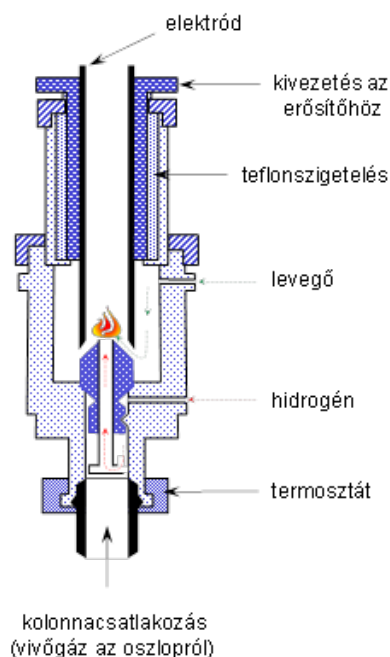
A kromatográfias oszlopon elválasztott komponenseket a vivőgáz a detektorba juttatja, amely koncentrációjukkal arányos elektromos jelet ad. A minta komponenseinek közös kémiai vagy fizikai sajátága, mellyel a vivőgáz nem rendelkezik, alkalmas a minta detektálására.

IV.2.3.3.1 Lángionizációs detektor (FID)

Az egyik leggyakrabban és sokoldalúan alkalmazott nagyon érzékeny detektor típus a lángionizációs detektor, ami egy hidrogén/sűrített levegő eleggyel táplált mikroégő, mely fölött egy elektródpár van elhelyezve. A kolonnát elhagyó szerves komponensek a vivőgázzal a lángba jutnak, majd oxigén közreműködésével

ionizálódnak. Az ionok hatására az elektródok között áram folyik, ami erősítés után mérhető (**IV-7. ábra**).

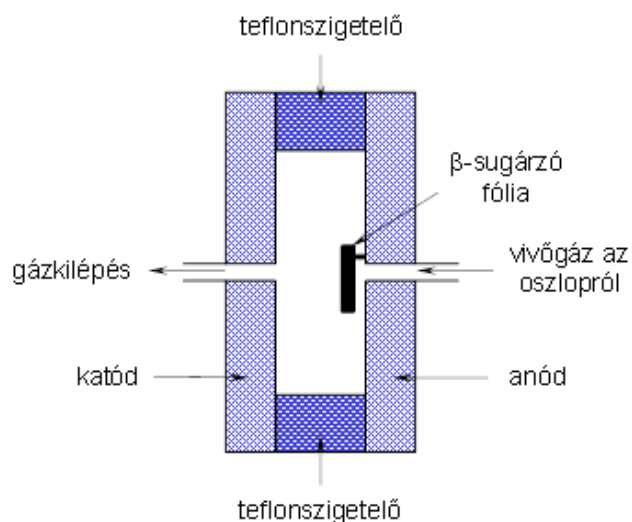
IV-7. ábra: A lángionizációs detektor felépítése



IV.2.3.3.2. Elektronbefogási detektor (ECD)

Az elektronbefogási detektor halogénvegyületek, fémorganikus vegyületek, nitrilek érzékeny és szelektív kimutatására alkalmas. β -sugárzó radioaktív forrást (pl.: ^{63}Ni , ^3H) tartalmaz, amely a vivőgázt (általában argont, vagy nitrogént) ionizálja és állandó elektromos áramot hoz létre a megfelelő feszültségre kapcsolt elektródok között. A nagy elektronegativitású elemet tartalmazó komponensek az elektromos térben a nagy mozgékonyaságú, áramvezetésben résztvevő elektronokat befogják, és így jelentősen csökkentik az áramot (**IV-8. ábra**).

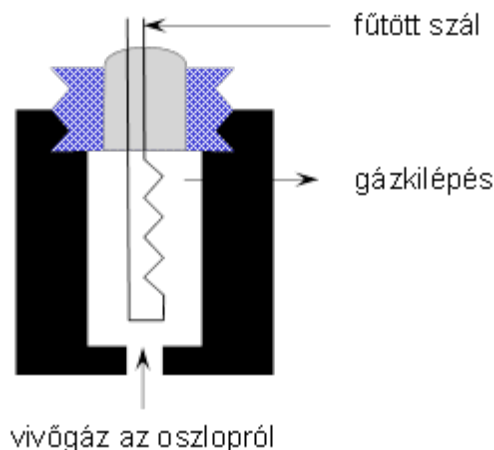
IV-8. ábra: Az elektronbefogásos detektor felépítése



IV.2.3.3.3. Hővezetőképesség-mérő detektor (TCD)

A detektor érzékelője egy elektromosan fűtött volfrámszál. A vivőgáz állandó áramlási sebessége mellett a fűtött drótról a hőelvezetés sebessége az azt körülvevő vivőgáz molekulatömegével arányos. A detektorcellában lévő fűtött szál hőmérséklete, így elektromos ellenállása mindaddig nagyobb, mint a tiszta vivőgázban mérté, amíg mintakomponens tartózkodik a cellában. A detektor érzékenységét javítja, ha a vivőgáz hővezető képessége nagy, ezért hővezetőképesség-mérő detektor esetén kizárólag hélium vagy hidrogén alkalmazható vivőgázként (**IV-9. ábra**).

IV-9. ábra: A hővezetőképesség-mérő detektor felépítése

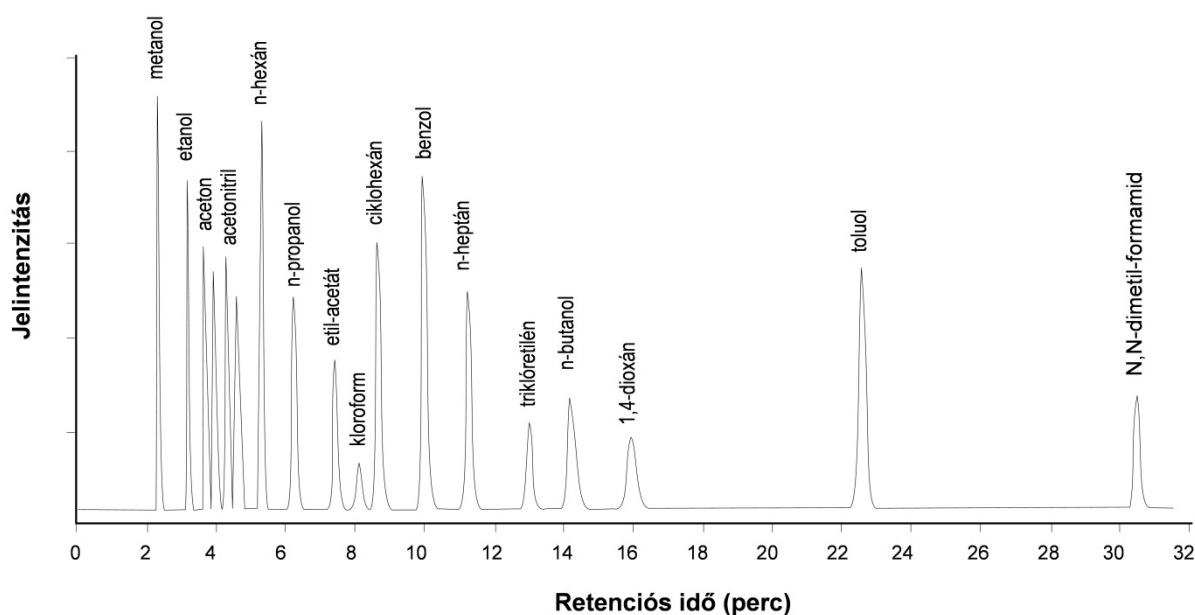


A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv számos esetben előírja gázkromatográfiás módszer alkalmazását azonosítási vizsgálatok (pl.: Anisi aetheroleum azonosítása), határértékvizsgálatok (pl.: Bupivacaini hydrochloridum vizsgálata rokon vegyületekre) és tartalmi meghatározás (pl.: Calcii stearas tartalmi meghatározása) céljából.

Az azonosság feltételeként két lehetőséget jelöl meg a Gyógyszerkönyv: a vizsgált vegyület retenciója megegyezik a standard vegyület retenciójával, vagy a vizsgált vegyület megfelelő relatív retencióval rendelkezik egy előírt belső standardhoz viszonyítva.

Határértékvizsgálatok során a Gyógyszerkönyv az adott cikkelyben előírt belső standardból és a vizsgálandó anyagból azonos koncentrációjú oldatot készítet. A kromatogramok összehasonlításával megadható a vizsgálandó mintában megjelenő csúcsok relatív retenciója és félkvantitatív módon a benne lévő szennyezések mennyisége is.

Tartalmi meghatározáshoz hiteles standarddal való kalibráció alkalmazását írja elő a Gyógyszerkönyv. A vizsgálandó anyag azonos körülmények között felvett kromatogramjának csúcsterületeiből a kalibrációs egyenes egyenlete segítségével meghatározható a minta koncentrációja.

IV-10. ábra: A gyógyszeriparban gyakran alkalmazott oldószerek kromatogramja

IV.3 Folyadékkromatográfia

A folyadékkromatográfia (LC) olyan kromatográfiai elválasztási technika, melynek alapja az anyagok megoszlásának különbözősége két egymással nem elegyedő fázis között. A mozgófázis (eluens) *folyadék*, mely az állófázist tartalmazó oszlopon áramlik keresztül. Az elválasztás többnyire szobahőmérsékleten is megvalósítható, így az eljárás nagy molekulatömegű, hőérzékeny anyagok esetében is alkalmazható. További előnyt jelent, hogy az eluens összetétele széles határok között változtatható.

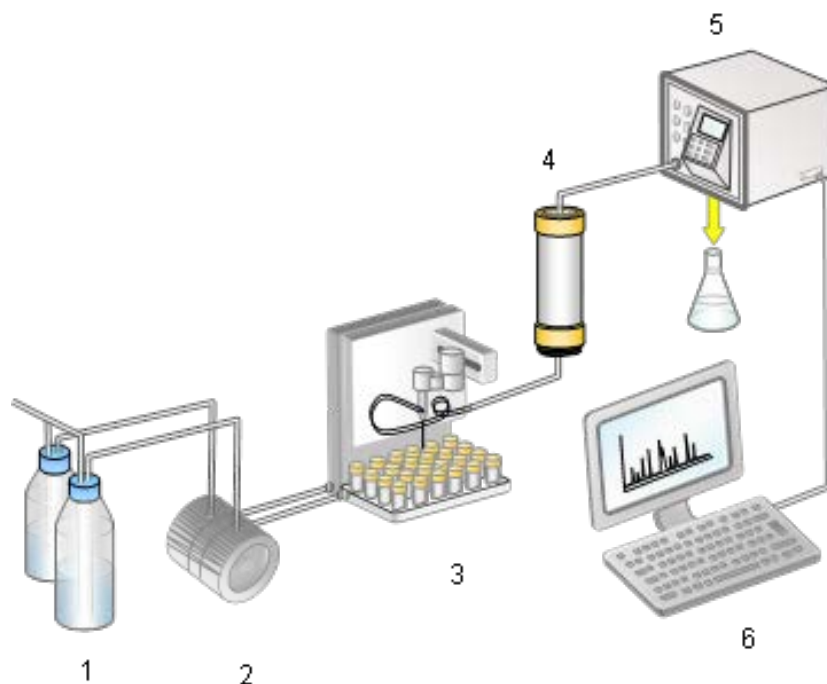
A folyadékkromatográfia főleg *adszorpciós*, *megoszlásos*, *ioncserés*, *méretkizárásos* folyamatokon, illetve sztereokémiai kölcsönhatásokon alapul.

IV.3.1 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) során az állófázis felett nyomáskülönbség hatására kényszeráramot hozunk létre. Az eluens áramlását nagy nyomású pumparendszer biztosítja, így tömör (kicsi szemcseméretű, nagy fajlagos felületű), nagy ellenállású oszlopokon is biztosítható a megfelelő áramlási sebesség. A komponensek elúciója állandó (*izokratikus elúció*) vagy meghatározott program szerint változó (*grádiens elúció*) mozgófázis összetétellel érhető el. Grádiens elúció esetén olyan pumparendszerek használatosak, melyek több oldószertartályból képesek az oldószerek szállítására és keverésére. Egyes pumpákhoz olyan egység is csatlakozik, mely lehetővé teszi a rendszer légmentesítését (degasser).

A *mintabevitel* során nagy nyomáson is működő mintaadagoló segítségével juttatjuk be a folyadék állapotú mintát a folyamatosan áramló mozgófázisba. Használhatunk manuális vagy automata mintaadagolót, állandó térfogatú hurokkal (loop) vagy változtatható térfogatot biztosító eszközzel. A mintaadagolás során esetlegesen bejutó szilárd szennyeződések eltávolítása céljából *előtét kolonnát* alkalmazhatunk, melyet az elválasztásért felelős, gyakran termosztálható *analitikai kolonna* elé helyezünk el. Az oszlopról eluálódó komponensek mennyiségét a *detektor* jelzi (IV-11. ábra).

IV-11. ábra: A nagyhatékonyságú kromatográf felépítése



(1-eluentartályok; 2-pumpa; 3-mintaadagoló; 4-kolonna; 5-detektor; 6-kiértékelő egység)

IV.3.1.1 A HPLC állófázisai

Az elmúlt évtizedek fejlesztései eredményeképpen a HPLC állófázisok területén igen széles a választék. Alkalmazhatóságukat a különböző elválasztási mechanizmusok mellett a töltetek fontosabb műszaki paraméterei, úgymint a *szemcseméret és alak*, a *szemcseméret eloszlás*, valamint a *töltet szerkezete*, *pórusmérete* és *stabilitása* határozzák meg.

A töltetek szemcsemérete determinálja az alkalmazható áramlási sebességet, az oszlopban kialakítható nyomásesést illetve az elválasztás hatékonyságát. A szemcseméret csökkentésével nő az elválasztás felbontóképessége. A szemcsék optimális alakja gömbszimmetrikus forma, az ideális méreteloszlás homodiszperz. A szemcsék belső szerkezete a korábbi monodiszperz helyett réteges szerkezetű és erősen porózus, mely nagy áramlási sebesség mellett is kis nyomásesést biztosít. A töltetek stabilitására vonatkozó igény a kémiai-, mechanikai- és hőhatásokkal szembeni ellenállás.

IV.3.1.1.1. Normál fázisú állófázisok

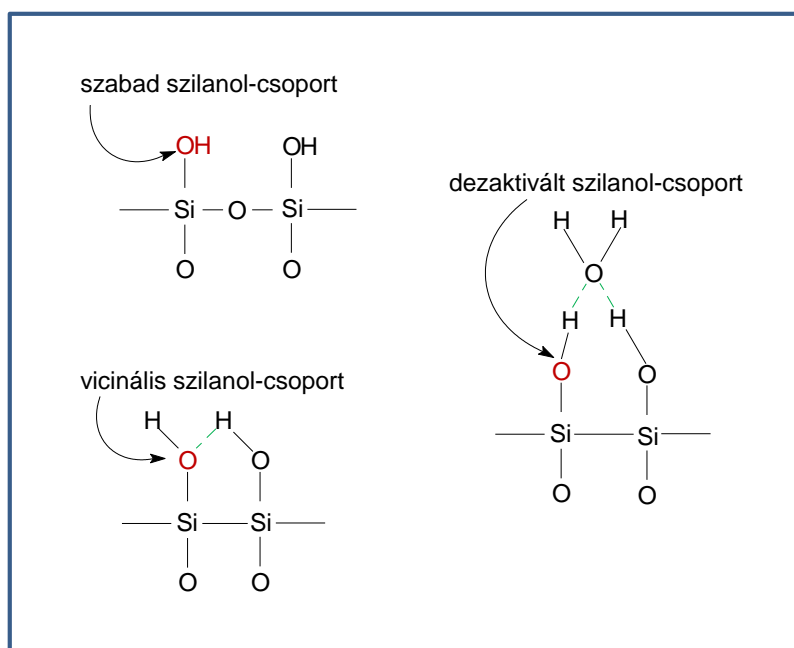
Normál fázisú kromatográfia (Normal Phase - *NP*) során közepesen poláris tulajdonságú vegyületeket választunk el poláris állófázison apolárisabb mozgófázis segítségével. Napjainkban a *szilikagél* és *alumínium-oxid* mellett a *szilikagélhez kémiaiilag kötött poláris csoportokat* (pl.: ciano-, amino-, diol-, nitrocsoport, stb.) tartalmazó állófázisok használata elterjedt. Az elválasztandó vegyületek és az állófázis poláris csoportjai között poláris (specifikus, de nem ionos) kölcsönhatás alakul ki, ami a komponensek retenciójához vezet.

1. Szilikagél fázisok

A szilikagél alapváz $[\text{SiO}_4]$ tetraéderekből áll, felszíne szilanol-csoportokkal ($-\text{Si}-\text{OH}$) borított, mellettük kis mennyiségben sziloxáncsoportok ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$) is előfordulnak. Az előállítás módjától függően a módosítatlan szilikagélek eltérő kémia tulajdonsága a kromatográfiai viselkedésben is megmutatkozik.

A szilikagél minden olyan anyaggal kölcsönhatásba lép, amellyel hidrogénhíd kölcsönhatást tud kialakítani. Hidrogén hidak az egymás közelében elhelyezkedő szilanol-csoportok között is ki tudnak alakulni (vicinális szilanol-csoportok), csökkentve az állófázis aktivitását. A szilikagél állófázisok legfőbb hátránya a vízérzékenységük. A felületen adszorbeálódott víz a szilanol-csoportokhoz erősen kötődve csökkentheti a vizsgálandó komponens állófázishoz való hozzáférhetőségét (dezaktiválás) (IV-12. ábra).

IV-12. ábra: A szilikagél felülete



2. Alumínium-oxid fázisok

Az alumínium-oxid fázisok fajlagos felülete kisebb, mint a szilikagélé és pórusszerkezetük sem annyira ismert. Felületükön $-\text{OH}$ csoportok találhatóak, így hasonlóan a szilikagélhez, vízre meglehetősen érzékenyek. Savkatalízisre bomló vegyületek vizsgálatára is alkalmasak, mivel lúgosan kezelt illetve közel semleges töltettel rendelkező kolonnákat hoznak forgalomba. Fordított fázisú töltetként a felületen polimerizált tölteteket alkalmaznak, ezek pH stabilitása jobb, mint a szilikagélé és magas hőmérsékleten is használhatók.

Jelenleg az alumínium-oxid alapú tölteteket HPLC elválasztásokhoz ritkán, inkább a mintaelőkészítések során alkalmazzák.

3. Kémiaiailag módosított szilikagélek

A kémiaiailag módosított poláris állófázisok a szilikagél felületén található szilanol-csoportok szilanzálásával állíthatók elő. Felületmódosításra kiválasztott poláris funkciós csoportok lehetnek pl.: $-\text{CN}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{F}$ csoportok. A szilanzálási reakció során a

szilanizálószer és a szilikagél, mint hordozó között kovalens szililéter kötések alakulnak ki. Ezt követően a töltet kevesebb aktív helyet tartalmaz, kevésbé érzékeny vízre és szelektivitása is nő. A szabadon maradt szilanol-csoportok nagy részét a szilanizálószer metilcsoportjai sztérikusan gátolják.

IV.3.1.1.2. Fordított fázisú állófázisok

A fordított fázisú folyadékkromatográfiai elválasztásoknál (Reverse Phase - *RP*) a mozgófázis polárisabb az állófázisnál. A legtöbb analitikai elválasztást fordított fázisú tölteteken végzik. Napjainkban *szilikagél* alapú, *szerves polimer* alapú és egyéb *szén*, *zeolit* vagy *alumínium-oxid* alapú állófázisok vannak alkalmazásban. Gyakorlati szempontból legnagyobb jelentőséggel a módosított szilikagél töltetek bírnak (**IV-13. ábra**), melyeket a módosítás szempontjából három csoportba sorolhatunk: *monomer módosítású* fázisok; *átmeneti módosítású* fázisok; *polimer módosítású* fázisok.

A fordított fázisú technika *Halász István* és *Horváth Csaba* munkássága eredményeképpen alakulhatott ki. A folyadékkromatográfia kiváló magyar szakemberei a szilikafázisok impregnálása helyett azok kémiai származékképzését dolgozták ki, olyan apoláris funkciós csoportokkal, mint pl.: a C₄, C₈, C₁₈, C₂₂, fenil csoportok stb.

1. Monomer fázisok

A monomer fázisok előállítása során monofunkciós klór-szilánok alkalmazásával szilanizálási reakcióban a felületmódosításra kiválasztott alkilcsoport (pl.: C₄, C₈ vagy C₁₈, stb.) a szilanol-csoportokra köthető, melyek 50-60%-a vihető reakcióba. A hidrofób felületet alkotó alkilcsoportok gyenge diszperziós kölcsönhatást tudnak kialakítani a vizsgálandó komponensekkel, míg a szilanol-csoportok erősebb hidrogénhid kötés létesítésére képesek. A kialakított fordított fázis jellemezhető a hidrofób és a hidrofil felület arányával. A hatékony elválasztás érdekében a hidrofób/hidrofil felületarány ellenőrzése fontos.

2. Átmeneti fázisok

Az átmeneti fázisok előállítása során bifunkciós klór-szilánokat alkalmaznak a szilanizálási reakcióban azért, hogy egy lépésben két szilanol-csoportot vigyenek reakcióba. A reakció eredményeként a hidrofób/hidrofil felületarány megváltozik a monomer módosításhoz képest.

3. Polimer fázisok

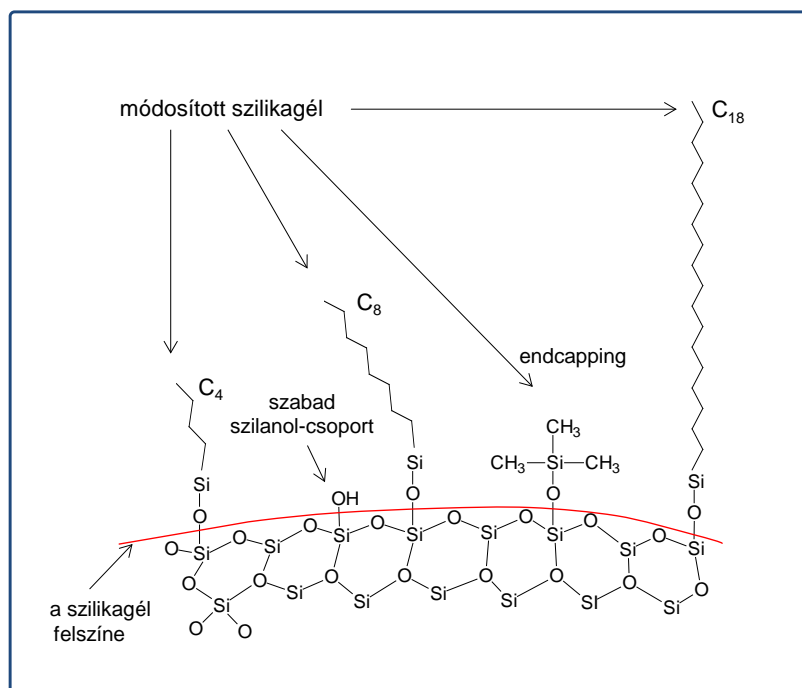
A polimer módosítású fázisok előállítása során trifunkciós klór-szilánokkal módosítják a szilikagél felszínén lévő szilanol-csoportokat, végül térhálós polimer szerkezet jön létre. Az összes felületi szilanol-csoportot elreagáltatni sztérikus okok miatt nem lehet. A kromatografálás során az el nem reagált szilanol-csoportok hozzáférhetősége attól függ, hogy a vizsgálandó komponens mennyire képes behatolni a térhálós rendszerbe.

4. Utószilanizálás

Az átmeneti vagy polimer módosítású fázisok előállítása során szabadon maradt szilanol-csoportok döntő hányada *utószilanizálási (endcapping)* reakcióval átalakítható. Az utószilanizálási reakciót olyan vegyülettel végzik, amely elég kicsi ahhoz (pl.: trimetil-klór-szilán), hogy a zezugos térhálós szerkezeten keresztül megközelítse a szilanol-csoportot. A töltetek borítottsága a töltet százalékos széntartalmával ellenőrizhető, a széntartalom utószilanizálással emelkedik. Az így módosított állófázis

(pl.: C₁₈ (e)) igen nagy előnye, hogy szélesebb pH-tartományban alkalmazható (pH≈2-10), továbbá előállításának reprodukálhatósága nagyon jó.

IV-13. ábra: Kémiaailag módosított szilikagél a fordított fázisú folyadékkromatográfiában



IV.3.1.2 Az RP-HPLC mozgófázisai

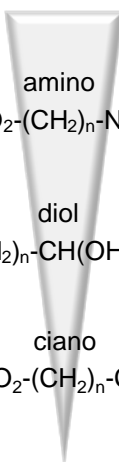
Napjainkban a legtöbb analitikai elválasztást fordított fázisú tölteteken végzik. A nagyobb hatékonyság elérése érdekében egyre kisebb szemcseátmérőjű kromatográfiai oszlopokat hoznak forgalomba, így fontos szempont, hogy a mozgófázis a lehető *legtisztább* (hypergrade, gradientgrade), *kis viszkozitású* oldószerekből készüljön. Fordított fázisú elválasztás során a mozgófázist alkotó oldószerelegynek *az alkalmazott állófázisnál polárisabbnak* kell lennie, leggyakrabban alkalmazott oldószerek a *víz*, az *acetonitril* és a *metanol* (IV-14. ábra). A mozgófázis a mintaadagolás során bejuttatott *mintakomponenseket oldatban tartva*, folyamatos áramlással biztosítja azok keresztülhaladását az oszlopon, majd a detektoron. Vízen nem oldódó mintakomponensek esetén a mozgófázis oldatbantartó (szolubilizáló) képessége vízzel elegyedő szerves oldószerekkel növelhető.

Ionos és könnyen ionizálható mintakomponensek vizsgálata esetén az elválasztás szerves részét képezheti a pufferek (pl.: foszfát, citrát, trisz(hidroximetil)-aminometán, acetát, formiát, stb.) használata. A *megfelelő pH* beállításához ismerni kell az elválasztandó anyag pK_s-értékét és az alkalmazni kívánt anyag pufferkapacitását. A pH-tól függően a savas illetve bázikus jellegű funkciós csoportokat tartalmazó vegyületek kétfajta molekuláris állapotban lehetnek jelen. Az ionizált és nem ionizált formák mozgófázisban való oldhatósága különböző, így az állófázissal kialakítható kölcsönhatás típusa is eltérő, ami pedig a retenció megváltozását eredményezi. A pufferek alkalmazásának célja a molekuláris formák állandó arányának biztosítása, ezáltal az elválasztás minőségének javítása. Az ionos formában jelenlévő komponensek visszatartásának növelése érdekében a mozgófázisok gyakran *ionpároképző vegyületet*

tartalmaznak. Az elválasztandó ion és a vele ellentétes töltésű ionpárképző anyag (pl.: kvaterner ammóniumkation, alkil-szulfonátanion) töltés nélküli asszociátumot (ionpárt) képez, amely jobban kötődik az apoláris állófázishoz.

Az RP-HPLC-ben alkalmazott mozgófázisokkal szemben támasztott igen fontos követelmény a detektorral való kompatibilitás (pl.: jó UV-fény áteresztőképesség, elpárologtathatóság tömegspektrometriás detektálás esetén, stb.).

IV-14. ábra: A normál és fordított fázisú folyadékkromatográfiában alkalmazott álló- és mozgófázisok

| HPLC oszlopok | | |
|--------------------------|--|-------------------------------------|
| | Állófázis | Mozgófázis |
| NORMÁL FÁZISÚ HPLC | Al_2O_3 ; SiO_2  amino $\text{SiO}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ diol $\text{SiO}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$ ciano $\text{SiO}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CN}$ | szénhidrogének izopropil-alkohol |
| FORDÍTOTT FÁZISÚ HPLC | $\text{SiO}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ $n = 8; 18$ (RP-8; RP-18) endcapped oszlopok (az összes -Si-OH csoport módosítva van) | víz metanol acetonitril |

IV.3.1.3 A HPLC detektorai

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában alkalmazható detektor rendszerint átfolyó cellával rendelkezik, ezáltal a rajta átáramló, oszlopról eluálódó komponens koncentrációját jelzi. A detektorok érzékenységét az *optikai fényút hossza* és a *detektorcella belső térfogata* határozza meg.

A legelterjedtebben alkalmazott detektorok az *ultraibolya/látható (UV/VIS) spektrofotométerek*. Ide tartoznak a *diódasoros detektorok* is. Ezen kívül alkalmazhatók fluoreszcencia mérésen alapuló detektorok, differenciál refraktométerek, elektrokémiai detektorok, tömegspektrométerek, fényszórás elvén működő detektorok, radioaktivitást mérő detektorok, magmágneses rezonancia elvén és dielektromos állandó mérésen alapuló detektorok.

IV.3.1.4 Királis kromatográfia

Az enantiomer párok elválasztása a fizikai-kémiai tulajdonságaik hasonlósága miatt csak olyan sztereospecifikus kémiai kölcsönhatással lehetséges, amelynek során a sztereoizomerek eltérő módon reagálnak.

A királis elválasztások két nagy csoportba sorolhatók: (1) *közvetlen módszerek* és (2) *közvetett módszerek*.

IV.3.1.4.1. Közvetlen módszerek:

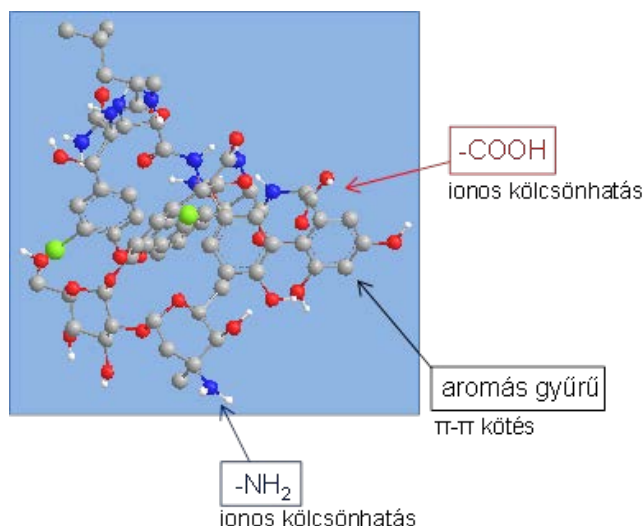
1. Királis állófázis alkalmazása

Az állófázis és az elválasztandó vegyület között stabil kapcsolat akkor tud kialakulni, amikor az elválasztandó molekula legalább három ponton kötődik az állófázishoz (hárompontos illeszkedés modellje). Ezt a modellt további feltétellel bővítette *Pirkle* és *Pochapsky*, akik szerint a három szükséges kölcsönhatás közül legalább egynek sztereoszelektívnek kell lennie. Ebből a megfontolásból a királis állófázist kutató és fejlesztő szakemberek igyekeznek minél több kölcsönhatás kialakítására alkalmas szelektorokat létrehozni.

Alkalmas fázisok:

- ciklodextrin alapú fázisok
- Pirkle-féle fázisok (π -sav π -bázis kölcsönhatások)
- királis polimer fázisok
- ligandumcserélő fázisok
- makrociklusos antibiotikum fázisok (pl.: glikopeptidok - vankomicin)
- koronaéter fázisok

IV-15. ábra: A vankomicin 3D szerkezete. A vankomicin a megjelölt funkciócsoportok által alakít ki kölcsönhatást az elválasztandó molekulával



(A vankomicin Cu(II)-komplexével az aminosav és karbonsav enantiomerek egymástól elválaszthatók.)

2. Királis mozgófázis alkalmazása

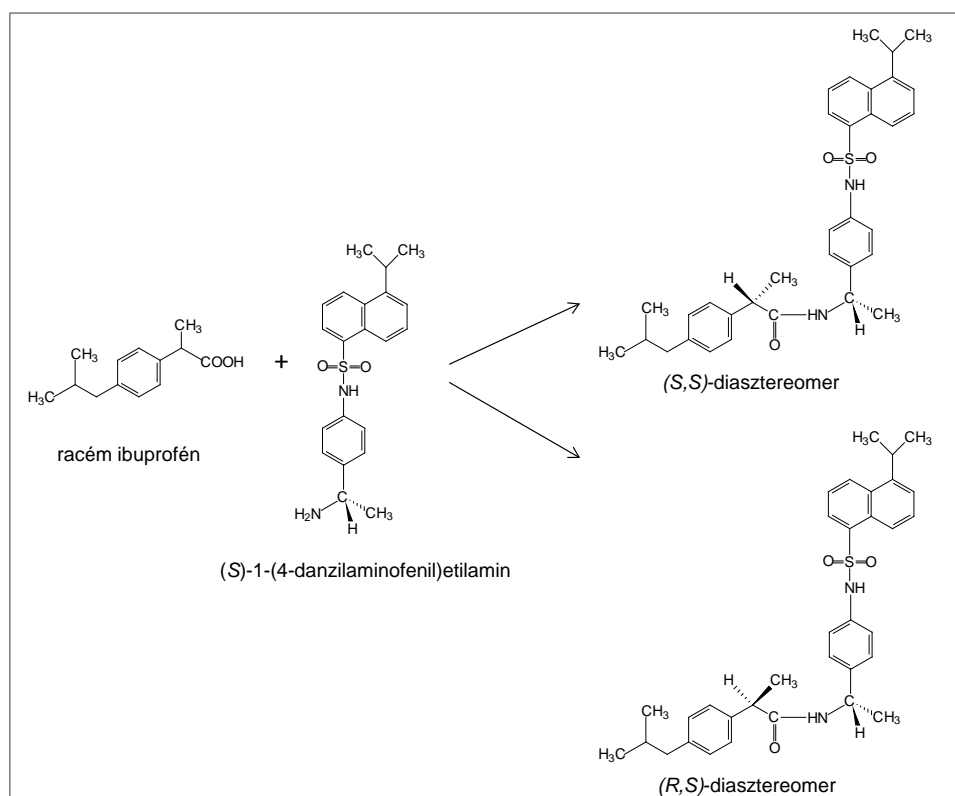
Számos racém elegy elválasztható akirális oszlopon a mozgó fázishoz adagolt királis vegyületek alkalmazásával. Királis adalékok lehetnek pl. ciklodextrinek.

IV.3.1.4.2 Közvetett módszerek:

1. Oszlop előtti származékképzés királis reagens segítségével

Az enantiomer párokat származékképzéssel (királis reagenssel való reakció útján) diasztereomer párokká alakítjuk, így az eltérő fizikai-kémiai tulajdonságuk akirális oszlopon is lehetséges az elválasztásuk (pl.: a racém *ibuprofén* oszlop előtti derivatizálása, **IV-16. ábra**).

IV-16. ábra: A racém ibuprofén oszlop előtti derivatizálása



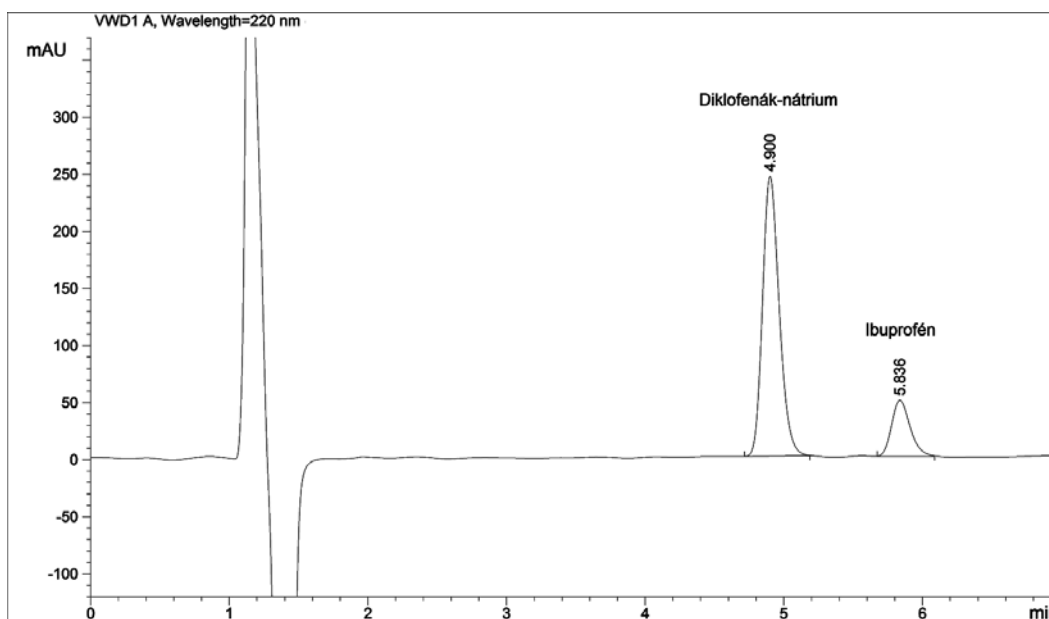
A királis származékképzők alkalmazásának előnyei:

- nagyobb felbontás
- detektálás alsó határa csökkenthető
- akirális kolonna alkalmazható, így olcsóbb

A királis származékképzők alkalmazásának hátrányai:

- tiszta származékképző reagensre van szükség
- a származékképzés időigényes lehet
- a képződő diasztereomerek moláris abszorbanciája különböző lehet
- a reagensfelesleg zavaró csúcsként jelentkezhet
- racemizáció léphet fel

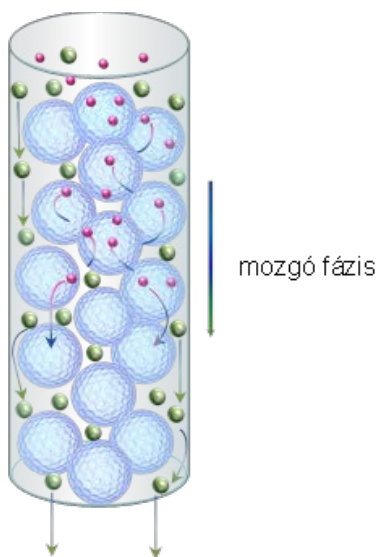
IV-17. ábra: Ismeretlen koncentrációban ibuprofént és belső standardként diklofenák-nátriumot tartalmazó oldat kromatogramja



IV.3.2 Méretkizárásos kromatográfia

A *méretkizárásos kromatográfia* olyan folyadékkromatográfiai módszer, amellyel az oldatba vitt anyagokat méretük szerint választjuk el. A szerves mozgófázist alkalmazó módszert *gélpermeációs kromatográfia*nak nevezzük, vizes mozgófázis alkalmazása esetén *gélészűrési kromatográfia*ról beszélünk. Az állófázis gél, vagy szilárd, porózus részecskével töltött oszlop, melyen keresztül a mozgófázis segítségével vándoroltatjuk a mintát. Az oldott molekulák folytonosan cserélődnek a mozgófázis és az oszloptöltet pórusaiban található stagnáló, de a mozgófázissal megegyező összetételű folyadékfázis között.

A méret szerinti elválasztás molekulaméret-tartományát a töltet pórusméret-tartománya határozza meg. Azok a molekulák, melyek mérete az oszloptöltet legnagyobb pórusméretét is meghaladja, visszatartás nélkül vándorolnak végig az oszlopon, a kizárásos térfogattal eluálódnak (V_0 , *holtterfogat*). Azok a molekulák viszont, melyek kicsi méretüknél fogva a legkisebb pórusba is be tudnak hatolni, a *teljes permeációs térfogat*nak (V_t) nevezett oldószermennyiséggel, csak a nagyobb molekulákat követően eluálódnak az oszlopról (**IV-18. ábra**).

IV-18. ábra: A méretkizárásos kromatográfia elve

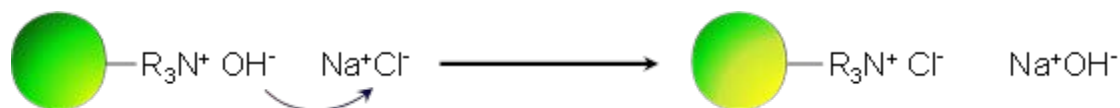
A méretkizárásos kromatográfiához használt készülék nélkülözhetetlen része a különböző hosszúságú és belső átmérőjű *kromatográfias oszlop*. A függőlegesen elhelyezett oszlop a bemenetnél rendszerint *mintaadagolóval* (pl.: átfolyó-adapter, fecskendő, szelepes injektor) van ellátva. A mozgófázis állandó sebességgel való áramoltatását megfelelő *pumpával* szabályozhatjuk. Az oszlop kimenetéhez általában *detektor* és automata regisztráló berendezés csatlakozik, amely jelzi a minta elválasztott komponenseinek relatív koncentrációját. A detektorok általában fotometriás, refraktometriás vagy lumineszcenciás elven működnek. Szükség esetén az oszlophoz automata frakciószedő is illeszthető.

A méretkizárásos kromatográfia automatizálás nélkül is jó kivitelezhető, ilyenkor a mintát és a mozgófázist manuálisan adagoljuk a felül nyitott, állófázist tartalmazó üvegcsőbe. Az üvegcső alján elhelyezett csap megnyitásával a gravitáció révén biztosítható a mozgófázis folyamatos áramlása. Nem automatizált rendszer esetén a frakciószedés is manuálisan történik, az eluátumok vizsgálata pedig közvetlenül vagy megfelelő derivatizálást követően többnyire spektrofotométer segítségével valósul meg.

A méretkizárásos kromatográfia felhasználható polimerek molekulaméret-eloszlásának meghatározására, de megfelelő kalibrációs standardokat alkalmazva molekulatömeg-meghatározást is végezhetünk.

IV.3.3 Ioncserés kromatográfia

Az *ioncserélő kromatográfia* olyan folyadékkromatográfias módszer, amelynél az elválasztás az álló- és mozgófázis közötti ioncsere-egyensúlyon alapul, így egyaránt alkalmas szerves és szervetlen ionok elválasztására. Az analitikai célokra is alkalmas ioncserélő állófázisok térhálósított mügyanta vázhoz kötve tartalmaznak jól vagy kevésbé jól disszociáló csoportokat. Ennek megfelelően léteznek közöttük gyenge és erős ioncserélők. Erős kationcserélők (**IV-19. ábra**) az $-\text{SO}_3\text{H}$, gyenge kationcserélők a $-\text{COOH}$ csoportokat tartalmazó gyanták, míg az anioncserélők között a kvaterner aminocsoportokat tartalmazók erős (**IV-20. ábra**), a primer aminocsoportokat tartalmazók gyenge ioncserélők.

IV-19. ábra: Erős kationcserélő működésének elve**IV-20. ábra:** Erős anioncserélő működésének elve

Az ionok megkötődésének erősségét több tényező befolyásolja, ezek közül számottevő az ion mérete és fajlagos töltése, de jelentős hatással bír a hőmérséklet, a mozgófázis ionerőssége és pH-ja is.

Kationok kromatografálására eluensként híg erős savakat, az anionok elválasztására bázisos oldatokat használnak.

Az ioncserés kromatográfok felépítése sokban hasonlít a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias berendezésekre. Az eluenstartályban tárolt mozgófázist a korrozív behatásnak jól ellenálló nagynyomású pumpa hajtja át az oszlopon. Az oszlop kimenetéhez az elválasztott komponensek detektálására kézenfekvő vezetőképesség mérésen alapuló detektort alkalmaznak. A mozgófázisként alkalmazott savas illetve bázisos oldatok megválasztásakor fontos szempont az eluens vezetőképességének minimalizálása. Erre, a kicsi vezetőképességű mozgófázis használatán kívül megoldást jelenthet az analitikai oszlop után elhelyezett vezetőképességet elnyomó oszlop alkalmazása. A szupresszor-oszlop (kationcserélő) működésének lényege az, hogy megkötődik rajta az eluens anionja, amellyel ekvivalens mennyiségű hidroxidion az eluensben lévő protonokkal alig disszociáló vizet képez.

Az ioncserélő kromatográfia automatizálás nélkül is jó kivitelezhető, ilyenkor a mintát és a mozgófázist manuálisan adagoljuk a felül nyitott, állófázist tartalmazó üvegcsőbe. Az üvegcső alján elhelyezett csap megnyitásával a gravitáció révén biztosítható a mozgófázis folyamatos áramlása.

IV.3.4 Affinitás kromatográfia

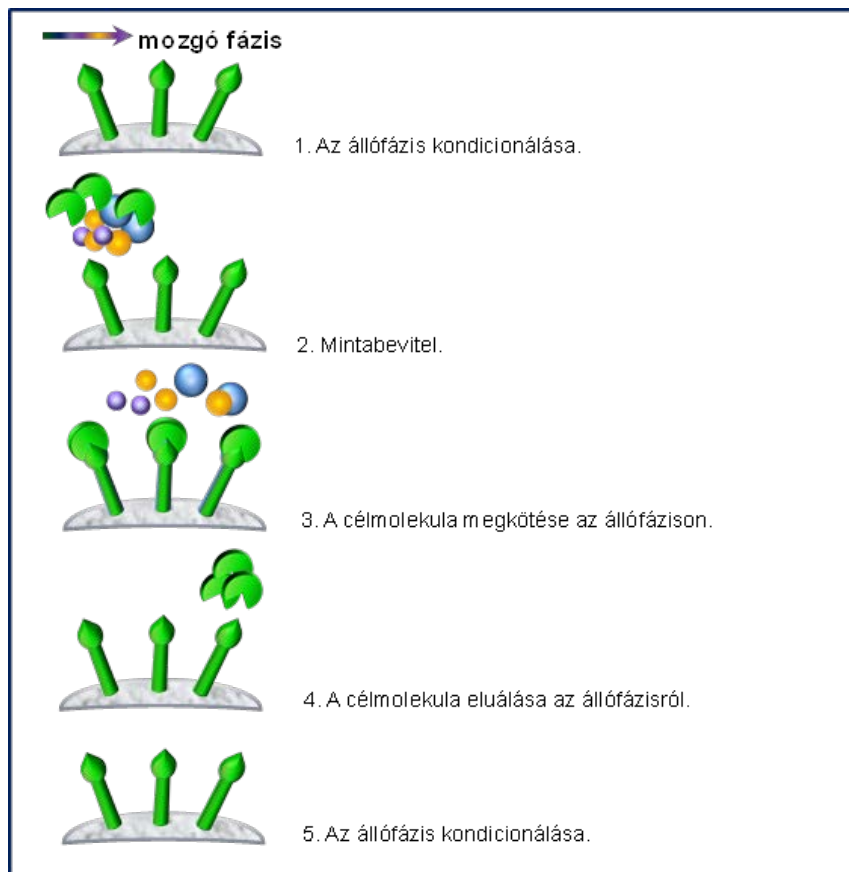
Az affinitás kromatográfia a kromatográfia legszelektívebb ága. Az elválasztás alapja az állófázishoz kötött molekulák és a mozgófázisban haladó molekulák közötti specifikus kölcsönhatás, amely rendszerint antigén-antitest kapcsolaton vagy enzimreakción alapul. Segítségével nagy szelektivitással szeparálhatók biomolekulák specifikus kölcsönhatásaik alapján. Az állófázisra (általában agarózsármazék, de lehet cellulóz vagy dexrán) kémiai kötással enziminhibitort vagy valamely fehérjére specifikus antitestet rögzítenek, amely reverzibilisen megköti az akár sok komponensből álló keveréket tartalmazó mozgó fázisból a keresett biomolekulát, amit végül a mozgó fázis összetételének megváltoztatásával (pl.: pH megváltoztatása, oldószercsere) eluálhatunk az oszlopról. Mivel az affinitás kromatográfia a biomolekula egyedi biológiai funkcióján alapul, lehetővé teszi az aktív molekulák inaktív (denaturált) formáktól való elválasztását is. Biológiai mátrixból (pl.: vészérum) való szeparálás esetén tanácsos a mintát valamilyen részleges szeparálással (pl.: centrifugálás, szűrés) előkészíteni.

Affinitás kromatográfiában megjelenő kölcsönhatás típusok

1. antitest – antigén (vírus, sejt)
2. enzim – szubsztrát vagy inhibitor
3. hormon – hormon receptor
4. nukleinsav – nukleinsav kötő fehérje (hiszton)
5. glutation – GST (glutathion S transzferáz) fehérje
6. fém kelát – láncvégekhez fuzionált His-tag

Különösen nagy jelentősége van az affinitás kromatográfiának a rekombináns fehérjék tisztításában.

IV-21. ábra: Az affinitás kromatográfia lépései



IV.4 Vékonyréteg kromatográfia

A *vékonyréteg-kromatográfia* (VRK, Thin Layer Chromatography - TLC) olyan elválasztástechnikai eljárás, amely során a vizsgálandó anyagok oldatait folyadék halmazállapotú mozgófázis segítségével vándoroltatjuk az állófázist képező vékonyrétegen. A vékonyréteg-kromatográfia gyors és viszonylag egyszerű, ezért széles körben elterjedt módszer. Segítségével a kromatográfias feladatok jelentős része megoldható. A gyógyszer-analitikában főként azonossági és tisztaságvizsgálati céllal alkalmazzák.

Az állófázis egy üveg-, fém- vagy műanyag hordozón vékony rétegben, egyenletesen szétterített szilárd adszorbens, amelyre folyadékfázis is (pl.: formamid, dimetil-formamid, etilén-glikol, paraffin, szilikonolaj, stb.) felvihető (impregnálás). Ennek köszönhetően az elválasztás folyamatában az *adszorpció* vagy az oldékonysági *megoszlás* dominál.

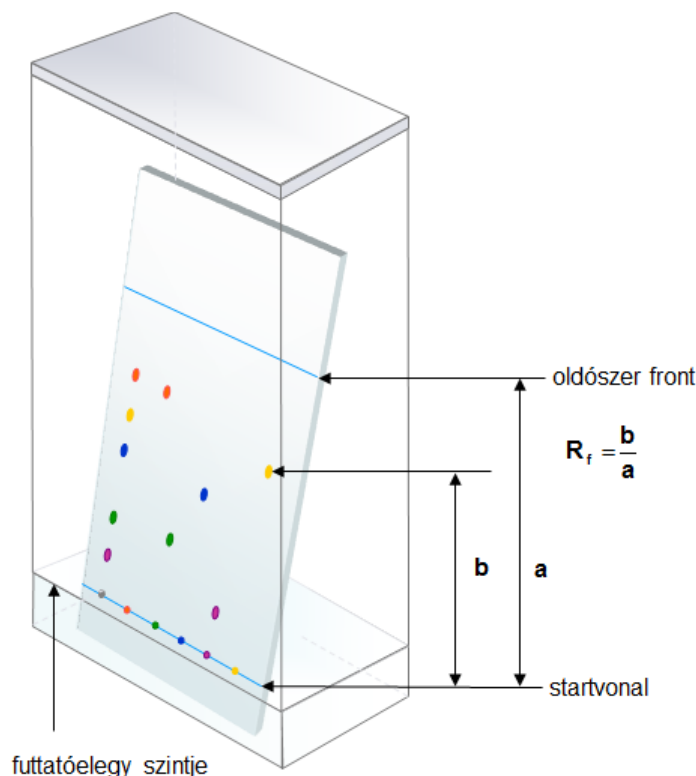
A réteget a laboratóriumi gőzöktől elzárva, tiszta levegőjű helyiségben, szorosan lezárt dobozban tároljuk. Az elválasztás megkezdése előtt sok esetben előkezeljük őket (pl.: oldószer-vándoroltatás, szárítószekrényben való aktiválás 120 °C-on).

A vizsgálandó anyagból célszerű könnyen párolgó szerves oldószerrel kb. 0,1-1%-os oldatot készíteni, amelyet *felcseppentő kapilláris* vagy *automata cseppentő* segítségével, a lemez alsó szélével párhuzamos egyenes mentén viszünk fel a rétegre. Egyszerre 1-2 µl-es részletet cseppentünk fel és minden oldatrészlet felcseppentése után várunk az oldószer elpárolgásáig. (A rétegekromatográfiásan vizsgálható optimális anyagmennyiség általában 1-10 µg közé esik.) A minta felvitele során ügyelni kell arra, hogy a lemez szélére ne vigyünk fel mintát (perem hatás) és a felcseppentett folt átmérője ne legyen nagyobb 5 mm-nél. Az ugyanazon lemezen kromatografált minták teljes elkülönülése érdekében igen fontos, hogy a felcseppentett foltok közötti távolság kb. 10 mm legyen. A minta sávok formájában is felvihető a rétegre, ilyenkor a sávok ideális hossza 10-20 mm, szélessége 1-2 mm. A szomszédos sávok szélei között célszerű 5 mm távolságot hagyni.

A mintafelvitelt követően a lemezt a mozgófázist tartalmazó *kromatografáló kamrába (futtató kád)* helyezzük úgy, hogy a foltok illetve sávok a futtatószer szintje fölé kerüljenek. A kromatografáló kamra inert, átlátszó anyagból készül, alja sík vagy kettős vályú formájú, a lemez méretének megfelelő méretű. Jól záró fedőlap tartozik hozzá. A kromatografáló kamrát a falai mentén szűrőpapírral béleljük, majd a kifejlesztőelegyből annyit töltünk bele, hogy – miután a szűrőpapírt átítatta – megfelelő magasságú folyadék réteget képezzen a kamra alján. Az esetek többségében telített kamrában kromatografálunk, azaz kifejlesztés előtt adott időtartamig állni hagyjuk a kifejlesztőelegyet a légmentesen zárt kádban. (A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv 1 óra telítési időt ír elő.) A telítés célja az, hogy a kifejlesztés során lényegesen már ne változzon a kifejlesztőelegy komponenseinek koncentrációja.

Szabadáramlásos vékonyréteg-kromatográfia során (szemben a kényszeráramlásos, túlnyomásos technikával) a mozgófázis a kapilláris erő segítségével halad a rétegen a mintakomponensekkel együtt. A különböző komponensek különböző sebességgel haladnak. A vándorlás sebességét a planáris kromatográfias rendszerben a *visszatartási faktorral* (R_f) jellemezhetjük, amely érték a vándorló vegyület által megtett út és a mozgófázis által megtett út hányadosaként számítható ki (**IV-22. ábra**).

IV-22. ábra: A vékonyréteg-kromatogram kifejlesztése



Miután a mozgófázis megfelelő hosszúságú utat tett meg a lemezen (pl.: 20 cm-es lemezen 10-15 cm), a lemezt kiemeljük a futtató kádból és megszáritjuk. A *száritást* legegyszerűbben hajszáritóval lehet elvégezni, más esetekben hőkezelést végzünk (hevítés), ami a későbbi előhívási folyamat része. Mivel száritás során az oldószer párolog a lemez felületéről, a megfelelő elszívásról gondoskodni kell.

Az *előhívás* (a foltok helyének meghatározása) többféle módon elvégezhető.

UV lámpa 254 vagy 366 nm hullámhosszú fényében, az ebben a tartományban abszorbeáló anyagok foltot képeznek. A réteg optikai érzékenyítése alapján az állófázis lehet fluoreszkáló (ilyenkor a rétegalapanyag adalékanyagként fluoreszkáló indikátort tartalmaz) vagy nem fluoreszkáló. Fluoreszkáló rétegen az abszorbeáló anyagok sötét foltot képeznek (fluoreszcencia kioltás), nem fluoreszkáló rétegen pedig az anyag saját fluoreszcenciájának megfelelő színű folt jelenik meg. Az így láthatóvá vált foltok helyét körbekarikázzhatjuk. Ezzel a módszerrel az aromás vegyületek, így a gyógyszervegyületek többsége előhívható.

Általános vagy egyes funkciós csoportokra szelektív előhívó reagenssel, színreakciót előidézve is tudunk foltokat előhívni. Ilyenkor a megfelelő reagens oldatába való bemártással vagy a lemez bepermetezésével lehet meghatározni a foltok helyét. Az általános előhívószerek erősen oxidálnak vagy roncsolnak, pl.: foszfomolibdénsav, kénsav. Az aminosavak és fehérjék megjelenítésére gyakran használt specifikus előhívó reagens a ninhidrin, alkaloidokra és aminokra specifikus a jóddodat és a Dragendorff-reagens, a fenolok előhívására alkalmas a vas(III)-klorid.

A megszáritott lemezt az előhívó reagens gőzeivel telített tartályba helyezve is meghatározhatjuk a foltok helyét. Ilyen fajta előhívásra alkalmas a nagy tenziójú jó és bróm. Az előhíváshoz szükséges gázt a lemezt tartalmazó tartályon kívül is

fejleszthetjük (pl.: ammónia, nitrózus gáz), majd bevezethetjük a tartályba. A módszer előnyét az jelenti, hogy alkalmazásával elkerülhető a réteg átnedvesedése.

A vékonyrétegek *kiértékelése* minőségi és mennyiségi információt szolgáltat.

Minőségi információ az R_f értékek összehasonlítása alapján nyerhető. Pl. valamely vegyület azonosságának megállapítására a standard anyaggal történő együttfuttatás során az azonos R_f érték szolgálhat. Az R_f értékek csak az azonos lemezen, azonos körülmények között futtatott minták esetében hasonlíthatók össze. Reprodukálható R_f értékeket csak standard körülmények között kaphatunk. Az R_f értékét a vékonyréteg anyagi minősége, szemcsemérete, porozitása, a réteg vastagsága, a futtatóelegyet alkotó oldószerek jellege és minősége, a kád telítettségi foka, a hőmérséklet, az oldószerszint úthossza, a start távolsága a mozgófázis felszínétől, a felvitt minta mennyisége és az oldott anyag kémiai természete befolyásolja.

Mennyiségi meghatározást legegyszerűbben a foltterület mérésével (planimetria), vagy a foltban lévő anyag mennyiségének standard anyaggal felvett kalibrációs görbéből való kiszámításával végezhetünk. Ez utóbbi csak kis koncentráció tartományban, kis érzékenységgel kivitelezhető. További lehetőség a folt optikai sajátosságának műszeres mérése. A módszer különböző változatainál az erre a célra szolgáló spektroszkóp megvilágítja, illetve átvilágítja a foltot, amelynek mérhető a fényelnyelése (denzitometria), fényvisszaverése (reflektometria) vagy a fluoreszcenciája (fluorimetria).

IV.4.1 A VRK módszerek csoportosítása

Térbeli elrendezés alapján:

- (a) vertikális
- (b) horizontális

Az elválasztható minta tömege alapján:

- (a) analitikai: 0,1-0,2 mm rétegvastagság
- (b) félpreparatív: 0,2-0,5 mm rétegvastagság
- (c) preparatív: 0,5-10 mm rétegvastagság

A hajtóerő típusa alapján:

- (a) kapilláris erő – hagyományos (szabadáramlásos) VRK
- (b) centrifugális kényszererő – cirkuláris VRK
- (c) nyomásból származó erő – nagynyomású VRK (OPLC)

A fázis típusa alapján:

- (a) normál fázisú: szilikagél, alumínium-oxid, kovaföld (Kieselgur)
- (b) fordított fázisú: C₈-, C₁₈-, poliamid-, dimetil-amino-propil-csoportokkal kémiailag módosított szilikagél
- (c) ioncserélő

IV.5 Szuperkritikus fázisú kromatográfia

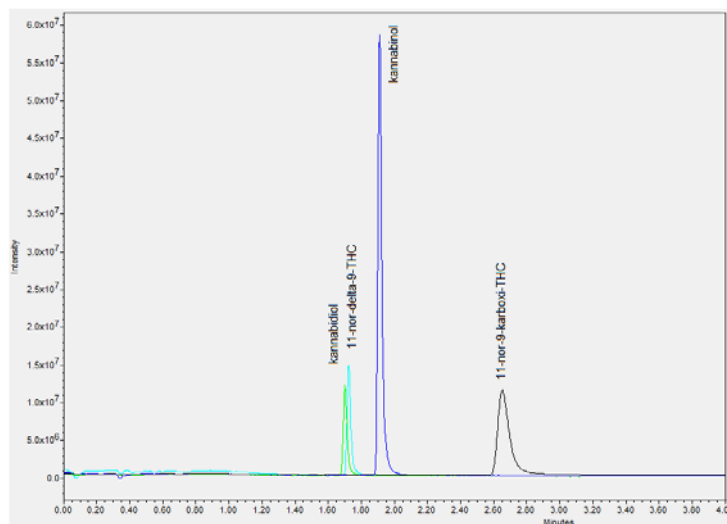
A *szuperkritikus fázisú kromatográfia* (SFC) a kromatográfia azon ága, amely egyesíti magában a folyadék- és gázkromatográfia előnyeit. Megjelenése az 1980-as évek elejére tehető. A szuperkritikus anyagi állapot nem halmazállapot. Egy anyag akkor kerül ebbe az állapotba, ha hőmérséklete és nyomása egyszerre nagyobb az adott anyag ún. kritikus értékeinél (kritikus hőmérséklet - t_k , kritikus nyomás - p_k). Szuperkritikus állapotban a folyadékok gázszerűek és a gázok folyadékszerűek, vagyis az anyagok tulajdonságai a folyadék- és gáz állapotra „egyszerre” jellemzőek. Ezen tulajdonságok következtében a szuperkritikus fluidum, mint eluens a nagyobb méretű és a nem illékony molekuláknak is kiváló oldószere, továbbá a folyadékokhoz mérten nagy diffúziós együttható miatt sokkal gyorsabb és nagyobb hatékonyságú az elválasztás, mint a folyadékkromatográfiában. A nyomás növelésével a szuperkritikus fluidum sűrűsége és oldóképessége növekszik, ami javítja az elválasztás hatékonyságát.

A szuperkritikus kromatográfia elsősorban *szén-dioxidot* alkalmaz mozgófázisként, ugyanis a CO₂ környezetszennyezést nem okozó természetes anyag, amelynek szuperkritikus értékei nem túl magasak. Fizikai tulajdonságai szuperkritikus állapotban a folyadék halmazállapotú hexánhoz hasonlíthatók, így kromatográfiai viselkedése is a hexánhoz hasonló, vagyis apoláris. Polaritásának növeléséhez poláris szerves módosító szükséges, mint pl.: a metanol, etanol vagy az acetonitril. Ezek az oldószerek azonban a polaritás mellett a CO₂ szuperkritikus értékeit is növelik.

Állófázisként a folyadékkromatográfiában elterjedt állófázisok használatosak (pl.: C₁₈, etil-piridin, szilika, diol, pentafluoro-fenil oszlopok).

Detektorként az LC-ben is alkalmazott UV-spektrofotometriás és fluoreszcenciás, valamint a GC-ben alkalmazott lángionizációs és elektronbefogási detektorok egyaránt használhatók. Makromolekulák vizsgálatára a szórt fény mérésének elvén alapuló ELS detektor (evaporative light scattering detector) szolgálhat. Tömegspektrométerhez kapcsolva teljesítőképessége és alkalmazhatósága jelentősen növekszik (**IV-23. ábra**).

IV-23. ábra: A THC és metabolitjainak SFC-MS kromatogramja



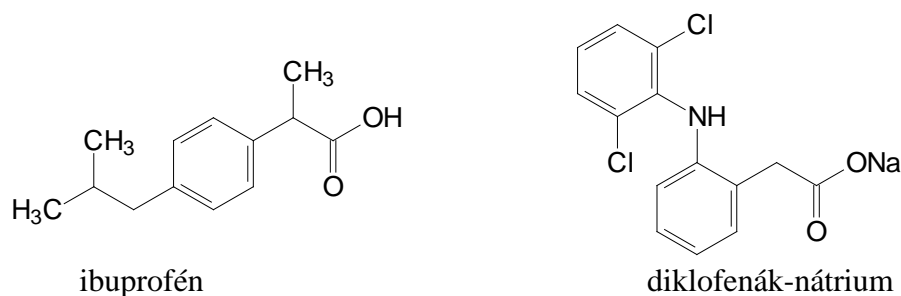
Feladat. Szteroid hormonok vékonyréteg-kromatográfias vizsgálata, azonosítása.

Ismeretlen összetételben szteroid hormonokat tartalmazó oldatok összetételét határozzuk meg, vékonyréteg-kromatográfias módszerrel, standard oldatok segítségével.

- Vizsgált anyagok:* hidrokortizon
hidrokortizon-acetát
ösztron
ösztradiol-benzoát
- Standard oldatok:* A standard anyagok 0,1%-os (1 mg/ml) oldatai, amelyek kloroform+ metanol 9:1 arányú elegyével készültek.
- Vizsgált oldatok:* A vizsgált anyagokat különböző összetételben tartalmazó, minden anyagra nézve 0,1%-os oldatok, amelyek kloroform+metanol 9:1 arányú elegyével készültek.
- Réteg:* Kieselgel G, 110 °C-on 1 órán át aktiválva
- A réteg kijelölése:* - a lemez alsó szélétől a startpontok távolsága: 2,0 cm
- az első és utolsó startpont távolsága a lemez szélétől: 2,0 cm
- a startpontok száma max. 9; egymástól való távolsága: 2,0 cm (ha kevesebb a startpont, akkor egyenlő távolságokra felosztva)
- a front távolsága a startpontoktól: 15,0 cm
- Felvitel:* A standard és a vizsgálandó oldatokból 10-10 µl-t cseppentünk fel a rétegre.
- Eluens:* kloroform + acetón 3:1 térfogatarányú elegye
(A szűrőpapírral bélelt kádat, a futtatás előtt, az eluenssel 30 percig telítjük.)
- Előhívás:* Tömény foszforsav + víz 1:1 arányú elegyével átnedvesedésig bepermetezzük a lemezt, ezután 120 °C-on 20 percig szárítjuk a kromatogramot.

Kiszámoljuk a standard anyagok, valamint a vizsgált anyagok foltjainak R_f értékeit, meghatározzuk a vizsgált oldat összetételét!

Feladat. Ibuprofén meghatározása fordított fázisú HPLC-UV-módszerrel diklofenák-nátrium belső standard mellett



Oldatkészítés:

Ibuprofén és diklofenák-nátrium standardokból 1-1 mM-os törzsoldatokat készítünk. A törzsoldatokból nátrium-hidrogénfoszfát 0,2 M vizes oldatát használva oldószerként hígítási sort készítünk úgy, hogy az egyes hígítási pontokhoz tartozó oldatok koncentrációja csak az ibuprofénre nézve különbözik, a diklofenák-nátrium tartalom mindegyik oldatban megegyezik. (A kalibrációs egyenes felvételekor a diklofenák-nátrium belső standardként szolgál.)

A kalibrációs egyenes felvételéhez készített hígítási sor oldataiban a standardok koncentrációi a következők:

- 1.) $25 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ibuprofén + $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ diklofenák-nátrium
- 2.) $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ibuprofén + $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ diklofenák-nátrium
- 3.) $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ibuprofén + $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ diklofenák-nátrium

Az így elkészült oldatok $20 \mu\text{l}$ -ét a HPLC-rendszerbe injektáljuk. A kapott kromatogramok görbe alatti területeit alapul véve kalibrációs egyenest szerkesztünk.

Ismeretlen oldat vizsgálata:

A kapott vizsgálandó oldatok $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ diklofenák-nátrium tartalom mellett számunkra ismeretlen koncentrációban tartalmazzak ibuprofént. Az oldatok $20 \mu\text{l}$ -ét HPLC-vel vizsgáljuk, a gyakorlat első felében szerkesztett kalibrációs egyenes segítségével meghatározhatjuk azok ibuprofén tartalmát ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$).

HPLC kondíciók:

- Oszlop – $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$, C18 fordított fázisú oszlop
- Eluens – acetonitril : $5 \text{ mM CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ puffer (pH=3,0) = 55 : 45
- Áramlási sebesség – $v = 1,0 \text{ ml/perc}$
- Detektálás - $\lambda = 220 \text{ nm}$

Kromatográfias teljesítményjellemzők kiszámítása:

Egy, az oszlopon meg nem kötődő inert anyag (retenció nélküli komponens, pl.: KNO_3 , tiokarbamid) oldatának injektálása lehetővé teszi a kromatográfias holtidő meghatározását.

A holtidő meghatározását követően számítsuk ki az alábbi kromatográfias teljesítményjellemzőket:

- redukált retenciós idő (t'_R)
- retenciós faktor (k')
- szelektivitás (α)
- felbontás (R_s)
- szimmetriafaktor (A_s)
- elméleti tányérszám (N)

V ANALITIKAI ELJÁRÁSOK VALIDÁLÁSA

Egy analitikai feladat megoldásakor mindig felmerül a kérdés, hogy a kapott eredmények mennyire tükrözik a vizsgált minta tényleges összetételét, milyen pontosak a mért értékek, milyen hibákat követhetünk el az adott módszer alkalmazása során stb. Ugyanakkor a módszer megítélése szempontjából az is fontos, hogy a kapott eredmények milyen biztonsággal ismételtetők, milyen a kapott adatok reprodukálhatósága. Ezekre a kérdésekre kapunk választ az analitikai módszer *validálása* során, ami a kémiai analízis gyakorlatában igen fontos követelmény.

A *módszerkidolgozás* során történik az analitikai feladat részletes megfogalmazása és jellemzése analitikai paraméterekkel, valamint az analitikai feladat megoldására alkalmas módszer kiválasztása és részletes dokumentálása. A *módszeralkalmasság vizsgálata*kor történik a módszer teljesítményjellemzőinek meghatározása az adott körülmények között.

A **validálás** tehát egy eljárás, ami során megfogalmazzuk az analitikai folyamat követelményeit és igazoljuk, hogy a vizsgált módszer rendelkezik azokkal a *teljesítményjelzőkkel*, amit az adott alkalmazás megkövetel, és az elvégzett eljárás megfelelő eredményeket szolgáltat. A validálás során a módszeralkalmasság komplex értékelése kell, hogy megtörténjen, ami az egyszerű matematikai statisztikai eljárások alkalmazásán túlmenően a szigorúan szabályozott és hiteles dokumentációt is magába foglalja.

Tulajdonképpen a validálás az az eljárás, amely bizonyítja, hogy a módszer alkalmas arra a célra, amire szánjuk.

A validálási eljárás a módszer olyan teljesítőképességi adatainak meghatározását jelenti, mint a pontosság, torzítatlanság, linearitás, kimutatási határ vagy a szelektivitás. Ismételten elvégzett vizsgálatok esetén további adatokra van szükség a mérések reprodukálhatóságáról, zavartűréséről is.

V.1 A mérések hibája

Minden mérési adat több-kevesebb hibával terhelt, ez azt jelenti, hogy egy adott kísérletet többször egymás után elvégezve, a mért eredmények kisebb-nagyobb mértékben eltérnek egymástól. Az analitikai eljárások során kapott eredmények megítélése szempontjából rendkívül fontos a mérési hiba nagyságának és típusának ismerete.

V.1.1 A mérőeszközök megválasztása

A mérőeszközöknek - attól függően, hogy mire tervezték őket - különböző az *érzékenység*e, a mérési pontossága. Közös jellemzőjük viszont, hogy a pontosságuk korlátozott. A digitális műszereknek éppúgy, mint a burettáknak vagy egy spektrofotométernek.

A mérőeszközöket, műszereket jellemezhetjük azok leolvasási pontosságával. A leolvasás pontosságát a leírt számadatok számjegyeinek számával juttatjuk kifejezésre. Például tömeg mérésére használhatunk táramérleget, amelyen 0,1 g pontossággal olvasható le a tömeg, míg egy analitikai mérlegen 0,0001 g pontossággal lehet tömeget meghatározni. Hasonlóképpen egy mérőhenger beosztása a legtöbbször 0,1 - 0,5 - 1,0 ml megállapítását teszi lehetővé, míg egy buretta 0,02 - 0,05 ml megállapítását biztosítja. Minden adatot a leolvasás lehetőségének megfelelően kell felírunk, vagyis annyi

számjeggyel, hogy az utolsó előtti számjegy még biztos legyen. Az utolsó számjegy értéke bizonytalan.

A mérésekhez mindig a célnak megfelelő érzékenységű, vagyis leolvasási pontosságú eszközöket kell használni. Ha a mért adatokból számítások útján kapjuk meg a mérés eredményét, az eredmény pontosságát mindig a legkevésbé érzékeny műszer pontossága határozza meg. A végeredmény tehát nem lehet annál pontosabb, mint amit a legkevésbé pontosan mérhető adat megszab.

Bár a hallgatói gyakorlatokon méréseinket leginkább térfogatmérő eszközökkel és mérlegekkel végezzük, a mérésekből levonható következtetések általánosak, vagyis éppúgy vonatkoznak a legmodernebb spektroszkópai módszerekre is.

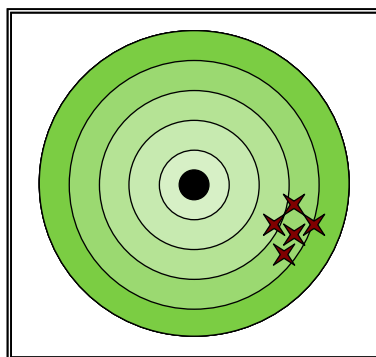
V.1.2 A mérési pontatlanság formái

A hibaforrások közül kiemelhetőek a mérőeszközök tökéletlensége, a kísérleti körülmények kismértékű változása és a kísérletet végző személlyel kapcsolatos szubjektív tényezők. A mérési hibákat két nagy csoportba oszthatjuk.

Szisztematikus hibák

A *szisztematikus* vagy *rendszeres hiba* forrása lehet a készülékek, eszközök pontatlansága (pl. nem megfelelően kalibrált mérőlombik, buretta, pipetta) a kísérleti körülmények helytelen megválasztása, rosszul megfogalmazott mérési utasítás, a művelet helytelen kivitelezése vagy az eredmények helytelen értékelése. Az ilyen hibák minden mérést azonos irányban és azonos mértékben befolyásolnak, vagyis torzítanak.

V-1. ábra: Szisztematikus mérési hibák – a torzítás



A **torzítás** tehát az alkalmazott eljárás során nyert mérési adatok átlagának a valódi (tényleges) értéktől való eltérése. A szisztematikus hibák függetlenek attól, hogy mennyire kis szórással lehet megismételni a méréseket, vagyis ha a torzítás nagy, akkor nagy pontosság esetén is jelentős lehet az eltérés a valódi értéktől (referencia mintától, irodalmi adattól).

Mivel a szisztematikus hiba nem növeli a mérések szórását, felismerése néha igen nehéz, viszont felismerése után korrigálható. Például a mérőeszközök kalibrálása segít az ilyen hibák elkerülésében.

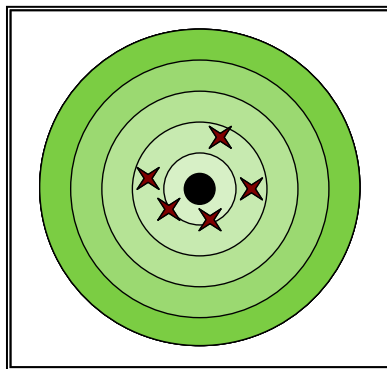
Véletlen hibák

Bármennyire körültekintően végzünk is el egy mérést, sohasem sikerül ugyanúgy megismételnünk, a mért értékek között mindig lesznek kisebb-nagyobb véletlenszerű eltérések. A *véletlen hibák* a véletlen megfigyelési és leolvasási hibákból, a kísérleti

feltételek kismértékű, ellenőrizhetetlen ingadozásából (pl. ingadozhat a hőmérséklet), egyes műveletek helytelen kivitelezéséből adódhat. Ezek a tényezők szabják meg a vizsgálat pontosságát.

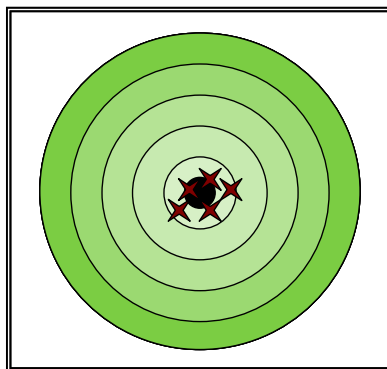
A **pontossággal** (*precision*) tehát azt jellemezzük, hogy a mérési eredmények mennyire térnek el a középértéktől. Kis pontosság esetén az egyes eredmények jelentős eltérést mutatnak az átlagtól.

V-2. ábra: Véletlen mérési hibák – a pontosság



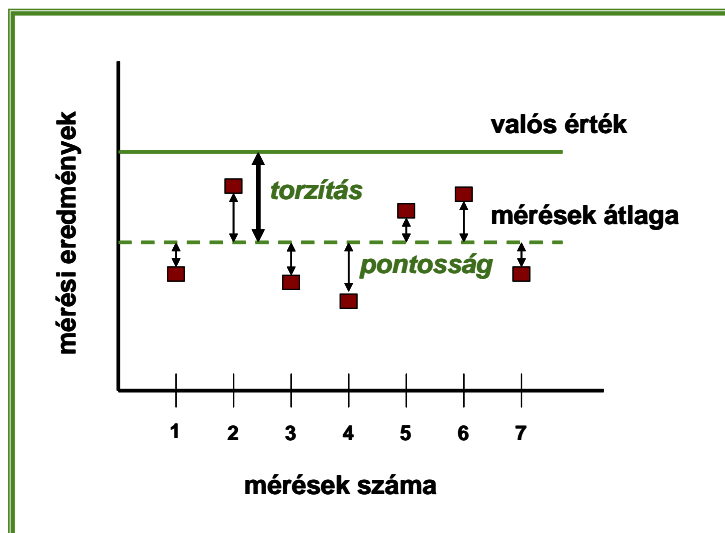
A mérések átlagát fogadjuk el a valódi érték lehető legjobb közelítésének. Általában igaz, hogy minél több mérést végzünk, annál közelebb kerül az átlag a valódi értékhez. Tehát a véletlen hibák nagysága több párhuzamos mérés elvégzésével csökkenthető, mivel a számtani átlagban a hibák kompenzálják egymást.

V-3. ábra: A véletlen hibák kiküszöbölése párhuzamos mérések révén



A mérési hibák grafikusan is jellemezhetőek:

V-4. ábra: A mérési hibák grafikus jellemzése



A *rendszeralkalmasság vizsgálata* során a használt műszerekkel és eszközökkel szemben követelmény, hogy feleljenek meg a specifikációnak, működjenek megfelelőképpen, legyenek kalibráltak. A *kalibrálás* célja a pontosság ellenőrzése, azoknak a műveleteknek az összessége, amelyekkel meghatározott feltételek között megállapítható az összefüggés a mennyiség mért értéke és a referenciával megvalósított megfelelő érték között.

Ugyanakkor az analitikussal szemben is követelmény, hogy legyen kompetens az adott területen, rendelkezzen elegendő ismerettel, hogy döntéseket hozzon.

A rendszeralkalmasság vizsgálatok arra is ki kell térni, hogy a mintavételezés és vizsgálati minták megfelelnek-e az adott analitikai feladatnak. A mintavételezés nagy gyakorlatot és szakmai hozzáértést igényel. A mintavételt végzőnek értenie kell a megoldandó problémát, ismernie kell a kapcsolódó kémiai folyamatokat.

A fenti követelmények betartásával az előforduló hibák visszaszoríthatók.

V.2 A validálás

V.2.1 A validálás folyamata

Egy módszer megfelelőségének igazolására, vagyis *módszervalidálásra* van szükség egy új módszer bevezetésekor, egy elismert módszer új feladatra történő kiterjesztésekor, illetve ha a módszer ellenőrzése hibát jelez.

Egy módszer validáláshoz hozzátartozik annak pontos, szigorú *dokumentálása* is. A dokumentumoknak tartalmaznia kell a módszer részletes, teljes körű leírását, azt az alkalmazó laboratórium körülményeihez adaptálva (műszerek, eszközök, vegyszerek, műveletek, standardok, oldatok készítése, minta-előkészítés, mérés menete, adatok kezelése, adatok feldolgozása stb.). A módszerleírásban szerepel a rendszeralkalmasság vizsgálatának dokumentálása is.

A dokumentáció részét képezi a *validálási terv*, illetve protokoll is. A validálási tervnek tartalmaznia kell a vizsgált analitikai paramétereket (teljesítményjelzőket) a

megfelelési adatokkal, az egyes paraméterek meghatározásához tartozó eljárások teljes körű leírását, valamint az elemzési eredmények feldolgozásának menetét.

A validálás folyamatáról *validálási jegyzőkönyvet* is kell készíteni, ami magába foglalja a protokoll szerint végrehajtott vizsgálatokat, a vizsgálati adatokat, az adatok feldolgozását, a validálás eredményeit és értékelését.

V.2.2 A validálási teljesítményjelzők

A validálás során tanulmányozott, értékelt analitikai jellemzők közül a legfontosabbak: a szelektivitás, specifikusság, a kimutatási határ, a meghatározási határ, a mérési tartomány, a linearitás, a torzítatlanság, a pontosság, a robusztusság.

Egy adott módszer validálásánál az *analitikai követelményekhez igazodóan* kell a validálásba bevont analitikai paramétereket kiválasztani. A következő táblázat néhány példát tartalmaz erre vonatkozóan:

V-1 táblázat: Az analitikai módszer validálásának szempontjai

| Analitikai követelmények | Kapcsolódó teljesítményjelzők |
|---|---|
| Kvalitatív vagy kvantitatív elemzés szükséges? | Azonosság igazolása Szelektivitás / specifikusság Kimutatási határ Meghatározási határ |
| Több formában is jelen van a vizsgálandó komponens a mintában? Szükséges-e a különböző formák megkülönböztetése? | Azonosság igazolása Visszanyerés |
| Milyen komponensek meghatározása szükséges? Mekkora a vizsgált komponens várható koncentrációja? | Azonosság igazolása Kimutatási határ Meghatározási határ Analitikai (mérési) tartomány |
| Milyen pontosságú elemzésre van szükség? Milyen mérési bizonytalanság engedhető meg? | Visszanyerés Pontosság, torzítatlanság Ismételhetőség |
| Milyen zavaró hatásokkal kell számolni? | Szelektivitás Specifikusság |
| A módszert több laboratórium is használja? | Pontosság Reprodukálhatóság Robusztusság |

A következő táblázat összefoglalja a validálási teljesítményjelzőket, amelyek meghatározása indokolt az analitikai folyamat különböző formáiban. (ICH Harmonised Tripartite Guideline alapján)

V-2 táblázat: Validálási teljesítményjelzők áttekintése

| Vizsgálandó teljesítményjelzők | Azonossági vizsgálat | Szennyezés vizsgálat | | Tartalmi meghatározás |
|--------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| | | Mennyiségi meghatározás | Limit meghatározás | |
| Torzítatlanság | - | + | - | + |
| Pontosság | | | | |
| Ismételhetőség | - | + | - | + |
| Specifikusság | + | + | + | + |
| Kimutatási határ | - | - | + | - |
| Meghatározási határ | - | + | - | - |
| Linearitás | - | + | - | + |
| Meghatározási tartomány | - | + | - | + |

Szelektivitás, specifikusság

A szelektivitást és a specifikusságot gyakran felcserélhető fogalomként alkalmazzák, de a két fogalom nem azonos.

Egy módszer **szelektív**, ha a kapott válaszjel egy vagy több, hasonló anyagtól származik. A szelektivitással azt adjuk meg, hogy az adott módszer képes-e az összes lehetséges meghatározandó komponens kimutatására vagy meghatározására zavaró alkotók jelenlétében. **Specifikus** a módszer, ha a válaszjel csak egy komponenstől származik, vagyis a módszer a meghatározandó komponensre tökéletesen szelektív.

A szelektivitás és specifikusság a módszer jóságát, illetve megbízhatóságát jellemzi zavaró komponensek jelenlétében. A kvalitatív és kvantitatív módszerekre is vizsgálandó paraméterek.

Torzítatlanság (accuracy), helyesség

A **torzítatlanság** megmutatja, hogy az alkalmazott eljárás során nyerhető adatokból származó eredmények mennyire térnek el az elfogadott referencia, vagyis tényleges ("valódi") értéktől. Egy módszer annál helyesebb, minél kisebb a várható érték és a valódi érték különbsége. Egy módszer torzítását a szisztematikus hibák okozzák, ahogy azt már korábban is láthattuk.

A torzítatlanság vizsgálatának főbb módszerei: hiteles referencia minták vizsgálata, a módszer összevetése független módszerrel, a módszer összevetése ismert helyességű módszerrel stb. A módszerek alapvetően abban különböznek, hogy milyen módon nyerjük a referenciaértéket.

Pontosság (precision)

A **pontosság** a mérési eredmények középértéktől való eltérését jellemzi. A mérés, vizsgálat véletlenszerű változásait jellemző adat.

A pontosság több fogalmat is takar, többek között az eredmény megismételhetőségét és reprodukálhatóságát.

Az **ismételhetőség (repeatability)** azt fejezi ki, hogy egy laboratóriumon belül a kísérleti paraméterek véletlenszerű, kis változása milyen mértékben befolyásolja a végeredményt kis időintervallumon belül. A **laboratóriumon belüli pontosság** az azonos körülmények között (azonos személy, műszer, reagens stb.), rövid időintervallumon belül elvégzett mérések *standard deviációjával* jellemezhető (lásd később).

A **reprodukálhatóság** (*reproducibility*) az azonos módszerrel (azonos eljárások és paraméterek), de eltérő körülmények között (más analitikus, más laboratórium, más műszer, hosszú időintervallum) elvégzett mérések eredményeit hasonlítja össze, vagyis a *laboratóriumok közötti pontosságot* jellemzi. Akkor van értelme meghatározni, ha egy módszert több laboratórium is használ.

Kimutatási határ (limit of detection, LOD)

A **kimutatási határ** az a legkisebb koncentráció vagy mennyiség, amikor a kapott válaszjel egyértelműen a vizsgált anyagtól származik, vagyis amit a módszerrel már megbízhatóan detektálni lehet. Meghatározása a vizsgálni kívánt anyagot nem tartalmazó referencia minta segítségével történik.

A kimutatási határ adott jel/zaj viszonyhoz kötődik: az alapvonalzaj (ami a vakérték szórása) háromszorosának megfelelő magasságú jelet adó koncentráció. ($J/Z=3$). A vakérték szórását a mintával azonos feltételek mellett kell meghatározni.

Meghatározási határ (limit of quantitation, LOQ)

A **meghatározási határ** azt a legkisebb koncentrációt jelenti, amely még megfelelő pontossággal és torzítatlansággal meghatározható. Értéke becsülhető a kimutatási határ alapján, általában annak 2-3-szorosa.

Meghatározási, mérési tartomány

A **meghatározási tartomány** az a koncentráció-tartomány, ahol a minta kellő pontossággal és torzítatlansággal meghatározható, tehát az az intervallum, amelyen belül az eljárás helyes eredményt szolgáltat. Alsó korlátja a meghatározhatósági határ (LOQ), felső korlátai a mérőműszer fizikai teljesítőképessége, illetve az analitikai függvény tulajdonságai (linearitás, RSD%).

Linearitás

A kalibráló görbe **linearitásán** azt értjük, hogy a görbe adott tartományában, az ún. *lineáris tartományban*, adott megbízhatósággal lineárisnak mondható. A linearitást a méréstartományt lefedő koncentrációjú minták elemzésével határozzuk meg. A linearitás meghatározását, a regressziós egyenes jellemzését lásd később.

A linearitás meghatározása az olyan mennyiségi meghatározásoknál alapvető fontosságú, ahol elvárt, hogy a detektor által szolgáltatott jel egyenes arányban legyen a vizsgálandó oldat koncentrációjával.

Robosztusság (robustness)

Egy módszer zavartűrésének vizsgálata annak igazolására irányul, hogy az adott módszer hogy viseli a kisebb változásokat a működés körülményeiben. A robusztusság vizsgálat így a módszer használatának *validált rugalmasságát* jelenti.

Ha különböző laboratóriumok ugyanazt a módszert használják, akkor elkerülhetetlenül jelentkeznek olyan apró eltérések (analitikusok, készülékek, hőmérséklet stb.), amelyeknek esetleg számottevő hatásuk lehet a módszer teljesítményére. A zavartűrés vizsgálat eredményeiből az egyes működési paraméterekre küszöbértékek állapíthatók meg.

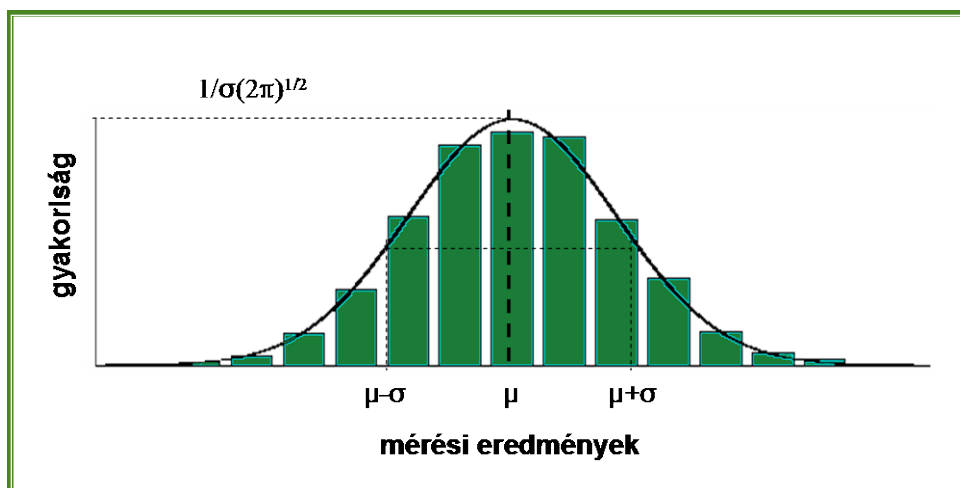
A különböző változtatások hatását már általában a módszerfejlesztés stádiumában megvizsgálják, és ez alapján határozzák meg a legalkalmasabb paramétereket és kísérleti körülményeket.

A rendszer-alkalmassági vizsgálat fontos része az elemzéseknek, az adott vizsgálat csak a megadott követelmények (kimutathatóság, jó elválasztás, torzítatlanság, kis szórás, stb.) teljesülése esetén fogadható el. Ezáltal bizonyítjuk, hogy az egész rendszer és módszer alkalmas arra a célra, amire alkalmazzuk.

V.3 A mérési eredmények statisztikai jellemzése

Tételezzük fel, hogy egy mérési sor eredményeit csak véletlen hiba terheli, és ábrázoljuk a mérési adatok előre meghatározott intervallumok szerinti gyakoriságát, akkor információt nyerhetünk a mérési eredmények eloszlásáról. Ha a mérések számát a végtelenségig növelnénk, és a meghatározott intervallumok nagyságát pedig ezzel párhuzamosan csökkentenénk, akkor egy harang alakú eloszlási görbét kapunk, amelyet *Gauss-* vagy *normális eloszlású görbének* neveznek.

V-5. ábra: Normál eloszlású görbe



A Gauss-féle eloszlás matematikailag a következőképpen fejezhető ki:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

ahol

$f(x)$ = a normális eloszlás eloszlásfüggvénye

σ = a mérések standard deviációja

μ = a mérések átlaga

x = az adott mérési eredmény.

A mérési adatok szóródását az átlag körül a standard deviáció írja le.

Mivel azonban a valóságban csak véges számú méréseket tudunk végezni, az átlagot és a standard deviációt meg kell becsülnünk. A becsült paramétereket tartalmazó Gauss-eloszlás ily módon a következőképpen alakul:

$$f(x) = \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\bar{x})^2}{2s^2}}$$

ahol

s = a standard deviáció becslt (legvalószínűbb) értéke

\bar{x} = az átlag becslt (legvalószínűbb) értéke

V.3.1 Egy mérésorozat eredményeinek jellemzése

A mérési eredmények **átlaga** a mért adatok egyszerű számtani közepe:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

ahol

n = mérések száma

A mérés pontosságának, vagyis a mért adatok átlagtól való eltérésének mértékét matematikailag a **szórás** (*standard deviáció*) jellemzi, amit az átlagtól való eltérések négyzeteinek segítségével számolhatunk ki:

$$s = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

A pontosságot az *átlag ± szórás* alakban szoktuk jellemezni. Ez azonban nem azt jelenti, hogy minden egyes mérésnek közelebb kell lennie az átlaghoz, mint a szórás. Az egyes mérések eredményei - az x_i véletlen számok eloszlásától függően - általában az *átlag ± 3s* környezetébe esnek.

A **variancia** a szórás négyzetével (s^2) egyenlő.

Ha a mérés jellemzése helyett a mérés eredményét (a mért fizikai mennyiséget) akarjuk megadni, akkor helyesebb az átlagot, és annak szórását közölni. Az **átlag szórása** pedig:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

A szórás nagysága a mért értékek és természetesen a középérték nagyságától függ. Könnyebben összehasonlítható adatokat kapunk, ha a szórás értékét az átlagra vonatkoztatjuk és a **relatív szórás**t vagy **variációs koefficiens**t (RSD%) adjuk meg:

$$\text{variációs koefficiens} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Viszonylag kevés mérési adat esetén a mérési adatok hibaeloszlását az ún. *Student-féle valószínűségi sűrűségfüggvény* írja le. A mérési eredmények átlagának és a szórás ismeretében meghatározható az az intervallum, amibe előre meghatározott

valószínűséggel esik bele a *várható érték* (μ). (Nagyszámú minta esetén \bar{x} eléri μ értékét.) Ezt az intervallumot a várható érték becslésére szolgáló **konfidencia intervallumnak** nevezzük. A várható értéket pontosan nem tudjuk, de átlag körül van és nagy $(1-\alpha)$ valószínűséggel esik ebbe az intervallumba, és csak kicsi (α) valószínűséggel esik ezen kívülre. Leggyakrabban 90 vagy 95%-os megbízhatósági szintet választunk, vagyis α értéke 0,1 illetve 0.05. Az átlagra vonatkozó megbízhatósági intervallum tehát:

$$\mu = \bar{x} \pm t_{(\alpha, n-1)} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

ahol

$n-1$ = a szabadsági fokok száma

$t_{(\alpha, n-1)}$ = a *Student*-féle táblázatból származó adat.

t értéke tehát függ a mérések számától és a megbízhatósági szinttől

V-3 táblázat: Student-féle t értékek (részlet a táblázatból)

| Szabadsági fokok száma | Megbízhatósági szint (%) | | |
|------------------------|--------------------------|--------|--------|
| | 90 | 95 | 99 |
| 1 | 6,314 | 12,706 | 63,656 |
| 2 | 2,920 | 4,303 | 9,925 |
| 3 | 2,353 | 3,182 | 5,841 |
| 4 | 2,132 | 2,776 | 4,604 |
| 5 | 2,015 | 2,571 | 4,032 |
| 6 | 1,943 | 2,447 | 3,707 |
| 7 | 1,895 | 2,365 | 3,500 |
| 8 | 1,860 | 2,306 | 3,355 |
| 9 | 1,833 | 2,262 | 3,250 |
| 10 | 1,812 | 2,228 | 3,169 |
| 15 | 1,753 | 2,131 | 2,947 |
| 20 | 1,725 | 2,086 | 2,845 |
| 25 | 1,708 | 2,060 | 2,787 |
| 30 | 1,697 | 2,042 | 2,750 |
| ∞ | 1,645 | 1,960 | 2,576 |

A gyakorlatban arra törekszünk, hogy az eredményeinket minél szűkebb korlátok közé szorítsuk. A *konfidencia intervallum* kiszámítása alapján látható, hogy ezt a t érték csökkentésével, vagy az n növelésével tudjuk elérni. A táblázatból kitűnik, hogy a t értékek a mérések számának növelésével csökkennek ugyan, de pl. 95%-os megbízhatósági szint mellett 2 és 4 mérésszám (1 és 3 szabadsági fok) között a csökkenés jelentős, 5 és 25 mérésszám (1 és 24 szabadsági fok) között már nem számottevő. Ha tehát az a célunk, hogy eredményünket lehetőleg szűk határok közé szorítsuk, legalább 5-6 párhuzamos mérést érdemes végeznünk. Nem kapunk lényegesen jobb eredményt akkor sem, ha ennél jóval több, pl. 15-20 mérést végeznénk. Lényegesen jobb eredményt akkor kaphatunk, ha kb. 30 mérést végzünk el, ugyanis ilyen nagy mintaszámnál már a normál eloszlást követi a valószínűségi sűrűségfüggvény.

V.3.2 Méréssorozatok összehasonlítása

A viszonylag kevés adatra támaszkodó matematikai statisztika lehetőséget ad arra is, adott módszerrel különböző időben vagy helyen, más-más személyek által kapott eredményeket összehasonlítsuk, vagyis megállapíthatjuk, hogy a két mérési sorozat eredménye azonosnak mondható-e, vagy szignifikáns különbség van közöttük. Ennek érdekében *hipotézisvizsgálatokat* végzünk.

Legyen a *nullhipotézis*ünk (H_0): $\mu_1 = \mu_2$, vagyis a várható értékek megegyeznek egymással.

Megválasztjuk a *szignifikanciaszintet* (α), ami annak a valószínűsége, hogy H_0 -t elvetjük, amikor valójában igaz.

A cél, hogy *kétmintás t-próba* elvégzése során összevessük a méréssorozatok középértékeit, de ehhez előzetesen el kell végezni az *F-próbát*, amikor azt vizsgáljuk, hogy a két méréssorozat szórása között van-e szignifikáns eltérés.

Az **F-próba** próbastatisztikája:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

ahol $s_1^2 \geq s_2^2$ ($F \geq 1$). A számított F értéket össze kell vetni a két mérés szabadsági fokához (szabadsági fokok: $f_1=n_1-1$ és $f_2=n_2-1$) tartozó kritikus F értékkel, ami a kritikus F értékeket tartalmazó táblázatból kiolvasható.

V-4 táblázat: Kritikus F értékek 95%-os megbízhatósági szint mellett

| n_2-1 | Szabadsági fokok száma: n_1-1 | | | | | | | | | | | | |
|----------|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 15 | 20 | 30 | ∞ |
| 2 | 19,0 | 19,2 | 19,2 | 19,3 | 19,3 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,5 | 19,5 |
| 3 | 9,55 | 9,28 | 9,12 | 9,01 | 8,94 | 8,89 | 8,84 | 8,81 | 8,79 | 8,70 | 8,66 | 8,62 | 8,53 |
| 4 | 6,94 | 6,59 | 6,39 | 6,26 | 6,16 | 6,09 | 6,04 | 6,00 | 5,96 | 5,86 | 5,80 | 5,75 | 5,63 |
| 5 | 5,79 | 5,41 | 5,19 | 5,05 | 4,95 | 4,88 | 4,82 | 4,77 | 4,74 | 4,62 | 4,56 | 4,50 | 4,36 |
| 6 | 5,14 | 4,76 | 4,53 | 4,39 | 4,28 | 4,21 | 4,15 | 4,10 | 4,06 | 3,94 | 3,87 | 3,81 | 3,67 |
| 7 | 4,74 | 4,35 | 4,12 | 3,97 | 3,87 | 3,79 | 3,73 | 3,68 | 3,64 | 3,51 | 3,44 | 3,38 | 3,23 |
| 8 | 4,46 | 4,07 | 3,84 | 3,69 | 3,58 | 3,50 | 3,44 | 3,39 | 3,35 | 3,22 | 3,15 | 3,08 | 2,93 |
| 9 | 4,26 | 3,86 | 3,63 | 3,48 | 3,37 | 3,29 | 3,23 | 3,18 | 3,14 | 3,01 | 2,94 | 2,86 | 2,71 |
| 10 | 4,10 | 3,71 | 3,48 | 3,33 | 3,22 | 3,14 | 3,07 | 3,02 | 2,98 | 2,84 | 2,77 | 2,70 | 2,54 |
| 15 | 3,68 | 3,29 | 3,06 | 2,90 | 2,79 | 2,71 | 2,64 | 2,59 | 2,54 | 2,40 | 2,33 | 2,25 | 2,07 |
| 20 | 3,49 | 3,10 | 2,87 | 2,71 | 2,60 | 2,51 | 2,45 | 2,39 | 2,35 | 2,20 | 2,12 | 2,04 | 1,84 |
| 30 | 3,32 | 2,92 | 2,69 | 2,53 | 2,42 | 2,33 | 2,27 | 2,21 | 2,16 | 2,01 | 1,93 | 1,84 | 1,62 |
| ∞ | 3,00 | 2,60 | 2,37 | 2,21 | 2,10 | 2,01 | 1,94 | 1,88 | 1,85 | 1,67 | 1,57 | 1,46 | 1,00 |

Ha a két mérési sorozat szabadsági fokához tartozó számolt F érték kisebb, mint a táblázatbeli F érték, akkor a két szórás *azonosnak* mondható, köztük szignifikáns különbség nincs.

A **kétmintás t-próba** próbastatisztikája:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_d}$$

ahol s_d a közös szórás.

Amennyiben a két szórás között *nincs* szignifikáns eltérés, a közös szórás számolása a következőképpen történik:

Ha $n_1 = n_2 = N$:

$$s_d = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{N}}$$

Ha $n_1 \neq n_2$:

$$s_d = \sqrt{\frac{[s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)](n_1 + n_2)}{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}}$$

Ebben az esetben a szabadsági fok száma: $f = n_1 + n_2 - 2$.

Amennyiben a két szórás között szignifikáns különbség van, a közös szórás számolása a következő képlet szerint történik:

$$s_d = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

A szabadsági fok meghatározásához a következő képletek felhasználásával történik:

$$f = \frac{(n_1 - 1)(n_2 - 1)}{C^2(n_2 - 1) + (1 - C)^2(n_1 - 1)} \quad C = \frac{s_1^2 n_2}{s_1^2 n_2 + s_2^2 n_1}$$

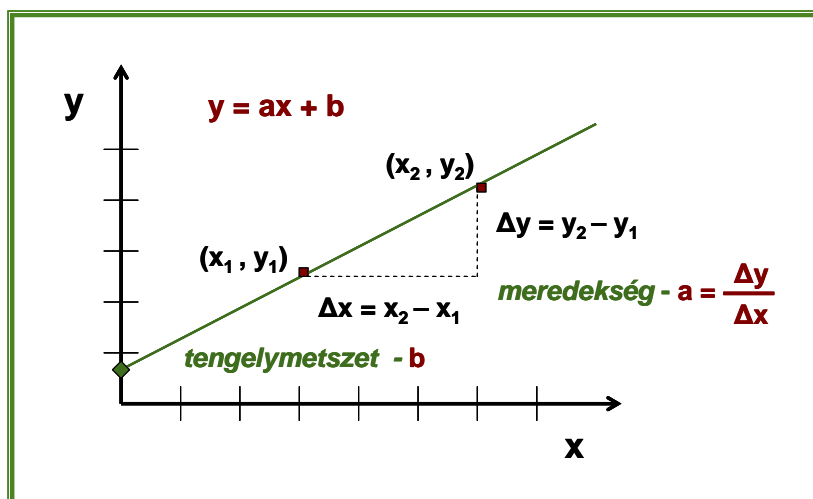
Végül a próbastatisztika kiszámolt t értékét összevetjük p valószínűségi szint mellett és adott szabadsági fokhoz tartozó kritikus t értékkel a *t-eloszlás táblázatból*. Amennyiben a számolt t érték kisebb, mint a *Student*-féle táblázatban megadott kritikus t érték, akkor a két középérték *azonosnak* tekinthető.

Tehát, ha a számolt t érték nagyobb, mint a kritikus t érték, akkor a nullhipotézist elvetjük.

V.4 A linearitás jellemzése

Lineáris az a mérési tartomány, ahol a koncentráció és a válaszjel közötti függvénykapcsolat az $y = ax + b$ egyenlettel leírható, ahol a érték a meredekséget, és b érték a tengelymetszetet jelöli. Vizsgálata a várható érték 50-100%-a között célszerű.

V-6. ábra: A linearitás jellemzése



V.4.1 A regressziós egyenes paramétereinek meghatározása

Az egyenlet paramétereinek meghatározásához legalább 5-6 mérési pontra és "vak" mintára van szükség. A paraméterek számolásához célszerű a mérési adatokat tartalmazó táblázatot készíteni:

V-5 táblázat: A regressziós egyenes paramétereinek kiszámolását segítő táblázat

| x | y | xy | x ² | y ² |
|----------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| x ₁ | y ₁ | x ₁ y ₁ | x ₁ ² | y ₁ ² |
| x ₂ | y ₂ | x ₂ y ₂ | x ₂ ² | y ₂ ² |
| ... | ... | ... | ... | ... |
| ... | ... | ... | ... | ... |
| x _i | y _i | x _i y _i | x _i ² | y _i ² |
| Σx | Σy | Σxy | Σx ² | Σy ² |
| \bar{x} | \bar{y} | | | |

A számításhoz szükséges összefüggések:

$$Q_x = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \quad Q_y = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \quad Q_{xy} = \sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}$$

Az egyenes **meredeksége** (iránytangens):

$$a = \frac{Q_{xy}}{Q_x}$$

A **tengelymetszet**:

$$b = \frac{\sum x^2 \cdot \sum y - \sum x \cdot \sum xy}{n \cdot Q_x}$$

V.4.2 A regressziós egyenes statisztikai értékelése

A **korrelációs együttható**, vagyis 2 mennyiségi ismerv közötti kapcsolat szorossága:

$$r = \frac{Q_{xy}}{\sqrt{Q_x \cdot Q_y}}$$

A determinációs koefficiens (r^2) arra utal, hogy y szóródásából x hány %-ot magyaráz meg.

A *meredekség szórása*, valamint a *tengelymetszet szórása* az alábbi összefüggések alapján számolható:

$$s_a = \sqrt{\frac{Q_y - a^2 \cdot Q_x}{(n-2) \cdot Q_x}} \qquad s_b = s_a \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$$

Az ún. maradék, illetve *reziduális szórás* számítása:

$$s_e = \sqrt{\frac{Q_y - Q_{xy}^2}{n-2}}$$

A linearitás elfogadásának kritériuma, hogy a tengelymetszet érték (b) ne különbözzön szignifikánsan a 0 értéktől, azaz a tengelymetszet konfidencia intervalluma [$b \pm t_{\alpha, n-2} \cdot s_b$] tartalmazza a 0 értéket. További követelmény, hogy a regressziós koefficiens értéke a mérés típusának megfelelően, lehetőség szerint minél közelebb legyen 1-hez, valamint a reziduumok ($e_i = y - y_i$) ne mutassanak semmilyen tendenciát.

VI Nem-gyógyszerkönyvi fizikai és fizikai-kémiai vizsgálatok

VI.1 A savi disszociációs állandó fogalma, jelentősége és meghatározásának módszerei

A hatóanyag szerkezetbeni sorsát a hatóanyag és a szerkezet molekulái közötti kölcsönhatás határozza meg. A hatóanyag szempontjából a gyógyszerhatás kialakulásában szerepet játszó fizikai-kémiai tulajdonságok az oldhatóság, az ionizációs képesség, a lipofilitás és a permeabilitás.

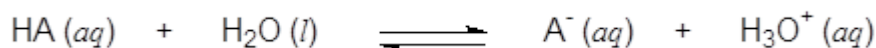
Mivel a szerkezet molekulái és a hatóanyagok között kialakuló kölcsönhatások fontos tényezői az ionos kölcsönhatások is, amit elsősorban a molekula protonáltsági állapota határoz meg, így a hatóanyag sav-bázis tulajdonságainak ismerete nélkülözhetetlen a hatás kialakulásának megértésében.

a.) A pK_s érték fogalma

Brönsted-Lowry sav-bázis elmélete szerint a **savak** (általánosan HA) protont képesek leadni, azaz protondonorok, míg a **bázisok** (általánosan B) protont képesek felvenni, azaz protonakceptorok. A sav-bázis reakciókban *konjugált sav-bázis párok* szerepelnek. A sav protonvesztéssel a konjugált bázisává alakul át, míg egy bázis proton felvétellel a konjugált savvá alakul.



A savak híg vizes oldatokban fennálló protonátviteli egyensúlyait a protolitikus reakció egyensúlyi állandójával jellemezhetjük.



$$K_s = \frac{[\text{A}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}]}$$

A sav disszociációállandóját leíró összefüggésben a víz, mint nagy feleslegben jelen levő oldószer aktivitását egységnyinek tekintjük.

A K_a tulajdonképpen a sav egyszerűsített disszociációs egyensúlyának felel meg.



Az összefüggésből látható, hogy a sav erőssége annál nagyobb, minél nagyobb K_a értéke. Az erős savak (pl. HCl, HNO₃, H₂SO₄ első disszociációs lépése) esetén a fenti disszociáció gyakorlatilag 100%, vagyis teljesen disszociálnak. Így erős savak esetében a K_a értéke gyakorlatilag végtelen nagy.

A közép- és gyenge savakban a disszociáció kisebb mértékű, a disszociáció mértéke az egyensúlyi hidrogénion-koncentrációból és az összes savkoncentrációból számítható.

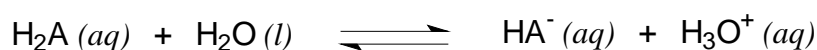
$$\text{disszociáció \%} = \frac{[\text{H}^+]}{[\text{HA}]_{\text{összes}}} \cdot 100$$

A savak disszociációs egyensúlyait - mivel az egyensúlyi állandók értékei nagyon széles tartományba esnek - célszerűbb a pK_s értékekkel, vagyis a K_a értékek 10-es alapú negatív logaritmusának értékeivel jellemezni.

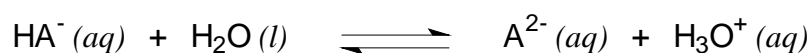
$$pK_s = -\log K_s$$

Savak esetében minél kisebb a pK_s érték, annál erősebb a sav, és mivel logaritmikus skáláról van szó, így a pK_s értékben egy egységnyi eltérés 10-szeres különbséget jelent savi erősségben.

Többértékű savak több lépésben disszociálnak. A savas karakterű csoportok számával megegyező, lépcsőzetes protonálódási állandó definiálható. A második savi disszociációs állandó általában több nagyságrenddel kisebb, mint az első, mert a már negatív töltésű HA^- anionból sokkal nehezebb eltávolítani egy protont, mint a semleges (H_2A) részecskéből.

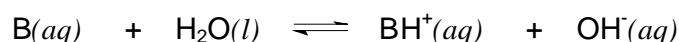


$$K_{s1} = \frac{[\text{HA}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_2\text{A}]}$$



$$K_{s2} = \frac{[\text{A}^{2-}][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}^-]}$$

A proton megkötésére képes *gyenge bázisok* vizes oldatban az alábbi egyensúllyal jellemezhetők.



A bázis protonálódási állandója a következőképpen definiálható:

$$K_b = \frac{[\text{BH}^+][\text{OH}^-]}{[\text{B}]}$$

Minél nagyobb K_b érték, a bázis erőssége annál nagyobb. Az erős bázisok vizes oldatban gyakorlatilag teljesen protonált állapotban vannak, míg a gyenge bázisok vizes oldatban csak részben protonálódnak. A gyenge savak anionjai, vagyis konjugált bázis párjai viszonylag erős bázisoknak tekinthetők. Az erős savak anionjai pedig viszonylag gyenge bázisoknak számítanak.

Egy sav és konjugált bázis párjának disszociációs állandóinak szorzata a víz ionszorzatával egyenlő.

$$K_s \cdot K_b = K_v$$

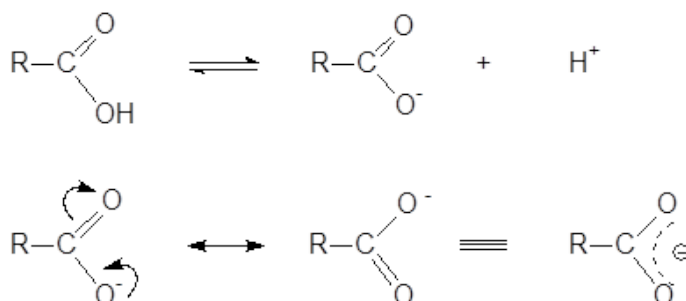
A K_b állandó helyett ma a bázisok erősségének kifejezésére is a K_a (pK_s) értéket használjuk, ami a bázis konjugált sav formájának disszociációs állandója ($pK_s = \log K_b$).

b.) Savas és bázikus funkciós csoportok

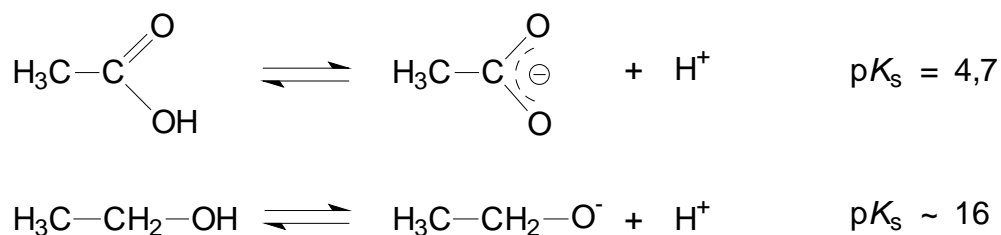
A gyógyszerként használt vegyületek legnagyobb része tartalmaz valamilyen savas vagy/és bázikus karakterű funkciós csoportot.

c.) Savas funkciós csoportok

A gyógyszervegyületek körében a leggyakrabban előforduló savas karakterű funkciós csoport a *karbonsavcsoport*. A karbonsavak pK_s értéke széles határok között mozog, $pK_s = 2-7$ közötti tartományban. A karbonsavcsoport deprotonálódáskor keletkező karboxilátionban a két oxigénatom egyenrangú, a csoport rezonancia révén stabilizálódik.

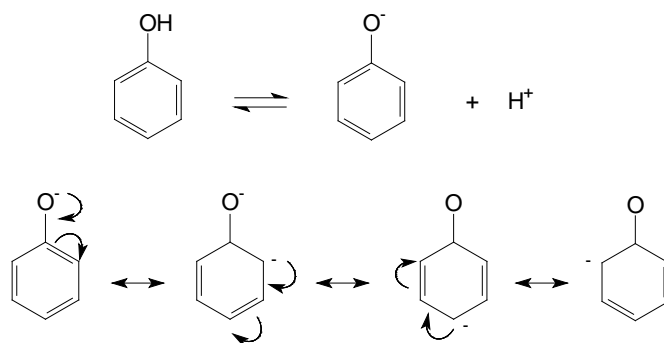


A rezonancia stabilizáló hatását jól demonstrálja, ha összehasonlítjuk például az ecetsav és az etanol savi erősségét. Mindkét molekula elviekben képes proton leadására, de míg az ecetsavból képződő acetát ion stabilizálódik, a negatív töltés megoszlik, addig az etanolból képződő etanolát anionban a töltés csak az oxigénatomhoz köthető.



Az ecetsav pK_s értéke 4,7; az etanol pK_s értéke 16 körüli, vagyis az ecetsav kb. 10^{11} -szer erősebb sav, mint az etanol. Az alkoholos hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületek a víznél is gyengébb savak, így biológiai közegben semlegesnek tekinthetők.

A *fenolcsoport* is igen gyakori a gyógyszervegyületek körében. A fenolok az alkoholoknál jóval erősebb savak, pK_s értékük 9-11 közötti. A deprotonálódáskor képződő anion szintén rezonancia révén stabilizálódik.



Az *enolcsoportok* szintén savas karakterűek, főleg elektronszívó szubsztituensek jelenlétében.

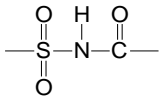
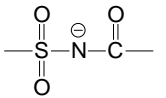
A szulfonsavszármazékoknak tekinthető *szulfonsavamidok* az N-H savak közé tartoznak, úgy, mint az *imidek* is, amikor a karbonsavamid nitrogénjéhez egy másik acilcsoport kapcsolódik.

A C-H aciditás jellegzetes példája a fenilbutazon ($pK_s=4,4$).

Az alábbi táblázat néhány, gyógyszervegyületekben is gyakran előforduló funkciós csoport savi disszociációs állandóját tartalmazza.

VI-1 táblázat: Gyógyszervegyületekben gyakran előforduló funkciós savas karakterű csoportok savi disszociációs állandói

| Sav | | Konjugált bázis | | pK_s | Példa |
|-----|--------------------|---|----------------------|--------|---------------------------------------|
| | karbonsav | | karboxilát | 2-7 | Acetilszalicilsav (3,4) |
| | fenol | | fenolát | 9-11 | Paracetamol (9,6) |
| | enol | | enolát | 2-6 | Piroxikám (2,3) Aszkorbinsav (4,2) |
| | tiol | | tiolát | 8-11 | Kaptopril (9,8) |
| | imid | | imidát | 9-10 | Teobromin (10) Fenitoin (8,3) |
| | szulfonamid | | szulfonamidát | 9-10 | Hidroklorotiazid (9,7 és 8,7) |
| | N-aryl-szulfonamid | <td>N-aryl-szulfonamidát</td> <td>6-8</td> <td>Szulfadimidin (7,5)</td> | N-aryl-szulfonamidát | 6-8 | Szulfadimidin (7,5) |

| Sav | | Konjugált bázis | | pK _s | Példa |
|---|-------------|---|---------------|-----------------|---------------------|
|  | szulfonimid |  | szulfonimidát | 5-6 | Szulfacetamid (5,4) |

d.) Bázikus funkciós csoportok







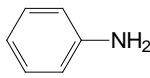
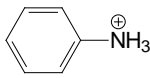
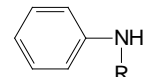
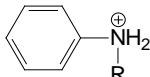
A bázikus funkciós csoportok igen gyakoriak a gyógyszervegyületek körében. A bázikus karakter a molekulákban levő nitrogénhez köthető, amennyiben a nitrogén nemkötő elektronpárja "szabad", vagyis képes protont megkötni. Ha azonban a nemkötő elektronpár nem szabad, akkor a nitrogén nem bázikus karakterű, mint például az amidok esetében, ahol a nemkötő elektronpár konjugációban vesz.

A prokain molekulában egyszerre fordul elő aromás primer aminocsoport, illetve alifás terciér amino csoport. A terciér amino csoport viszonylag erős bázis (pK_s = 9,0), hiszen szabad nemkötő elektronpárja révén képes proton megkötésére. Az aromás primer aminocsoport azonban igen gyengén bázikus karakterű (pK_s = 2,5), mert a nitrogén nemkötő elektronpárja részt vesz a benzol gyűrű elektronjainak delokalizációjában.

A nitrogént tartalmazó aromás heterociklusos vegyületek bázicitása szintén attól függ, hogy a nitrogénen található-e nemkötő elektronpár. Így például az öttagú gyűrűs aromás pirrol gyakorlatilag nem tekinthető bázisnak (pK_s = -0,27), mert a π-elektron szextett kialakításában részt vesz a nemkötő elektronpár is, tehát nem tud protont megkötni. Viszont a hattagú gyűrűs piridinben levő nitrogén gyengén bázikus karakterrel rendelkezik (pK_s = 5,2), képes proton megkötésére.

Az alábbi táblázat a gyógyszervegyületekben is gyakran előforduló bázikus karakterű funkciós csoport konjugált sav formájának disszociációs állandóját tartalmazza.

VI-2 táblázat: Gyógyszervegyületekben gyakran előforduló bázikus karakterű funkciós csoportok konjugált sav formáinak savi disszociációs állandói

| Bázis | | Konjugált sav | | pK _s | Példa |
|---|---------------------------|---|-----------|-----------------|---------------------------------|
|  | alifás primer amin |  | -ammónium | 8-10 | Amfetamin (9,8) |
|  | alifás szekunder amin |  | -ammónium | 8-10 | Efedrin (9,6) |
|  | alifás terciér amin |  | -ammónium | 8-10 | Lidokain (7,9) Prokain (9,0) |
|  | aromás primer amin |  | -ammónium | 2-5 | Prokain (2,5) |
|  | alkil-aril szekunder amin |  | -ammónium | 2-5 | Tetrakain (2,4) |

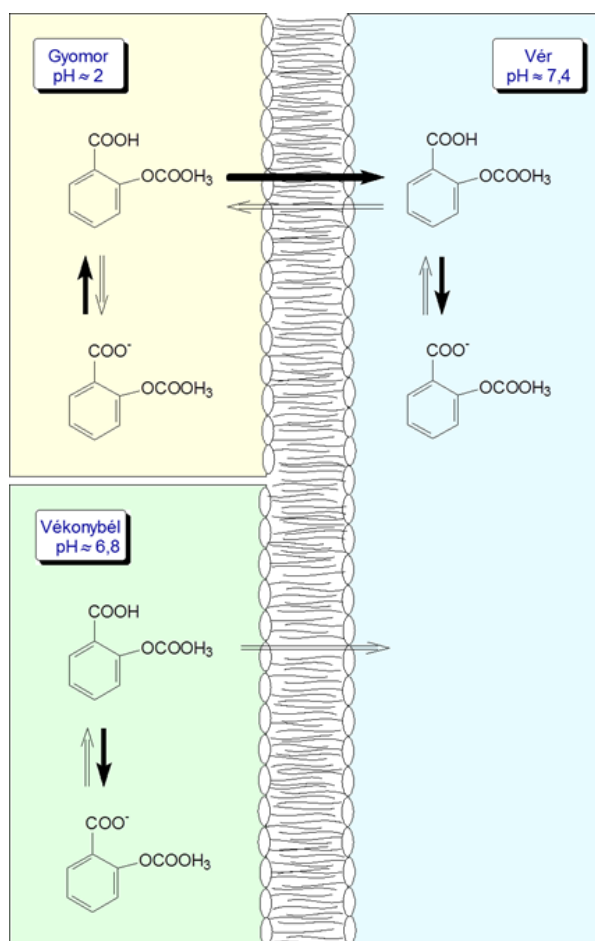
A pK_s érték jelentősége

Ionizálódó molekulák esetén a savi disszociációs állandó ismerete nélkülözhetetlen számos analitikai feladat megoldásához, például $\log P$ érték meghatározáshoz, vagy oldhatóság méréséhez. Ugyanakkor bizonyos technológiai kérdések megoldásához, például egy injekciós oldat készítésekor is ismerni kell a vegyület pK_s értékét.

A molekula protonáltsági állapota döntően befolyásolja szerkezetbeli sorsának minden fázisát, vagyis a gyógyszer testnedvekben való oldódását, a membránokon való áthaladását, a plazmafehérjékhez, valamint a receptorokhoz való kötődését és a metabolizmusát is.

Általánosságban elmondható, hogy a töltéssel nem rendelkező, vagyis *nemionizált* forma (a HA, illetve B forma) az ún. "*transport-forma*", amely képes átjutni a lipid membránokon. A célmolekulákhoz (receptorokhoz) és transzportproteinekhez pedig inkább a töltéssel rendelkező, *ionos forma* (az A^- , illetve BH^+ forma) kötődik.

VI-1. ábra: Az acetilszalicilsav felszívódását befolyásoló tényezők



Egy gyógyszervegyület felszívódását döntően befolyásolja - a savi disszociációs értéke mellett - a szerkezet egyes kompartmentjeinek a kémhatása is.

VI-3 táblázat: A szervezet egyes kompartmentjeinek pH értékei

| Kompartment a szervezetben | pH érték |
|----------------------------|---|
| Gyomor | 1,4 – 2,1 (étkezés előtt) 3,0 – 7,0 (étkezés után) |
| Patkóbél | 4,4 – 6,6 (étkezés előtt) 5,2 – 6,2 (étkezés után) |
| Vékonybél | 6,5 |
| Vastagbél | 5,0 – 8,0 |
| Vérplazma | 7,4 |

Az ionizációra képes vegyületek esetén a pK_s érték alapján kiszámítható, hogy a molekula milyen ionizáltsági állapotban van különböző pH értékeknél. Egy gyógyszermolekula esetén a *Henderson-Hasselbalch egyenlet* segítségével, a savi disszociációs állandó ismeretében meghatározható, hogy a szervezet egy adott kompartmentjének kémhatásán milyen arányban találhatók meg a vegyület ionizált, illetve nemionizált formái.

Savak esetén:

$$pK_s = \text{pH} + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

Bázisok esetén:

$$pK_s = \text{pH} + \log \frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}]}$$

Amennyiben a gyógyszer pK_s értéke megegyezik a környezet pH értékével, akkor az ionizáció 50%-os, vagyis az ionizált és nemionizált molekulák száma egyenlő. Például, ha egy vegyület pK_s értéke 7,4, akkor szöveti pH-n (7,4) a molekulák 50%-ban ionos és 50%-ban nemionos formában vannak jelen

Példa I.: Acetilszalicilsav (gyenge sav) ionizációja a gyomorban

$$pK_s = 3,4$$

$$\text{pH}_{\text{gyomor}} = 1,4$$

$$pK_s = \text{pH} + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$pK_s - \text{pH} = \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$3,4 - 1,4 = 2 = \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} = \log 100$$

$$\frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} = 100$$

vagyis HA mennyisége 100-szorosa az A^- mennyiségének. Az acetilszalicilsav (HA) felszívódik a gyomorból, jó az abszorpciója.

Példa II.: Acetilszalicilsav (gyenge sav) ionizációja a vérben

$$pK_s = 3,4$$

$$pH_{\text{vér}} = 7,4$$

$$pK_s = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$pK_s - pH = \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$3,4 - 7,4 = -4 = \log \frac{[HA]}{[A^-]} = \log 0,0001$$

$$\frac{[HA]}{[A^-]} = 0,0001$$

vagyis A^- mennyisége a vérben 10.000-szerese HA mennyiségének. Az acetilszalicilsav felszívódása már a gyomorból szinte teljes, a vér pH értékén már gyakorlatilag teljesen ionizált formában van.

Példa III.: Lidokain (gyenge bázis) ionizációja a gyomorban

$$pK_s = 7,9$$

$$pH_{\text{gyomor}} = 1,9$$

$$pK_s = pH + \log \frac{[BH^+]}{[B]}$$

$$pK_s - pH = \log \frac{[BH^+]}{[B]}$$

$$7,9 - 1,9 = 6 = \log \frac{[BH^+]}{[B]} = \log 1000000$$

$$\frac{[BH^+]}{[B]} = 10^6$$

vagyis BH^+ mennyisége 10^6 -szor nagyobb, mint B mennyisége, tehát a lidokain a gyomorban szinte teljesen ionizált állapotban van, nem szívódik fel. A vékonybélben, magasabb pH értéken jobb a felszívódása.

A pK_s érték meghatározásának lehetőségei

A pK_s érték meghatározására számos módszer alkalmas, amelyek alapjául az szolgál, hogy a mért analitikai jel pH-tól függő változása egyértelműen összefügg a vizsgált molekula proton-leadásával, illetve proton-felvételével.

Potenciometriás titrálás

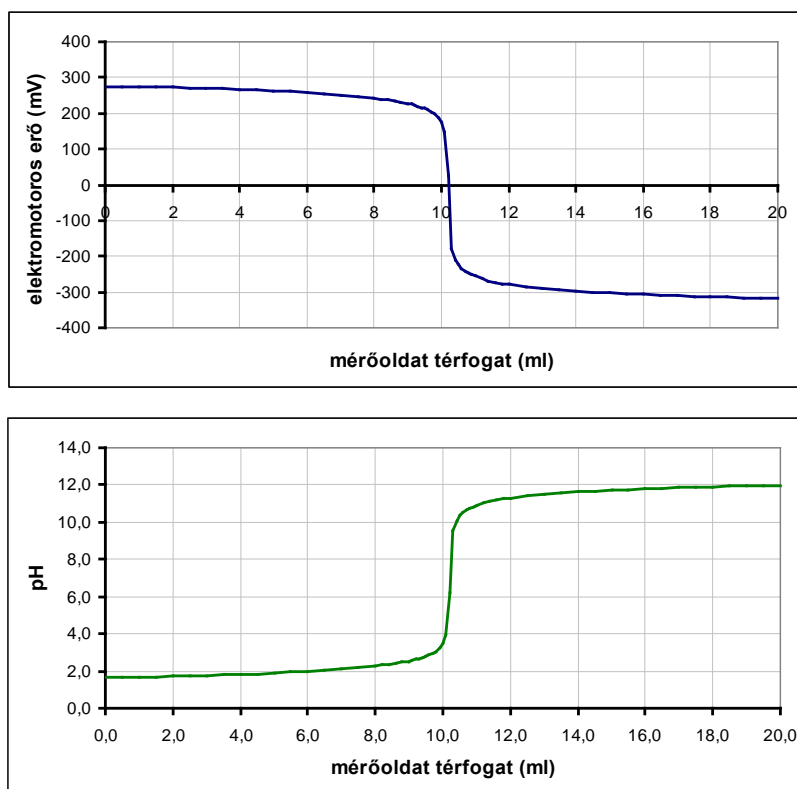
A legszélesebb körben alkalmazott, viszonylag egyszerű módszer a vegyületek savi disszociációs állandóinak meghatározására a vizes közegben végzett potenciometriás titrálás. A potenciometriás módszerrel történő pK_s meghatározás kétféleképpen történhet: *direkt potenciometriás titrálással*, vagy az ún. *különbségi titrálással*.

1. Direkt potenciometriás titrálás

Direkt titrálás során a vizsgálandó vegyület vizes oldatát, folytonos keverés mellett, közvetlenül titráljuk a faktorozott mérőoldattal, ami vagy egy erős sav (általában sósav) vagy egy erős bázis (általában nátrium- vagy kálium-hidroxid) oldata.

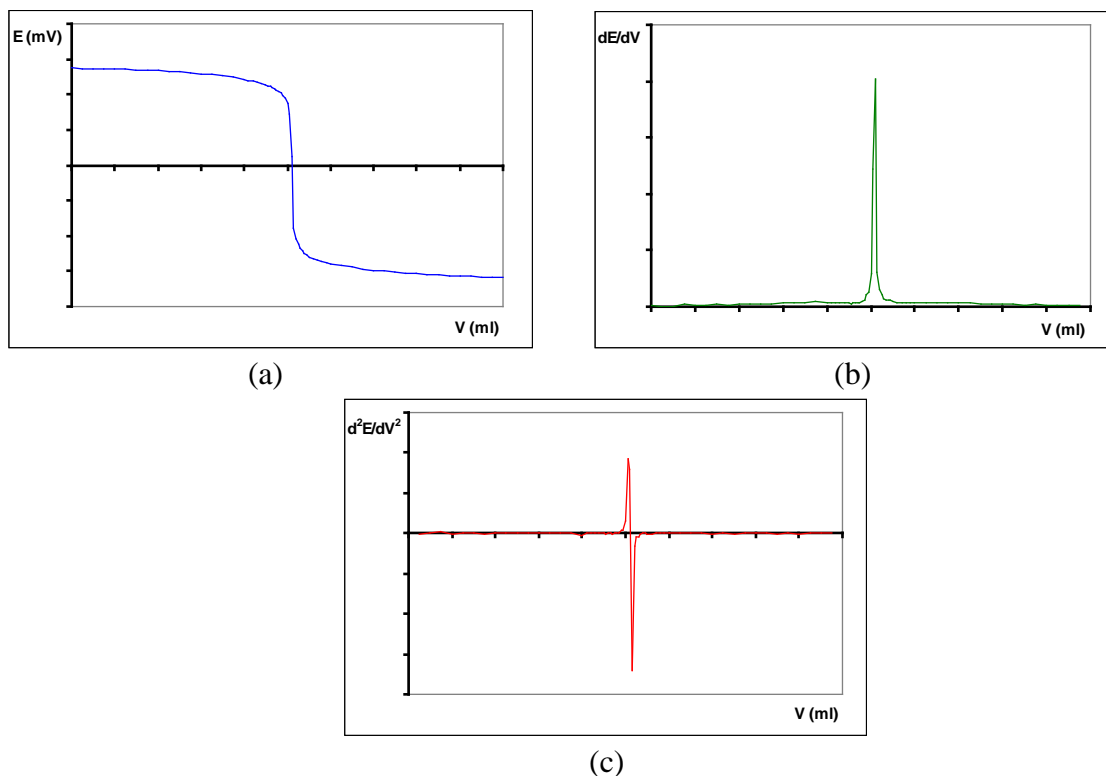
A mérőoldat-fogyás függvényében kombinált üvegelektóddal folyamatosan vizsgáljuk és regisztráljuk az elektromos jelet (mV). Az elektródot előzetesen több pufferoldat segítségével kalibráljuk, így a cella leolvasott elektromotoros erejéhez tartozó feszültségekhez pH értékeket is rendelhetünk. A mért elektromotoros jelet, vagy a hozzárendelt pH értékeket a mérőoldat fogyásának függvényében ábrázolva kapjuk meg a potenciometriás titrálási görbét.

VI-2. ábra: Potenciometriás titrálási görbe



A 100%-os titráltsági értéket a görbe inflexiós pontjához tartozó fogyás jelzi. Az egyenértékpont környezetében a mérőoldatot viszonylag kis, egyenlő mennyiségben adagoljuk, az eredményeket táblázatba foglaljuk, majd ennek alapján kiszámítjuk az első és másodfokú differencia-hányados görbe adatait. Ha a három görbét összehasonlítjuk, látható, hogy ahol az eredeti titrálási görbének inflexiós pontja volt, ott a differencia hányados görbének maximuma, a másodfokú differencia hányados görbének pedig zérushelye lesz.

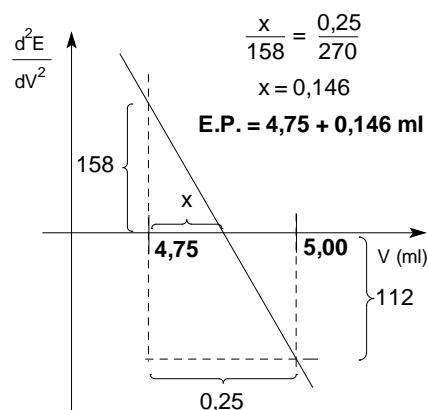
VI-3. ábra: A potenciometriás titrálási görbe (a) első (b), illetve második (c) differencia-hányados görbéi



Az egyenértékpontot a titrálási görbe pontjainak második differenciahányadosából matematikai módszerrel - a differenciahányados módszerrel - a következő módon számíthatjuk ki:

VI-4 táblázat: Példa az egyenértékpont differenciahányados-módszerrel történő kiszámolására

| Mérőoldat-fogyás (ml) | Cellafeszültség (mV) | $\Delta E / \Delta V$ | $\Delta^2 E / \Delta V^2$ |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| 4,25 | 157 | | |
| | | 8 | |
| 4,50 | 149 | | 16 |
| | | 24 | |
| 4,75 | 125 | | 158 |
| | | 182 | |
| 5,00 | - 57 | | - 112 |
| | | 70 | |
| 5,25 | - 127 | | - 56 |
| | | 14 | |
| 5,50 | - 141 | | |



Az így kapott ml-érték tehát a 100%-os titráltsághoz tartozó fogyasztás érték (itt teljesen deprotonált vagy protonált állapotban van a vizsgált vegyület). Adott fogyasztási értékek esetén számolható a titráltsági százalék értéke, ez alapján a deprotonált és

protonált molekulák mennyisége, illetve aránya. A mV és pH közötti lineáris összefüggés miatt mV értékek ismeretében pH számolható az adott fogyásértékekhez rendelt. Mindezek ismeretében a pK_s érték a fenti *Henderson-Hasselbalch egyenlet* segítségével kiszámítható:

$$pK_s = pH + \log \frac{[\text{savas forma}]}{[\text{bázikus forma}]}$$

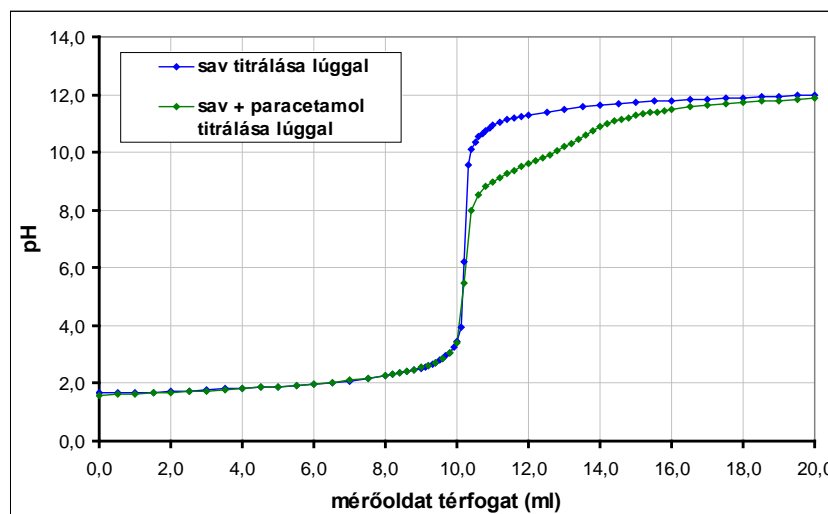
Az 50%-os titráltsági állapothoz tartozó pH érték az egyenlet alapján megadja a pK_s értékét, hiszen ekkor a molekula ionizált és nemionizált formája egyenlő koncentrációban van jelen. Általában a 30 - 70% közötti titráltsági pontokból számított pK_s értékeket átlagolva kapjuk a pontos értéket.

A módszer előnye a gyorsasága és egyszerűsége, hiszen csak egyetlen titrálást igényel. Amennyiben a vegyületnek több disszociációs állandója is van, de azok jól elkülönülnek egymástól (legalább 4 pK_s egység a különbség közöttük) használható a módszer. A pK_s értékeket azonban nem lehet ezzel a módszerrel meghatározni, ha egy molekulának több disszociációs állandója van, és azok közel esnek egymáshoz.

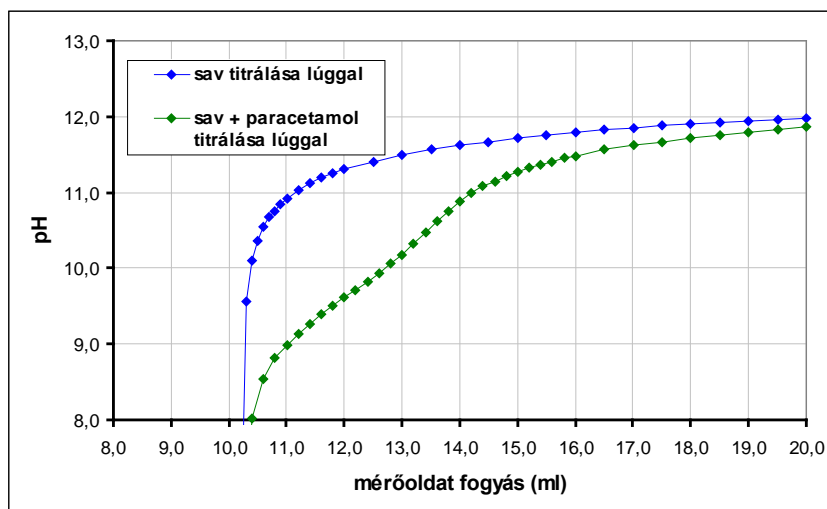
2. Különbségi titrálási eljárás

A módszer alkalmazása során két, egymást követő titrálást végzünk. Az első titrálás során ismert mennyiségű és koncentrációjú erős savat titrálunk ismert koncentrációjú erős lúg mérőoldattal. A második titráláskor az első titráláskor is használt, azzal azonos mennyiségű erős savhoz hozzáadjuk a meghatározandó anyagot, és ezt az oldatot titráljuk ugyanazzal az erős bázis mérőoldattal. A két titrálási görbét egy ábrán ábrázoljuk.

VI-4. ábra: A paracetamol disszociációs állandójának meghatározása különbségi potenciometriás módszerrel



(a)



(b)

A két titrálási görbe különbsége a meghatározandó vegyületről ledisszociált protonok számával arányos, ezért a két görbe különbségéből kiszámíthatjuk a disszociációs állandó értékét az ún. "H átlag" (\bar{H}) meghatározásán keresztül. \bar{H} a molekuláról adott pH-n átlagosan ledisszociált protonok számát jelenti. A titrálás vége felé, bizonyos pH érték felett a két titrálási görbe lefutása párhuzamos, vagyis a különbség állandó lesz, ugyanis a vizsgált molekula ott már az összes protonját leadta. Ennek következtében ekkor egyértékű savak esetében $\bar{H}=1$, kétértékű savak esetében $\bar{H}=2$, stb. Ha a konstans különbségi értéket elosztjuk a vegyületünk által leadható protonok számával, akkor megkapjuk a vegyület egy H^+ -jára eső lúg fogyást adott mérési körülmények (bemérés, mérőoldat koncentráció) között.

A két titrálási görbe különbségéből, adott pH értéken meghatározhatjuk a többlet mérőoldat móljainak a számát, amit elosztva a vizsgált vegyület móljainak a számával, megkapjuk \bar{H} értékét.

$$\bar{H} = \frac{n(\text{mérőoldat többlet})}{n(\text{vizsgált vegyület})}$$

$$n(\text{mérőoldat többlet}) = \frac{\Delta V(\text{mérőoldat, ml}) \cdot c(\text{mérőoldat, mol/dm}^3)}{1000} \cdot f$$

$$n(\text{vizsgált vegyület}) = \frac{m(\text{bemért})}{M}$$

Ugyanakkor \bar{H} értékét felírhatjuk a protonálódási állandó segítségével is:

Egy protonálható csoportot tartalmazó molekula esetén:

$$\bar{H} = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]}$$

mivel:
$$K = \frac{[HA]}{[H^+] + [A^-]}$$

behelyettesítve:
$$\bar{H} = \frac{[A^-]}{[A^-] + K[H^+][A^-]} = \frac{1}{1 + K[H^+]}$$

átrendezve:
$$K = \frac{1 - \bar{H}}{\bar{H}[H^+]}$$

Az egyes $[H^+]$ koncentrációkhoz tartozó \bar{H} értékekből a K protonálódási állandó kiszámítható. Több pH értéken kiszámított K értékeket átlagoljuk.

Két protonálható csoportot tartalmazó molekula esetén:

$$\bar{H} = \frac{2[A^{2-}] + [HA^-]}{[A^{2-}] + [HA^-] + [H_2A]}$$

mivel:
$$K_1 = \frac{[HA^-]}{[H^+] + [A^{2-}]} \quad \text{és} \quad K_2 = \frac{[H_2A]}{[H^+] + [HA^-]}$$

behelyettesítve:
$$\bar{H} = \frac{2 + K_1[H^+]}{1 + K_1[H^+] + K_1K_2[H^+]^2}$$

Két $\bar{H} - [H^+]$ értékpár ismeretében kétismeretlenes egyenletrendszerhez jutunk, melyet megoldva megkapjuk K_1 és K_2 értékét. A kiszámolt K_1 és K_2 érték függ attól, hogy mely $\bar{H} - [H^+]$ értékpárokat használtuk a számoláshoz. A tapasztalatok azt mutatják, hogy a legpontosabb állandó értékeket akkor kapjuk, ha $\bar{H}_1=0,3 - 0,7$ és $\bar{H}_2=1,3 - 1,7$ értékek között van. Célszerű több $\bar{H} - [H^+]$ értékpárt is elemezni, így több K_1 és K_2 értéket is kiszámíthatunk, amelyeket átlagolva tovább pontosíthatjuk az eredményt.

A módszer nagy előnye a direkt eljáráshoz képest, hogy több disszociálódó csoporttal rendelkező, átlapoló pK_s értékekkel bíró vegyületek meghatározására is használható.

A potenciometriás mérések nagy előnye, hogy nagymértékben automatizálhatók automata titrátorok alkalmazása révén, és igen nagy pontossággal meghatározhatók a pK_s értékek. A pontosság javítása érdekében vízben jól oldódó inert sókat (pl. 0,15 M

NaCl) alkalmazhatunk az állandó ionerősség beállítására. Mivel a disszociációs állandó hőmérsékletfüggő, célszerű a méréseket termosztált körülmények között elvégezni.

A potenciometriás eljárások hátránya, hogy az esetleges szennyezések (bomlástermékek, más ionizálódó szennyezők) és az oldat CO₂ tartalma mérési hibát okozhatnak, hiszen nem különíthetők el a vizsgált anyagtól a titrálási görbék értékelése során. Ez utóbbi kiküszöbölhető frissen kiforralt desztillált víz használatával, illetve megoldás lehet inert gáz alkalmazása a mérőcella felett.

Hátrányt jelent, hogy a titrálásokhoz viszonylag nagy ligandumkoncentráció szükséges, tehát a mérendő anyag oldhatósága is gátat szabhat a potenciometria alkalmazásának. A mérés feltétele, hogy a vizsgálandó vegyület legalább 0,5 mM koncentrációban oldódjék vízben a titrálás teljes tartományában.

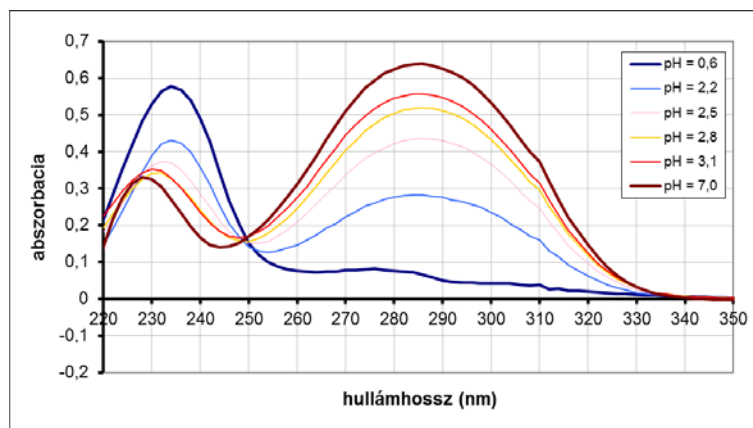
Ugyanakkor potenciometriás titrálással pH 2 - 12 tartományban lehet pontos disszociációs állandót meghatározni, hiszen az üvegelektrod ebben a tartományban a legpontosabb, így az erősen savas ($pK_s < 2$) és az erősen bázikus ($pK_s > 12$) funkciós csoportok mérésekor jelentősen megnő a mérés hibája.

UV-Vis spektrofotometriás titrálás

A potenciometriánál érzékenyebb módszer az ún. *UV - pH titrálás* a disszociációs állandók meghatározására. Az ultraibolya - látható spektrofotometria olyan vegyületeknél alkalmazható, melyek jelentős UV aktivitással bírnak, és a vegyület ionizálható csoportja a kromofor csoport része, illetve annak közelében található (pl. fenolát, aromás gyűrű melletti karboxilát vagy amino csoport, heteroaromás gyűrű nitrogénje, stb.). Ilyen esetekben az ionizálható csoportok pH változás hatására bekövetkező protonáltsági állapotának megváltozása a spektrumban is változást okoz, vagyis protonálódás/deprotonálódás hatására a spektrum hiper- vagy hipo-, bato- vagy hipszokróm eltolódást szenved, általában a konjugáció változásának függvényében.

Az UV - pH titrálás során a vizsgált vegyület oldatának fényelnyelését vizsgáljuk a pH függvényében adott hullámhosszon. Ez annyit jelent, hogy a mérés során azonos koncentrációjú és azonos ionerősségű, de különböző pH-jú oldatsorozatot kell készíteni, és minden egyes oldatnak regisztrálni kell a spektrumát. A kiértékelést a legcélszerűbb azon a hullámhosszértéken megtenni, ahol a legnagyobb az y tengely irányú (hiper- és hipokróm) eltolódás a pH változás hatására a spektrumban, tehát ahol a teljesen protonált és a teljesen deprotonált formában jelen levő komponenseket tartalmazó oldatok esetén a legnagyobb a két görbe közötti távolság (**VI-5. ábra**).

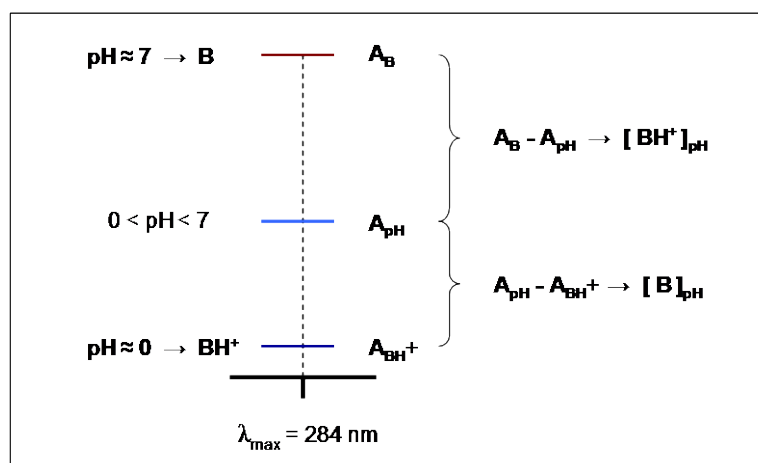
VI-5. ábra: Benzocainum (Ph. Hg. VIII.) UV-Vis spektrumának pH-függése



Feladat: *Benzocainum* (Ph. Hg. VIII.) protonálási makroállandó UV-Vis spektrofotometriás meghatározása.

A kiválasztott hullámhossz értéken megmérjük minden oldat fényelnyelését. Az egy ionizálódó csoportot tartalmazó molekula esetén a legalacsonyabb pH-jú oldatban (pH 0,6) a molekula teljesen protonált állapotban van, a legmagasabb pH-jú oldatban (pH 7,0) pedig teljesen deprotonált formában. Az A_{BH^+} a teljesen protonált részecske, az A_B a teljesen deprotonált részecske abszorbanciája, az A_{pH} pedig az adott pH értéken mért abszorbancia (**IV-X. ábra**).

VI-6. ábra: A benzocain protonált (BH^+) és nemprotonált (B) formájának megoszlása a pH függvényében



A köztes pH értékeken az oldatban jelen levő protonált részecskék mennyiségét az $A_B - A_{pH}$ különbség, a deprotonált részecskék mennyiségét az $A_{pH} - A_{BH^+}$ különbség fejezi ki. A Henderson-Hasselbalch egyenlet felhasználásával a pK_s érték számolható:

$$pK_s = pH + \log \frac{[\text{protonált forma}]}{[\text{deprotonált forma}]} = pH + \log \frac{A_X - A_{pH}}{A_{pH} - A_{XH}}$$

Az UV - pH titrálást elsősorban olyan vegyületek disszociációs állandóinak meghatározására használják, melyek kis oldhatósága nem teszi lehetővé a potenciometriás meghatározást. Az UV - pH titráláshoz ugyanis, a vegyület fajlagos abszorpciós koefficiensétől függően, általában $50 \mu\text{M}$ koncentrációjú oldat elégséges a méréshez.

A módszer automatizálható, ilyenkor a titráló berendezéshez közvetlenül csatlakoztatnak egy diódasoros spektrofotométert, lehetővé téve azt, hogy minden egyes mérőoldat adagolást követően a pH méréssel egyidejűleg megtörténjen a minta spektrumának a felvétele is. Így jelentősen lerövidül egy vegyület pK_s értékének meghatározása.

Mérései alapján határozza meg a *Benzocainum* hatóanyag pK_s értékét!

Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézis viszonylag új lehetőség a pK_s érték meghatározására. A meghatározás során a vizsgálandó vegyület látszólagos elektroforetikus mozgékonyágát határozzák meg, amely kapcsolatban áll a kapilláris hosszával, a

vándorlási idővel és az alkalmazott feszültséggel. Ugyanakkor egy ionizálható vegyület elektroforetikus mobilitása függ az adott pH értéken jellemző ionizáltsági állapotától. A látszólagos mobilitási értékeket a pH függvényében ábrázolva egy szigmoid görbét kapunk, amelynek inflexiós pontja megfelel a vegyület pK_s értékének.

A módszer igen nagy előnye a kis anyagigénye és a szelektivitása. Nem igényel nagy tisztaságú mintát, hiszen főként elválasztástechnikai módszerként használják.

Egyéb lehetőségek

További lehetőséget nyújt a disszociációs állandó meghatározására az *NMR - pH titrálás*, valamint a *CD - pH titrálás*. Ezek a módszerek egyelőre nem rutin technikák, speciális problémák - főként más módszerrel nem mérhető vegyületek esetén - megoldására használatosak.

Az *NMR - pH titrálás* során a protonálódásban részt vevő csoport(ok) közelében levő *NMR* aktív magok kémiai eltolódását vizsgálják a pH függvényében. A módszer előnye, hogy nem igényli a mérendő anyag pontos koncentrációjának ismeretét, és esetleges szennyezők sem zavarják a meghatározást.

Vízben nem oldódó vegyületek pK_s értékének meghatározása

A vízben rosszul oldódó vegyületek pK_s meghatározása az eddig felsorolt módszerekkel nehézkes. A potenciometriás módszer feltétele, hogy a vegyület a titrálás teljes pH-tartományában oldott formában legyen jelen. Ha ez nem valósul meg, de a vegyület spektrális tulajdonságai azt lehetővé teszik, akkor a spektrofotometriás módszer alkalmazható, hiszen kisebb vízoldhatóság is elegendő.

Amennyiben a vegyület vízben nem oldódik, úgy a pK_s meghatározására a leginkább elterjedt megoldás az oldószerkeletben való mérés, mind a potenciometriás, mind a spektrofotometriás eljárás során. A szerves oldószer - víz elegyekben, amelyek közül a leggyakrabban a metanol/víz rendszer használatos, meghatározzák az ott érvényes ún. *látszólagos ionizációs állandót* (p_sK_a), majd extrapolálnak a nulla szerves oldószer tartalomra, vagyis vizes közegre.

VI.2 A megoszlási hányados fogalma, jelentősége és meghatározási módszerei

Egy hatóanyag szerkezetbeni sorsát legnagyobb mértékben meghatározó fizikai-kémiai tulajdonságok az oldhatóság, az ionizációs képesség, a lipofilitás és a permeabilitás.

VI.2.1 A lipofilitás fogalma, jelentősége

A *lipofilitás* a biológiailag aktív molekulák egyik legfontosabb és igen régóta használatos fizikai-kémiai paramétere, amely mint anyagi tulajdonság a vegyületek apoláris (lipofil) környezethez való affinitását jellemzi, vagyis a zsírszerű anyagokban való oldódási hajlamot.

A lipofilitás az a tulajdonság, amely nagyban befolyásolja a vegyület felszívódását, eloszlását, fehérjekötődését, kiürülését, másrészt a receptorral való kölcsönhatását is, tehát jelentős mértékben meghatározza egy molekula sorsát a szervezetben. Mindezek alapján a gyógyszertervezés kiemelt paramétere is, hiszen változtatásával befolyásolhatók az ADME tulajdonságok.

Egy molekula lipofilitását számszerű adatokkal jellemezhetjük, aminek kialakításában azok a kölcsönhatások játszanak szerepet, amelyek a szervezetben is létrejönnek a molekula és környezete között.

VI.2.2 A megoszlási hányados fogalma

Egy megoszlási folyamat során a vegyület megoszlik két egymással nem elegyedő, de bőségesen érintkező oldószer között. Az anyag megoszlási hányadosán a két egymással nem elegyedő oldószerben mért aktivitásának az arányát értjük, mely adott hőmérsékleten és nyomáson, az egyensúlyi állapot elérése után konstans érték. Híg oldatok esetében, amikor a koncentráció kisebb, mint 10^{-2} M, az aktivitások helyett az egyensúlyi koncentrációkkal fejezhetjük ki a megoszlási hányadost.

A *nernsti definíció* szerint:

$$P = \frac{\gamma_o C_o}{\gamma_v C_v}$$

Híg oldatok esetén:

$$P = \frac{C_o}{C_v}$$

A lipofilitás általános jellemzésére választott *oktanol/víz oldószer-rendszerre* vonatkozó megoszlási hányadost P betűvel jelöljük, leginkább ennek logaritmusát alkalmazzuk ($\log P$). Az "o" alsó index az organikus, a "v" a vizes fázist jelöli.

Megegyezés szerint a számlálóban a szerves fázisban mérhető koncentráció szerepel, ennek következtében a megoszlási hányados minél nagyobb számérték, annál nagyobb a vegyület affinitása az apoláris környezethez, vagyis annál nagyobb a lipofilitása.

Megoszlás szempontjából a gyógyszerek két fő csoportra oszthatók: a *neutrális* (nemionos) és az *ionizációra képes* (savak, bázisok) vegyületekre. Kétféle megoszlási hányadost különböztetünk meg.

A *nernsti definíció* szerinti ún. **valódi megoszlási hányados** (P) az azonos molekuláris állapotban lévő részecskére, azaz a *nemionos*, semleges forma megoszlására vonatkozik, amely megoszlása a két fázis között a pH-tól független, adott hőmérsékleten és nyomáson.

A **látszólagos megoszlási hányados**, vagy *disztribúciós koefficiens* (D vagy P_{app}) valamennyi részecskét figyelembe veszi az adott pH-jú vizes fázisban.

Neutrális molekuláknál, ha asszociáció nem lép fel, a kísérletileg mérhető és a valódi megoszlási hányados azonos. Ionizálódó molekuláknál azonban, ahol a vizes közegben a vegyület pK_s értékétől és a közeg pH-jától függően ionizáció következhet be, a valódi megoszlási hányados különbözik az adott mérési körülmények között meghatározható látszólagos megoszlási hányadostól.

A kísérletileg meghatározott látszólagos megoszlási hányadosból a valódi megoszlási hányados, a pK_s érték ismeretében kiszámítható az alábbi összefüggések felhasználásával:

Savak (semleges savvá protonálódó anion) esetében:

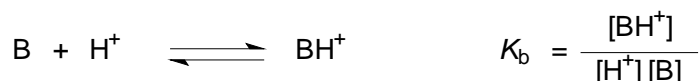


$$P = \frac{[HA]_o}{[HA]_v}$$

$$P_{app} = \frac{[HA]_o}{[HA]_v + [A^-]_v} = \frac{[HA]_o}{[HA]_v + \frac{[HA]_o}{[H^+] K_s}} = \frac{P}{1 + \frac{1}{[H^+] K_s}}$$

$$\log P = \log P_{app} + \log (1 + 10^{pH-pK_s})$$

Bázisok (kationná protonálódó semleges bázis) esetében:



$$P = \frac{[B]_o}{[B]_v}$$

$$P_{app} = \frac{[B]_o}{[B]_v + [BH^+]_v} = \frac{[B]_o}{[B]_v + K_b[B]_v[H^+]} = \frac{P}{1 + K_b[H^+]} = \frac{P}{1 + \frac{[H^+]}{K_s}}$$

$$\log P = \log P_{app} + \log (1 + 10^{pK_s-pH})$$

VI.2.3 A megoszlási hányados szerepe

A gyógyszermolekulák lipofilitását jellemző $\log P$ értékek könnyen átlátható, kezelhető szám adatok, amelyek segítségével a molekulák lipofiliása könnyen összehasonlítható. A gyógyszerek kb. 90%-ának $\log P$ értéke 0 és 4,5 közötti érték.

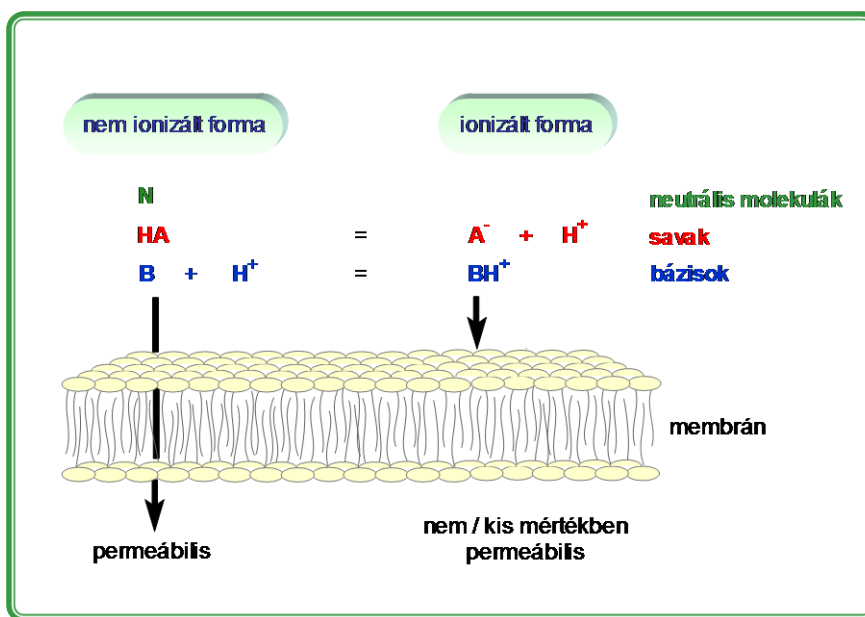
A következő táblázat néhány példán keresztül demonstrálja a gyógyszermolekulák abszorpcióját a szervezetbe, ami nagymértékben a $\log P$ értéktől függ.

VI-5 táblázat: Néhány gyógyszermolekula $\log P$ értéke, és annak következménye a felszívódásra

| Gyógyszermolekula | $\log P$ | Következmény |
|------------------------|----------|---|
| aszcorbinsav | - 1,85 | passzív diffúzióval nem, aktív transzport révén abszorbeálódik |
| metilhomatropin-bromid | - 1,68 | nem szívódik fel, így nem jut a központi idegrendszerbe |
| diazepám | 2,82 | jól felszívódik passzív diffúzió révén |
| amiodaron | 7,57 | felhalmozódik a szervezetben (felezési idő: 25 nap) |

Gyógyszerkémiai szempontból, azaz a várható transzport tulajdonságok megítélése szempontjából, a valódi $\log P$ a lényeges, mivel a "*pH-megoszlás hipotézis*" szerint, a gyógyszerek abszorpciója passzív diffúzióval a lipofil membránokon csak a nemionizált, lipofil molekulák számára akadálytalan.

VI-7. ábra: A „pH-megoszlás hipotézis”

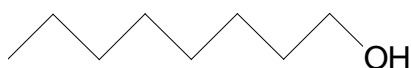


Ugyanakkor ionizálódó molekulák esetén a látszólagos megoszlási hányados pH-tól való függésének ismerete elengedhetetlen ezen vegyületek szervezetbeni sorsának megértéséhez. Az ionizálódó molekulák a szervezet különböző kompartmentjeinek pH-értékén eltérő megoszlási hányadossal rendelkeznek, amelynek ismeretében megjósolható, hogy hol és milyen mértékű felszívódás várható.

A lipofilitás-pH összefüggés ismerete nagy segítséget nyújt analitikai problémák megoldásában is, például összetett gyógyszerkészítmények vizsgálatakor a vegyületek ionizáltsági állapotuknak megfelelően különböző pH értékeken extrahálhatók ki szerves oldószerekkel.

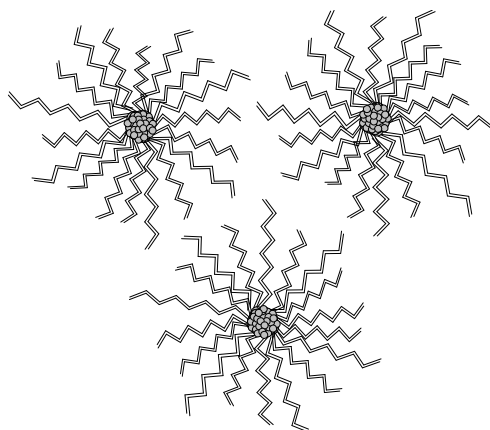
VI.2.4 Az oktanol/víz rendszer

A lipofilitás számszerű jellemzésére tehát a gyógyszerkémiaiában az oktanol/víz rendszerre vonatkozó *megoszlási hányados logaritmus* ($\log P$) használatos. Ez az oldószerrendszer a biológiai megoszlás (extracelluláris tér / membrán / citoplazma) jól használható mintájának bizonyult, mert a szerves fázisként jelen levő oktanol ($C_8H_{17}OH$) amfifil jellegéből (apoláris szénhidrogén lánc + poláris hidroxil csoport) adódóan modellezni képes a gyógyszer és a membrán lipid kettős rétegével és fehérjéivel létrejövő kölcsönhatásokat.



Az oktanol nem elegyedik vízzel, de jelentős mennyiségű (2,36 M) vizet képes megkötni. A vízmolekulák csoportjait az oktanolmolekulák poláros hidroxilcsoportjai veszik körül, ezáltal micellákat alkotnak.

VI-8. ábra: Oktanol-micellák



A membránok sokfélesége miatt azonban egyetlen oldószerrendszer nem igazán alkalmas a biológiai megoszlás modellezésére, ezért a gyógyszerkutatásban manapság egyéb oldószerrendszereket, például a „kritikus kvartett” oldószerrendszereket (oktanol/víz, alkán/víz, kloroform/víz és propilén-glikol-dipelargonát/víz) is használják.

VI-6 táblázat: A „kritikus kvartett” oldószerrendszer

| Oldószer | Membrán típusa |
|-------------------------------------|------------------------|
| oktanol | amfiprotikus |
| alkán (ciklohexán) | inert |
| kloroform | főként proton donor |
| propilén-glikol-dipelargonát (PGDP) | főként proton akceptor |

Egyre nagyobb a liposzóma/víz megoszlásnak, mint nemizotróp rendszernek a jelentősége is. A liposzómák foszfolipidekből (foszfatidil-kolin, foszfatidil-szerin, foszfatidil-inozitol) és más molekulákból (zsírsavak, koleszterin, epesavak stb.) állnak; ebben a környezetben az ionos forma megoszlása is jelentős.

VI.3 A megoszlási hányados meghatározásának módszerei

A megoszlási hányados meghatározására alkalmas módszerek két nagy csoportja:

- direkt meghatározási módszerek,
- indirekt, kromatográfiás módszerek.

E mellett léteznek predikációs módszerek, melyek segítségével a vegyületek megoszlási hányadosa számítással becsülhető.

VI.3.1 Direkt meghatározási módszerek

VI.3.1.1 Hagyományos rázótolcséres technika

A megoszlási hányados meghatározásának hagyományos módszere az ún. rázótolcséres eljárás. A módszer lényege, hogy két egymással nem elegyedő oldószer között a vizsgálandó anyagot megosztjuk.

A mérés során a vizes és a vele nem elegyedő szerves fázist (leggyakrabban oktanol) a meghatározást megelőzően egymással telítjük, annak érdekében, hogy egymásban oldódás ne okozzon hibát a meghatározás során. A vizsgálandó anyagot a vizes fázisban oldjuk, koncentrációját meghatározzuk, majd hozzáadjuk a megosztó, szerves fázist. A két fázist a megoszlási egyensúly eléréséig érintkeztetjük. A fázisok érintkeztetésére különféle technikai megoldások léteznek. A "shake-flask" módszer: megfelelő térfogatú, csiszolt dugóval záródó üvegedényben, amelyeket változtatható rázási amplitúdójú és sebességű, termosztálható rázógépekbe helyeznek; "stir-flask" módszer: keverőedényes eljárás, ahol a fázisérítkeztetést megfelelő sebességű felső keverő biztosítja.

A megoszlási egyensúly beállta után a fázisokat centrifugálással szétválasztjuk és azokban a megoszlott anyag koncentrációját arra alkalmas kvantitatív analitikai módszerrel meghatározzuk. A koncentráció meghatározása, amennyiben a vizsgálandó anyag spektrális tulajdonságai azt lehetővé teszik, leggyakrabban UV/VIS spektrofotometriás módszerrel történik.

A reprodukálható eredmények eléréséhez az alábbi kísérleti feltételek rögzítése szükséges:

- a megosztó fázisok egymással történő előzetes érintkeztetésének ideje,
- az érintkeztetés hőmérséklete,
- az egyensúly beállításának ellenőrzése,
- állandó ionerősség biztosítása.

Validált körülmények között végezve a meghatározást, az átlagos hiba -2 és +3 logP tartományban $\pm 0,05-0,10$ log egység között mozog. Azoknak a vegyületeknek a megoszlási hányadosát, amelyek logP értéke nagyobb, mint +4, vagy kisebb, mint -2, rázótolcséres módszerrel nem lehet kielégítő pontossággal meghatározni. Ennek oka, hogy a túl lipofil vagy hidrofil molekulák az egyik megosztó fázisban való nagyon kicsi oldhatósága miatt extrém fázisarányt kell alkalmazni, amely megnöveli a mérési hibát.

A direkt eljárások közül a rázótolcséres módszert tekintették sokáig referencia eljárásnak, de ismert korlátai miatt (nagy munka- és időigény, a termosztálás nehezen oldható meg, viszonylag szűk logP tartományban alkalmazható, lipofil molekulák nem mérhetők, nagymennyiségű és nagy tisztaságú oldószert igényel stb.) számos más meghatározási módszert dolgoztak ki.

VI.3.1.2 Kétfázisú potenciometriás titrálás

A módszer elve, hogy azonos körülmények között két potenciometriás titrálást végzünk. Az elsőt vizes közegben, a megosztó fázis nélkül, a másodikat pedig a megosztó szerves fázis (pl. oktanol) jelenlétében. Amennyiben a vizsgált vegyület valamely részecskéje megoszlik a két fázis között, úgy a két potenciometriás titrálási görbe nem esik egybe, és a két görbe eltéréseiből a $\log P$ számítható.

A két potenciometriás titrálás két disszociációs állandó értéket eredményez, a pK_s értéket és p_oK_a értéket, amely a szerves fázis jelenlétében végzett titrálásból származó látszólagos disszociációs állandó. A két érték különbségéből a megosztási hányados számítható:

Savak esetében:

$$P = (10^{p_oK_s - pK_s} - 1) R$$

Bázisok esetében:

$$P = (10^{pK_s - p_oK_s} - 1) R$$

ahol R a vizes és a szerves fázis térfogatának hányadosa, vagyis a *fázisarány*.

Az eljárás megbízható, pontos, elsőszámú validáló módszernek tekinthető ionizálható molekulák esetén és általában olyan vegyületek $\log P$ értékének meghatározására alkalmas, melyek $\log P$ értéke -1 és +6 közé esik. A módszer hátránya, hogy problematikus az igen lipofil és még inkább a nagyon hidrophil vegyületek $\log P$ értékének meghatározása esetén, és teljesítményében egyelőre elmarad az indirekt, kromatográfiás technikák kapacitásától.

VI.3.2 Indirekt meghatározási módszerek

Az indirekt, másnéven alternatív meghatározási módszerek jelenleg a leggyakrabban alkalmazott eljárások a lipofilitás jellemzésére. A kromatográfiás módszerek elsősorban akkor használatosak, ha a direkt $\log P$ meghatározási módszerek valamilyen okból kifolyólag nem alkalmazhatók. Az indirekt eljárások előnye, hogy az igen nagy és nagyon kis lipofilitású vegyületek is mérhetők, a módszerek gyorsak és egyszerűek, ami nagyon fontos szempont a gyógyszerkutatás korai fázisában.

A kromatográfiás vizsgálatoknál alapvető olyan kromatográfiás rendszer felállítása, ahol a vegyületek retenciója nagy pontossággal megállapítható, ugyanakkor az adott kromatográfiás állófázissal minél hitelesebben lehessen karakterizálni a membrán kettősréteget.

A kromatográfiás módszerek közül a vékonyréteg-kromatográfiás, valamint a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás eljárások a leginkább elterjedtek.

VI.3.2.1 Vékonyréteg-kromatográfia (VRK)

A fordított fázisú vékonyréteg kromatográfiás (VRK) módszerek manapság is kiterjedten alkalmazott eljárások a gyógyszer-molekulák lipofilitásának jellemzésére. Ennek hátterében az áll, hogy a módszer egyszerű, gyors, kis idő alatt egyszerre több vegyület is vizsgálható. A módszer lényege, hogy az eljárás során a lipofilitástól függő

kromatográfiás paramétert határozzuk meg, majd kalibrációs egyenes felhasználásával $\log P$ értéket számolunk.

A $\log P$ meghatározás elvi alapját a folyadék/folyadék megoszláson alapuló kromatográfiás retenció és a megoszlási hányados között fennálló összefüggés adja meg. A retenció faktorral közvetlenül összefüggésben áll az ún. R_M érték:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) = \log\left(K_{VRK} \frac{V_s}{V_M}\right)$$

ahol, mivel R_f 0 és 1 közötti érték, R_M (az ebből származtatott függvénykapcsolat) $+\infty$ -tól $-\infty$ -ig változik; V_s az állófázis, V_M a mozgófázis térfogata ($V_s/V_M =$ fázisarány, az adott kromatográfiás rendszerre jellemző állandó), K_{VRK} a kromatográfiás megoszlási hányados.

Az R_f értékek alapján számított R_M pedig lineáris összefüggésben állnak a $\log P$ értékekkel:

$$\log P = aR_M + b$$

A kromatográfiás $\log P$ meghatározás lényege tehát, hogy egy kiválasztott standard anyagsorozat esetén, melynek oktanol/víz $\log P$ értéke ismert, meg kell határozni az aktuális kromatográfiás rendszerben érvényes R_M értékeket, amely értékeket felhasználva a fenti egyenlet állandói megismerhetők. Ennek alapján egyéb vegyületek $\log P$ értéke számítható.

A vékonyréteg-kromatográfiás módszer lehetőséget nyújt lipofil, UV inaktív és ionizációs csoportot nem tartalmazó vegyületek $\log P$ értékének meghatározására. Ugyanakkor a minta esetleges szennyezettsége sem zavarja a meghatározást, mivel a szennyezők rendszerint elválnak a meghatározás során a vizsgált komponenstől, és így nem befolyásolják a meghatározást. A kromatográfiás rendszer optimalizálása alapvető követelmény, és igen fontos, hogy a kalibrációhoz használt standard vegyületek szerkezete és tulajdonságai közel álljanak a vizsgált vegyületekéhez.

A kísérleti körülmények pontos betartásával a vegyületek $\log P$ értéke $\pm 0,05$ pontossággal határozható meg.

VI.3.2.2 Nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfia (HPLC)

A fordított fázisú, megoszláson alapuló folyadékkromatográfiás eljárás elviekben az előzőekben bemutatott fordított fázisú VRK-módszerhez hasonlítható. A HPLC-s eljárás során a lipofilitással arányos ún. kapacitás állandót ($\log k'$) határozzuk meg:

$$\log k' = \log\left(K_{HPLC} \frac{V_s}{V_M}\right)$$

ahol $\log k'$ a HPLC-s kapacitási tényező logaritmus, V_s az állófázis, V_M a mozgófázis térfogata ($V_s/V_M =$ fázisarány, az adott kromatográfiás rendszerre jellemző állandó), K_{HPLC} a kromatográfiás megoszlási hányados.

A $\log k'$ értékek meghatározását követően, a vékonyréteg-kromatográfiához hasonlóan kalibrációs egyenes felhasználásával számoljuk ki a $\log P$ értékeket:

$$\log P = a \log k' + b$$

Ezekkel az eljárásokkal lehetőség nyílik a különböző geometriai izomerek elválasztására is, és ezáltal a lipofilitásuk szerinti megkülönböztetésre is.

VI.3.2.3 Predikciós módszerek

A megoszlási hányados kísérletes módon történő meghatározására alkalmas eljárások mellett különböző, számítógépes becslésen alapuló predikciós módszerek is léteznek. A kapott lipofilitás érték az ún. *kalkulált megoszlási koefficiens*.

Számítására számos eljárás létezik, a legelterjedtebb, legtöbb számítógépes program által használt módszer a fragmens alapú számítás, ahol az alpmolekula és a hozzá kapcsolódó fragmensek, szubsztituensek száma, pozíciója határozza meg a kalkulált $\log P$ értéket.

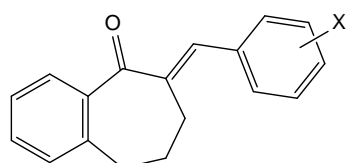
A módszerek jelentősége elsősorban a gyógyszerkutatás korai fázisában van ugyanis, a módszerek pontossága messze elmarad a kísérletes eljárások pontosságától. A számítógépes módszerek alapvető hátránya, hogy általuk az ionos vegyületek, illetve a geometriai izomerek lipofilitása nem határozható meg, hiszen a töltésből, illetve térbeli elhelyezkedésből adódó lipofilitásbeli különbségek nem befolyásolják a számítást. A módszerek megbízhatóságát és alkalmazhatóságát is a mért értékekkel való összehasonlítás adhatja meg.

Feladat. Szteroid származékok megoszlási hányadosának ($\log P$) meghatározása fordított fázisú VRK-módszerrel

Szteroid hormonok $\log P$ értékét határozzuk meg, ismert $\log P$ -vel rendelkező kalkonanalógok felhasználásával.

Vizsgált anyagok: ösztradiol-benzoát
tesztoszteron
tesztoszteron-propionát
hidrokortizon-acetát

Standard anyagok: *E*-2-(*X*-benzilidén)-1-benzoszuberon származékok

| | | | |
|---|-------|------------------------|------------------|
|  | Q-469 | X = H | $\log P$ 4,48 |
| | Q-510 | X = p-OCH ₃ | 4,72 |
| | Q-511 | X = p-CH ₃ | 5,10 |
| | Q-514 | X = m-Br | 5,35 |

Oldatkészítés: A vizsgálandó anyagokból és a standard anyagokból 2 mg/ml koncentrációjú oldatokat készítünk, az oldószer metanol + kloroform 1:1 arányú elegye.

Réteg: Kieselgel 60 F₂₅₄, szilanizált, 160 °C-on 1 órán át aktiválva

A réteg kijelölése:

- a lemez alsó szélétől a startpontok távolsága: 2,0 cm
- az első és utolsó startpont távolsága a lemez szélétől: 2,0 cm
- a startpontok száma max. 9; egymástól való távolsága: 2,0 cm (ha kevesebb a startpont, akkor egyenlő távolságokra felosztva)
- a front távolsága a startpontoktól: 15,0 cm

- Felvitel:* A standard oldatokból, valamint a vizsgált oldatokból 1-1 μl -t cseppentünk fel a rétegre.
- Eluens:* metanolt + víz 6:4 térfogatarányú elegye
A szűrőpapírral bélelt kádat, a futtatás előtt, az eluenssel 30 percig telítjük.
A lemez kivételénél azonnal jelöljük be a frontvonal tényleges helyzetét.
- Előhívás:* UV-fényben.
- Értékelés:* Tizedmilliméter pontossággal mérjük meg a foltok és a frontvonal startponttól mért távolságát. Számoljuk ki ezen adatokból két tizedes pontossággal az R_f értékeket.

Az R_f értékek segítségével számítsuk ki a vegyületek R_M értékeit. A standard anyagok R_M értékeinek és ismert $\log P$ értékeinek felhasználásával készítsünk kalibrációs egyenest, amelynek segítségével határozzuk meg a szteroid-származékok $\log P$ értékeit.

VII Gyógyszer hatóanyagok azonosításának módszerei

VII.1 Ismeretlen hatóanyagok azonosításának elvi alapjai

Organoleptikus vizsgálatok

Az azonosítás az adott gyógyszervegyületek mintájának megfigyelésével kezdődik, amit *érzékszervi (organoleptikus) vizsgálatnak* neveznek:

- a.) *látással*, a mintára ránézéssel eldönthető, hogy az szilárd vagy folyadék, lehet fehér (esetleg színtelen) vagy színes, porszerű vagy kristályos, nehéz – tapadós – tömör vagy könnyű - laza állományú. Némely anyag olyan jellegzetes, hogy a gondos megfigyelés már irányítja a vizsgálót, hogy mely vegyület lehet az (I₂, AgNO₃, riboflavin, éter, glicerin, stb.);
- b.) *tapintással* megállapítható, hogy a minta amorf por vagy igen finoman elporított kristályokból áll, lehet síkos vagy tapadós, száraz vagy nedves tapintású;
- c.) *szaglással* eldönthető, hogy az anyag szagtalan (ez a döntő többség) vagy jellegzetes szagú (maga vagy bomlásterméke);
- d.) *ízleléssel* sok vegyülettípus elég jól felismerhető - igen kis szemcse vagy mintarészlettel végezve ezt a próbát! (A GYAKORLATOK SORÁN AZ ANYAGOK ÍZLELÉSE TILOS! A kiadott ismeretlenek, a kitett modellanyagok szennyezettek vagy bomlottak lehetnek, így azok mérgezőknek tekintendők!)

Termolízis

A *termolízis* („*hevítési próba*”) igen egyszerű, de az anyagról sok ismeretet adó vizsgálat, amelyet jól húzó vegyifülke alatt végzünk el. Végrehajtásánál a minta kis részletét platina kacsra, vagy porcelánlemezre téve a *Bunsen* égő színtelen lángja fölé tartjuk, és lassan melegítjük, utána hevítjük, végül kiizzítjuk azt.

A vizsgálatot lassan fokozatosan, figyelmesen végezzük, úgy, hogy a mintát párszor kivesszük a lángból, és közelebről, tüzetesebben is megvizsgáljuk a változásokat: [lángfestés, szublimálás, olvadás (és annak sebessége), esetleg az „olvadék” beszáradása, olvadék színeződése – más változása, szenesedés, égés, színes maradék, kátrányos bevonat, jellegzetes szag (óvatosan, igen kis gőz vagy gáz mennyiséget szabad csak beszívni!), egyáltalán semmilyen változás.

A termolízissel alapvetően eldönthető, hogy az ismeretlenként kapott minta *szerves* vagy *szervetlen* vegyület. A szerves vegyületek tipikusan megolvadnak, szenesednek, füstölögnek, égnek, nincs maradékuk. A szervetlen vegyületek tipikusan nem olvadnak meg, nem szenesednek, nem füstölögnek, nem égnek, maradékuk van – a minta fő tömege, vagy mind megmarad az izzítás végén is.

| SZERVES VEGYÜLETEK | SZERVETLEN VEGYÜLETEK |
|--|--|
| megolvadnak az olvadék színesedik: tipikusan: sárga → barna → fekete | nem olvadnak meg ¹ |
| füstölögnek a gázok, gőzök szagosak (néhány szublimálhat!) | nincs füstjük ² néhány szublimál |
| elszenesednek korom, kátrány keletkezhet | nincs szenesedés (de lehet színesedés) |
| égnek, lángra kapnak nincs maradékuk ⁴ | nem égnek ³ van maradékuk (sok) |

¹ *Megolvadnak* izzításkor: H_3BO_3 , $Na_2B_4O_7$, $KClO_4$ (színtelen), S (vörös, ég), KSCN (kék), $NaNO_2$ (zöld → sárgásbarna), $AgNO_3$ (sárgásbarna → fekete).

A kristályvíz tartalmúak melegítéskor feloldódnak kristályvizükben („olvadás”-nak látszik kezdetben), majd beszáradnak, és ott marad a vízmentes só.

² Lassú melegítéskor *szublimálnak*, ami füstnek is vélhető (eleinte): NH_4^+ sók, As_2O_3 , Hg(I és II) sók.

³ Néhány alacsonyabb oxidációs állapotú S vagy P tartalmú vegyület *éghet*.

⁴ Tartós izzítás után legfeljebb *korom, kátrányos bevonat* lehet (amelyet csak magasabb hőmérsékleten és hosszabb idő alatt lehet elégetni), vagy a vegyület teljesen elég.

Maradéknak tekintjük, ha: (I) kevés színes maradék látható: Bi(III)-sók (sárga – narancsvörös); (II) a kiizzított maradékot fenolftaleines vízbe téve az pirosra színeződik: kálium-, nátrium-sók (intenzíven → karbonátok keletkeznek), kalcium-, magnézium-sók (gyengén → a karbonátokból oxidoknak kell keletkezniük). Megjegyzendő, hogy a szerves sóknál a maradék igen kis mennyiségű, szemmel történő észlelése még teljes kiizzítás után is nehéz.

A *lángfestés* a szerves kationokon kívül néhány vegyületre is jellemző: As_2O_3 (fakókék), bórsav-etilészter (zöld). Tipikusan az illékony szerves atomokra - ionokra jellemző, ezért végrehajtása előtt a vizsgálandó anyagra vagy annak kiizzított maradékára egy csepp sósavat teszünk, és azt vizsgáljuk: Na^+ (sárga, intenzív), K^+ (fakóibolya, nem intenzív), Ca^{2+} (tégla-vörös), Cu^{2+} (zöld), B (nagyon halvány zöld).

Összefoglalva a fentieket, a termolízis („hevítési próba”) alapján a vegyületek három nagy csoportba sorolhatók: (i) *tisztán szerveseknek* vagy (ii) *tisztán szervesek* vagy (iii) *sók* (szervesen vagy szerves komponenssel): *szerves savak alkáli vagy alkáliföldfém sói*, esetleg nehézfém-sók (a szerves sók közül a *bázisok szervesen savval képezett sóit* csak a következőkben leírt oldékonysági és anion vizsgálat után tudjuk megtalálni).

Sok vegyületről még ennél több információt is kapunk a hevítési próba során, ami a további azonosítást megkönnyíti. Jól észlelhető a szín változása, amely lehet irreverzibilis (pl. bizmut vegyületek: sárga → narancsvörös), vagy reverzibilis (pl. ZnO melegen sárga, lehűlve ismét fehér). A szerves vegyület olvadékának színváltozása is jellemző lehet egy vegyületcsaládra vagy vegyületre.

Az égés típusa a kis alifás molekuláknál és a sok oxigént tartalmazó vegyületeknél: kis, *világító láng*; míg aromás, telítetlen vegyületeknél: sárga,

némelyeknél *kormozó láng*. A vegyületek bomlásakor keletkező gőzök, gázok szaga (amit igen óvatosan kell észlelni) jellemző lehet egy vegyületre vagy típusra (vanília, karamell, fenol szag). A kalcium és főleg a magnézium vegyületekből keletkező oxidok erős izzításnál világítanak.

Oldékonyság és kémhatás vizsgálat

A vegyület azonosításakor az *oldékonyság és a közelítő kémhatás vizsgálat*al kiegészített organoleptikus és termolízis vizsgálat az igen nagyszámú gyógyszervegyületet néhány fontos és jellemző csoportba sorolja. A vízben való oldódás vizsgálatot mindig követi egy kémhatás vizsgálat is, akár oldódik a vegyület vízben, akár nem, ezért azt frissen kiforralt és lehűtött vízzel végezzük (a levegővel egyensúlyban levő desztillált víz gyengén savas).

Gyakorlati szempontok alapján azt a vegyületet tekintjük oldódónak, amelyből szobahőmérsékleten 5%-os oldat készíthető (pl.: 0,1 g/2 ml) egy - kétperces rázogatós után. Érdemes figyelni az oldódás sebességére, a kis szemcsék oldódására, a kémcső melegedésére vagy lehülésére is, mert az jellemző lehet egyes vegyületeknél.

A vegyületet, amiről már tudjuk, hogy szerves vagy szervetlen, először vízben (R víz vagy R desztillált víz) próbáljuk oldani. Amennyiben oldódik, a kémhatás megvizsgálása után a vegyületet besoroljuk: (1) savas tulajdonságú vagy (2), semleges tulajdonságú, vagy (3) bázisos tulajdonságú vízoldékony szerves vagy szervetlen molekula. Ismerve az e csoportokba tartozó szervetlen (és szerves) vegyületek listáját, azonosításuk már könnyen elvégezhető.

Vizes oldatban oldódó, gyengén savas vagy semleges tulajdonságú *szerves* vegyületek esetén szervetlen anionra kell vizsgálni (Cl^- , Br^- , I^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^-), és ha találunk aniont, a vegyületet külön csoportba, (4) a *szerves bázis szervetlen savval képzett sója* (tipikusan az alkaloid-sók) közé soroljuk.

Amennyiben *nem oldódik vízben* a vegyület, savas és bázisos oldószerben is megpróbáljuk oldani (ekkor már kémhatás és anion vizsgálatot nem végzünk). Amely vegyületek hígított sósav-oldatban oldhatók, a bázisos tulajdonságú, savoldékony vegyületek csoportjába (5) kerülnek. Azok a vegyületek, amelyek hígított nátrium-hidroxid-oldatban oldódnak, a savas tulajdonságú, lúgoldékony vegyületek csoportjába (6) kerülnek. Ha egy vegyület mindkét reagensben (HCl, NaOH) oldódik, akkor az amfoter vegyületek csoportjába (7) kerül. Vannak vegyületek, amelyek ilyen körülmények között nem oldhatók, azok a *vízben, híg vizes savban és lúgban nem oldható vegyületek* csoportjába (8) sorolandók.

A fenti besorolás szerint azok a só típusú vegyületek, melyeknél mind a kation, mind az anion komponens szerves molekula a *tisztán szerves vegyületek* csoportjába sorolódnak. Szerves vegyület sójának ez a rendszer csak a szervetlen komponenst (kationt vagy aniont) is tartalmazókat tekinti. A szerves kationt és szerves aniont tartalmazó molekulákat tehát tisztán szerves vegyületeknek tekintjük.

A csoportokba sorolás után, ismerve az oda tartozó vegyületek listáját, azonosításuk, megkülönböztetésük könnyen elvégezhető.

VII.2 Gyógyszerkönyvi azonossági vizsgálatok

Szervetlen ionok azonossági reakciói a Ph. Hg. VIII.-ban (Válogatás)

Alumínium

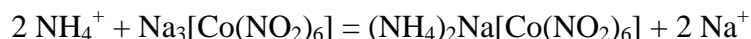
Kb. 15 mg vizsgálandó anyag 2 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 2 ml-ét vizsgáljuk. Kb. 0,5 ml *R* hígított sósav és kb. 0,5 ml *R* tioacetamid-reagens hozzáadására csapadék nem keletkezik. Az oldathoz ezután *R* hígított nátrium-hidroxid-oldatot csepegtetünk. A kezdetben leváló fehér kocsonyás csapadék a kémszer feleslegében feloldódik, de *R* ammónium-klorid-oldat hozzáadására ismét leválik.

Az alumíniumsó sósavas oldatához tioacetamid-reagenst adva nincs csapadék. Ez a reakció kizárja azokat a kationokat, amelyek szintén amfoter tulajdonságúak, de savas közegben szulfidionokkal csapadékot képeznek (pl. ólom, ón, antimon). Tovább az alumíniumiont szelektív reakciójával azonosítjuk.

Ammóniumsók

Az előírt oldathoz 0,2 g *R* magnézium-oxidot adunk. A keveréken levegőt áramoltatunk át, amelyet azután 1 ml 0,1 M sósav-mérőoldat és 0,05 ml metilvörös-oldat elegyébe, közvetlenül a folyadék felszíne alá vezetünk. Az indikátor színe sárgára változik. Az oldathoz ezután *R* nátrium-[hexanitrito-kobaltát(III)] frissen készített, 100 g/l töménységű oldatának 1 ml-ét elegyítjük. Sárga csapadék keletkezik.

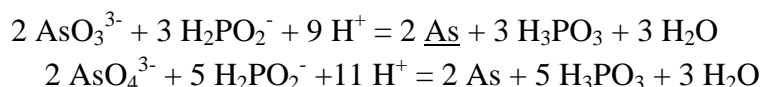
A magnézium-oxid erős és nem illékony bázis, így kiszorítja sójából az ammóniát, ami egy gyenge és illékony bázis. Az ammónia gázt sósavba vezetve semlegesíti azt, és a hozzáadott indikátor színét megváltoztatja. A keletkező ammóniumionok nátrium-hexanitrito-kobaltáttal sárga csapadékot adnak (káliumionok szintén adják a reakciót):



Arzén

Az előírt oldat 5 ml-ét azonos térfogatú *R* hipofoszfít-reagenssel vízfürdőn melegítjük. Barna csapadék keletkezik.

A hipofoszfitionok redukálják az arzenit- vagy arzenátionokat arzénné, ami barna csapadékként kiválik az oldatból:



Bizmut

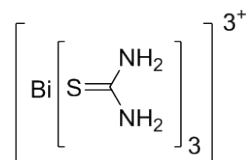
a) Kb. 0,5 g vizsgálandó anyaghoz 10 ml *R* hígított sósavat adunk vagy az előírt oldat 10 ml-ét vizsgáljuk. Az oldatot, illetve a keveréket 1 percen át forraljuk, majd lehűtjük, és szükség esetén megszűrjük. Az így kapott oldat 1 ml-éhez 20 ml *R* vizet elegyítünk. Fehér vagy enyhén sárgás csapadék keletkezik, amely 0,05-0,1 ml *R* nátrium-szulfid-oldat hozzáadására megbarnul.

A bizmut ionok egyik tipikus azonosítási reakciója.

b) Kb. 45 mg vizsgálandó anyaghoz 10 ml *R* hígított salétromsavat adunk vagy az előírt oldat 10 ml-ét vizsgáljuk. Az oldatot, illetve a keveréket 1 percen át forraljuk, majd lehűtjük, és szükség esetén megszűrjük. Az így kapott oldat 5 ml-éhez *R*

tiokarbamid 100 g/l töménységű oldatának 2 ml-ét elegyítjük. Narancssárga szín vagy narancsszínű csapadék keletkezik. Az oldat nem színtelenedik el, ha *R nátrium-fluorid* 25 g/l töménységű oldatának 4 ml-ét elegyítjük hozzá.

Salétromsavas közegben a bizmut(III)-ionok narancsszínű komplexet képeznek a tiokarbamiddal. Az antimon(II)-ionok halványsárga komplexet képeznek, ez azonban fluoridionok hatására elbomlik.



Bromid

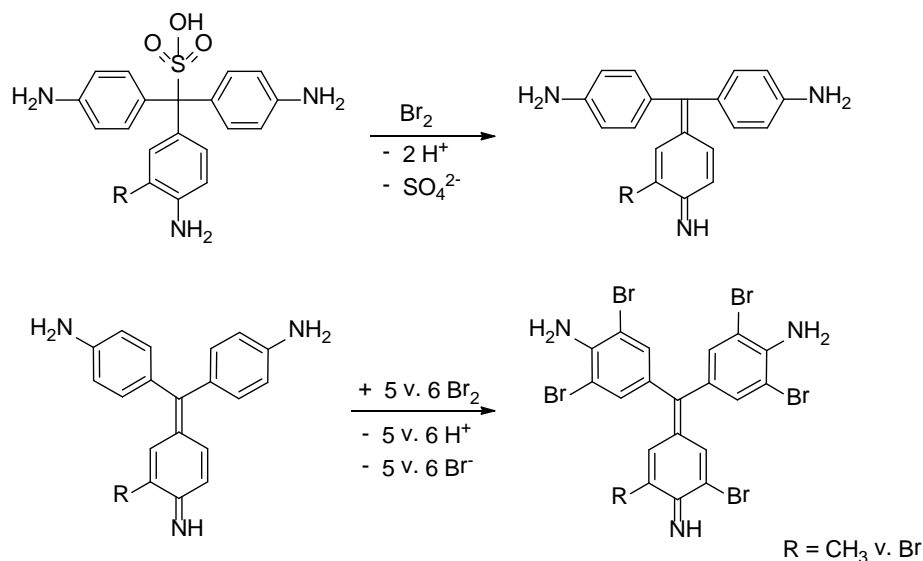
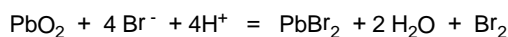
a) Kb. 3 mg bromidionnak (Br^-) megfelelő mennyiségű vizsgálandó anyag 2 ml *R vízzel* készített oldatát vagy az előírt oldat 2 ml-ét vizsgáljuk. Az oldatot *R hígított salétromsavval* megsavanyítjuk, 0,4 ml *R1 ezüst-nitrát-oldattal* összerázzuk, majd állni hagyjuk. Halványsárga, túrós csapadék válik le. Centrifugálást követően a csapadékot háromszor 1 ml *R vízzel* mossuk. Ezt a műveletet tompított fényben gyorsan végezzük és a felülúszó folyadék zavarosságát figyelmen kívül hagyjuk. A 2 ml *R vízben* szuszpendált csapadék 1,5 ml *R ammónia-oldattal* elegyítve nehezen oldódik.

Salétromsavas közegben nagyon halványsárga csapadékot képez ezüst ionokkal, ami ammóniában nehezen oldódik.

b) Kb. 5 mg bromidionnak (Br^-) megfelelő vagy az előírt mennyiségű vizsgálandó anyagot kis kémcsőben 0,25 ml *R vízzel*, kb. 75 mg *R ólom(IV)-oxiddal* és 0,25 ml *R tömény ecetsavval* óvatosan összerázzunk. A kémcső felső részét belül szűrőpapírral szárazra töröljük. 5 percen át várakozunk. Megfelelő minőségű és méretű szűrőpapírcsík egyik végét egy csepp *R elszíntelenített fukszin-oldattal* megnedvesítjük, és a papír impregnált részét azonnal a kémcső légtérébe helyezzük. 10 másodpercen belül a szűrőpapírcsík végétől kiinduló, ibolyaszíneződés észlelhető. Ez a szín egyértelműen megkülönböztethető a fukszin piros színétől, mely az impregnált papírcsík felső kis részén szintén megjelenhet.

Az ólom(IV)-oxid a bromidionokat elemi brómmá oxidálja. A képződött bróm a színtelen Schiff-reagensben (rozalin és para-rozalin keverék kénessavas oldata) levő fukszint oxidálja, majd az aktivált aromás gyűrűket szubsztituálja orto-helyzetben: penta- és hexabrom-rozanilinium sók keletkeznek.

VII-1. ábra:

**Cink**

0,1 g vizsgálandó anyag 5 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 5 ml-ét vizsgáljuk. Az oldathoz 0,2 ml *R* tömény nátrium-hidroxid-oldatot elegyítve, fehér csapadék keletkezik. További 2 ml *R* tömény nátrium-hidroxid-oldat hozzáadására a csapadék feloldódik. Az oldat 10 ml *R* ammónium-klorid-oldattal elegyítve tiszta marad, de 0,1 ml *R* nátrium-szulfid-oldattól fehér, pelyhes csapadék válik ki belőle.

A keletkező fehér csapadék $[\text{Zn}(\text{OH})_2]$ lúg feleslegében feloldódik (hidroxo komplex). Ammónium-klorid hozzáadására nem válik le a lúgos oldatból csapadék (ammin komplex). Csak nátrium-szulfid hatására válik le fehér csapadék (ZnS).

Foszfát (ortofoszfát)

a) Az előírt oldat 5 ml-ét – ha szükséges, előzetesen semlegesítve – 5 ml *RI* ezüst-nitrát-oldattal elegyítjük. Sárga csapadék keletkezik, amelynek színe forraláskor nem változik. A csapadék *R* ammónia-oldat hozzáadására feloldódik.

Semleges, vagy semlegesített oldatához ezüst-nitrátot adva sárga csapadék keletkezik (Ag_3PO_4), ami forralva nem, viszont ammóniában oldódik (ezüst ammin komplexe).

b) Az előírt oldat 1 ml-ét 2 ml *R* molibdovanadát-reagenssel elegyítjük. Sárga színeződés észlelhető.

A reagens ammónium-molibdátot $[(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4]$ és ammónium-vanadátot $[(\text{NH}_4)_3\text{VO}_4]$ tartalmaz, ami a foszfáttal vegyes heteropolisavat $[\text{PV}_2\text{Mo}_{10}\text{O}_{40}]^{5-}$ képez.

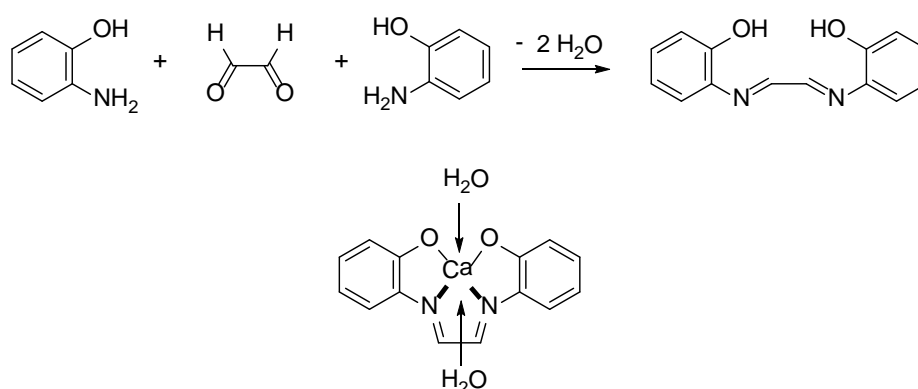
Az arsenát és a szilikát ionok hasonlóan reagálnak.

Kalcium

a) A milliliterenként kb. 0,2 mg kalciumionnak (Ca^{2+}) megfelelő mennyiségű vizsgálandó anyagot tartalmazó oldat 0,2 ml-ét vagy az előírt oldat 0,2 ml-ét vizsgáljuk. Az oldathoz *R glioxálhidroxianil R alkoholos*, 2 g/l töménységű oldatából 0,5 ml-t, valamint 0,2 ml *R hígított nátrium-hidroxid-oldatot* és 0,2 ml *R nátrium-karbonát-oldatot* elegyítünk. Összerázzuk 1-2 ml *R kloroformmal*, majd 1-2 ml *R vizet* adunk hozzá. A kloroformos réteg vörösre színeződik.

A glioxálhidroxianil hidroxianilinből és glioxálból keletkezik, és kalciumionokkal vörös (ibolyás-vörös) kelátkomplexet képez ($\lambda_{\text{max.}}=520 \text{ nm}$).

A glioxál-hidroxianillel szintén komplexet képző alkáliföldfém ionok (Ba^{2+} , Sr^{2+}) rosszul oldódó karbonátokként kiválnak.

VII-2. ábra:

b) Kb. 20 mg vagy előírt mennyiségű vizsgálandó anyagot 5 ml *R ecetsavban* oldunk. Az oldat 0,5 ml *R kálium-[hexaciano-ferrát(II)]-oldattal* elegyítve tiszta marad, de kb. 50 mg *R ammónium-klorid* hozzáadásakor fehér, kristályos csapadék válik ki belőle.

A kalciumionok ammónia jelenlétében fehér csapadékot képeznek a hexaciano-ferrát(II) ionokkal: $(\text{NH}_4)_2[\text{CaFe}(\text{CN})_6]$.

A bárium- és stronciumionok nem reagálnak, viszont a magnéziumionok hasonló csapadékot képeznek.

Kálium

a) 0,1 g vizsgálandó anyag 2 ml *R vízzel* készült oldatát vagy az előírt oldat 2 ml-ét vizsgáljuk. Az oldatot 1 ml *R nátrium-karbonát-oldattal* elegyítjük, majd melegítjük. Csapadék nem keletkezik. Akkor sem válik le csapadék, ha a még meleg oldathoz 0,05 ml *R nátrium-szulfid-oldatot* adunk. Az oldatot jeges vízben lehütjük, és *R borkősav* 150 g/l töménységű oldatának 2 ml-ével elegyítjük. Lassanként fehér kristályos csapadék válik le.

A vizsgálat első felében más kationok jelenlétét zárjuk ki (nátrium-karbonáttal az alkáliföldfémeket, nátrium-szulfiddal a nehézfémeket). A kálium-hidrogén-tartarát csapadék hajlamos a túltelített oldat képzésére, ezért üvegbottal megdörzsölve a kémcső belső falát meggyorsíthatjuk a csapadék leválását.

b) Kb. 40 mg vizsgálandó anyag 1 ml *R vízzel* készült oldatát, vagy az előírt oldat 1 ml-ét vizsgáljuk. Az oldathoz 1 ml *R hígított ecetsavat* és *R nátrium-hexanitrito-*

kobaltát(III) frissen készített, 100 g/l-es oldatából 1 ml-t elegyítünk. Azonnal sárga vagy narancssárga csapadék keletkezik.

$K_2Na[Co(NO_2)_6]$ sárga vagy narancssárga csapadék keletkezik. Ammóniumionok szintén adják a reakciót.

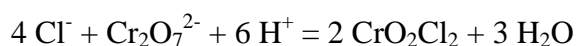
Klorid

a) Kb. 2 mg kloridionnak (Cl^-) megfelelő mennyiségű vizsgálandó anyag 2 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 2 ml-ét vizsgáljuk. Az oldatot *R* hígított salétromsavval megsavanyítjuk, 0,4 ml *R1* ezüst-nitrát-oldattal összerázzuk, majd állni hagyjuk. Fehér, túros csapadék válik le. Centrifugálást követően a csapadékot háromszor 1 ml *R* vízzel mossuk. Ezt a műveletet tompított fényben gyorsan végezzük és a felülúszó folyadék zavarosságát figyelmen kívül hagyjuk. A csapadékot 2 ml *R* vízben szuszpendáljuk. A csapadék – néhány nagyobb, lassan oldódó részecskétől eltekintve - 1,5 ml *R* ammónia-oldatban könnyen oldódik.

Salétromsavas közegben ezüst-nitráttal fehér csapadékot képez, ami ammóniában könnyen oldódik.

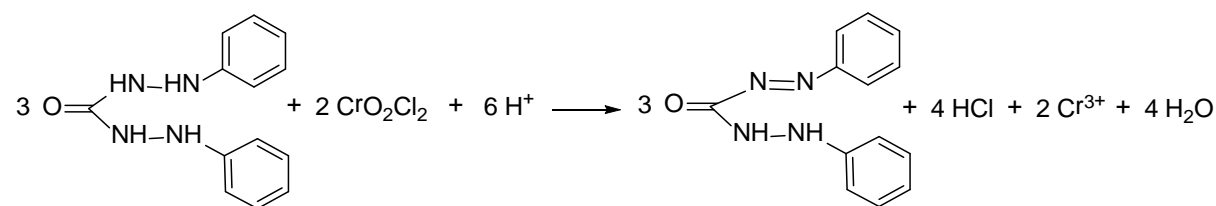
b) Kb. 15 mg kloridionnak (Cl^-) megfelelő vagy előírt mennyiségű vizsgálandó anyagot kémcsőben 0,2 g *R* kálium-dikromáttal és 1 ml *R* tömény kénsavval elegyítünk. A kémcső nyílása fölé egy 0,1 ml *R* difenilkarbazid-oldattal átítatott szűrőpapírcsíkot tartunk. Az átítatott szűrőpapír – amely nem érintkezhet a kálium-dikromáttal – ibolyavörösre színeződik.

Tömény kénsavas közegben a kloridionok a dikromátionokkal illékony kromilkloridot képeznek:



A kromilklorid, mint króm(VI) vegyület, oxidálja a difenilkarbazidot difenilkarbazonná, majd a keletkező króm(III)-ionok a difenilkarbazonnal színes 1:1 komplexet képeznek:

VII-3. ábra:



Magnézium

Kb. 15 mg vizsgálandó anyag 2 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 2 ml-ét vizsgáljuk. Az oldathoz 1 ml *R1* hígított ammónia-oldatot elegyítve fehér csapadék keletkezik, amely 1 ml *R* ammónium-klorid-oldat hozzáadására feloldódik. Az oldathoz 1 ml *R* dinátrium-hidrogénfoszfát-oldatot elegyítünk. Fehér, kristályos csapadék keletkezik.

Vizes oldatához híg ammóniát adva fehér csapadék válik le, ami ammónium-kloridban oldódik, majd dinátrium-hidrogénfoszfát hatására (más összetételű) fehér csapadék válik le.

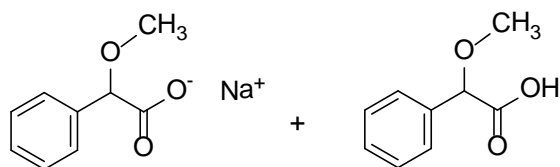
Nátrium

a) 0,1 g vizsgálandó anyag 2 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 2 ml-ét vizsgáljuk. Az oldatot *R* kálium-karbonát 150 g/l töménységű oldatának 2 ml-ével forrásig melegítjük. Csapadék nem keletkezik. Az oldathoz 4 ml *R* kálium-[hexahidro-antimonát(V)]-oldatot elegyítünk, és ismét forrásig melegítjük. Ezután jeges vízben hűtjük, és ha szükséges, a kémcső belső falát üvegbottal dörzsölgetjük. Fehér, sűrű csapadék keletkezik.

A vizsgálat első felében kizárjuk a legtöbb más kation jelenlétét. A leváló Na[Sb(OH)₆] túltelített oldat képzésére hajlamos.

b) Kb. 2 mg nátriumionnak (Na⁺) megfelelő mennyiségű vizsgálandó anyag 0,5 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 0,5 ml-ét vizsgáljuk. Az oldathoz *R* metoxifenilecetsav-reagens 1,5 ml-ét elegyítjük, és 30 percen át jeges vízben hűtjük. Fehér, laza, kristályos csapadék keletkezik. A csapadékos folyadékot 20°C-os vízfürdőbe helyezve, 5 percen át keverjük. A csapadék nem tűnik el, de 1 ml *R1* hígított ammónia-oldat hozzáadásakor feloldódik, és 1 ml *R* ammónium-karbonát-oldattól sem válik le újból.

Szobahőmérsékleten a kristályosodási folyamat lassú, ezért kell a hűtés. A reakció szelektívebb a magnézium-uranil-acetátos reakciónál.

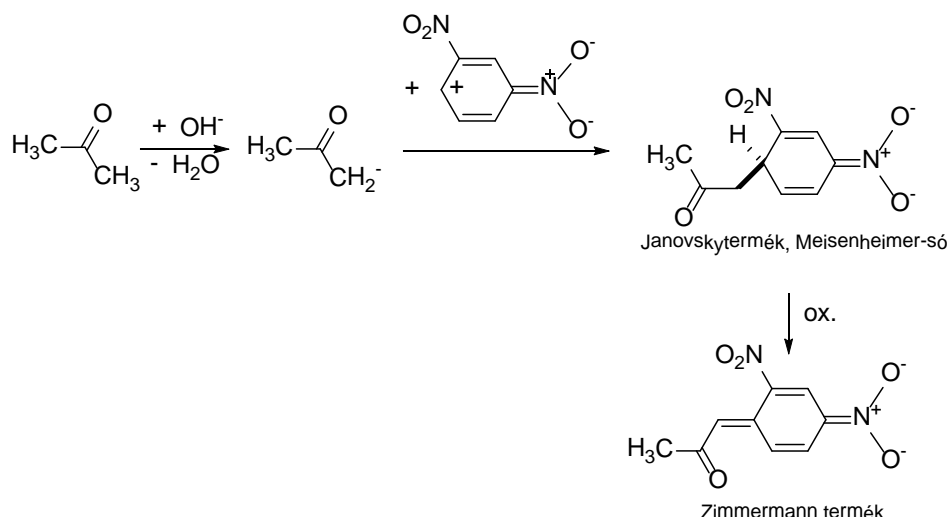


Nitrát

Kb. 1 mg nitrátióknak (NO₃⁻) megfelelő vagy előírt mennyiségű, elporított vizsgálandó anyagot 0,1 ml *R* nitrobenzol és 0,2 ml *R* tömény kénsav elegyéhez adunk. 5 perc várakozás után a keveréket jeges vízben lehűtjük. Kevergetés közben óvatosan 5 ml *R* vizet, majd 5 ml *R* tömény nátrium-hidroxid-oldatot, végül 5 ml *R* acetont elegyítünk hozzá. A keveréket összerázzuk és állni hagyjuk. A felső réteg sötétibolyára színeződik.

Pesez reakció: tömény kénsavas közegben a nitrátiókból salétromsav keletkezik, ami meta-helyzetben nitrálja a nitrobenzolt. A keletkező *m*-dinitrobenzol reagál erősen lúgos közegben az acetonnal színes Janovsky-termék (Meisenheimer-só) illetve ennek oxidációjával Zimmermann-termék keletkezése közben. A reakció specifikus, a nitritionok nem zavarják.

VII-4. ábra:



Szulfát

a) Kb. 45 mg vizsgálandó anyag 5 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 5 ml-ét vizsgáljuk. Az oldathoz 1 ml *R* hígított sósavat és 1 ml *R1* bárium-klorid-oldatot elegyítünk. Fehér csapadék keletkezik.

b) Az a) vizsgálatban nyert csapadékos folyadékhoz 0,1 ml 0,05 M jód-mérőoldatot adva, a keverék sárga színe megmarad, azonban elszíntelenedik, ha *R* ón(II)-klorid-oldatot csepegtetünk hozzá.

Az előző reakciónál kapott szuszpenzióhoz (BaSO₄) jódot adva megmarad annak a sárga színe (megkülönböztetés szulfittól és ditionittól, de ón(II)-klorid hozzáadására elszíntelenedik (megkülönböztetés a jodáttól). Az elegyet forralva nem keletkezik színes csapadék (megkülönböztetés szelenáttól és wolframáttól).

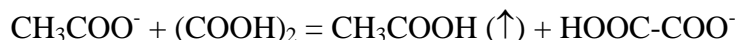
A Ba(IO₃)₂ az ón(II)-ionok hatására keletkező jodidionokat ismét jóddá oxidálná. Az elegy forralásakor pedig vörös szelén és wolfram-kék válna ki, ha ezek sói lennének jelen.

Funkciós csoportok azonosítási reakciói a Ph. Hg. VIII.-ban (Válogatás)

Acetát

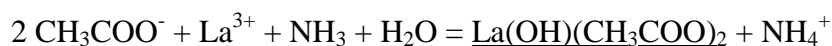
a) A vizsgálandó anyagot azonos mennyiségű *R* oxálsavval melegítjük. Jellemző szagú, savas kémhatású ecetsavgőzök keletkeznek.

A kevésbé illékony és erősebb oxálsav kiszorítja a gyengébb és illékonyabb ecetsavat sójából:



b) Kb. 30 mg vizsgálandó anyag 3 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 3 ml-ét vizsgáljuk. Az oldatot rendre 0,25 ml *R* lantán(III)-nitrát-oldattal, 0,1 ml 0,05 M jód-oldattal és 0,05 ml *R2* hígított ammónia-oldattal elegyítjük, majd óvatosan forrásig melegítjük. Néhány percen belül kék csapadék vagy sötétkék színeződés keletkezik.

Ammóniás közegben, jód jelenlétében lantán-nitrát-oldattal kék színt adnak óvatos forrásig melegítés után:



Alkaloidok

A vizsgálandó anyag néhány mg-ját vagy előírt mennyiségét 5 ml *R* vízben oldjuk. Az oldatot *R* hígított sósavval megsavanyítjuk és 1 ml *R* kálium-[tetrajodo-bizmutát(III)]-oldattal elegyítjük. Azonnal narancssárga vagy narancsvörös csapadék keletkezik.

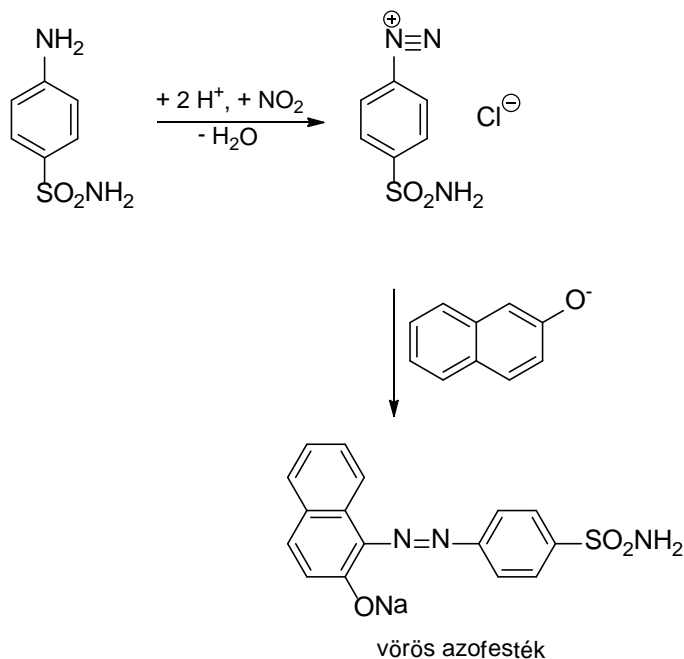
Sósavas oldatukban Dragendorff-reagenssel (kálium-[tetrajodo-bizmutát(III)]-oldattal) narancssárga vagy narancsvörös csapadékot adnak (tipikus csapadékos alkaloid reakció). A tetrajodo-bizmutát-ionok nagyméretű szerves kationokkal (pl. protonált ammóniumsók) színes csapadékot adnak: $\text{HAlk[BiI}_4\text{]}$.

Aromás primer aminok

Az előírt oldatot *R* hígított sósavval megsavanyítjuk és 0,2 ml *R* nátrium-nitrit-oldattal elegyítjük, majd 1-2 perc múlva 1 ml *R* 2-naftol-oldatot adunk hozzá. Az elegy intenzív narancssárgára vagy vörösre színeződik, miközben rendszerint azonos színű csapadék is leválik.

Sósavas oldathoz nátrium-nitritet adva diazónium kation keletkezik, amely lúgos 2-naftol (= β -naftol)-oldattal vörös (esetleg narancssárga) azoszinezékké kapcsolódik.

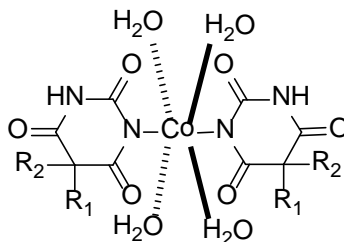
VII-5. ábra:



Nitrogénen nem szubsztituált barbitursav származékok

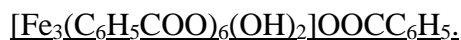
Kb. 5 mg vizsgálandó anyagot 3 ml *R metanolban* oldunk. Az oldathoz literenként 100 g *R kobalt(II)-nitrátot* és 100 g *R kalcium-kloridot tartalmazó oldat* 0,1 ml-ét, majd rázogatás közben *R hígított nátrium-hidroxid-oldat* 1 ml-ét elegyítjük. Ibolyáskék színeződés és ibolyáskék csapadék keletkezik.

Metanolban (nemvizes közegben!) kobalt-ionokkal, lúgos oldatban (NaOH) ibolyaszínű, oktaéderes komplexet képeznek (Parri-Zwicker reakció). A bázisos komponens a deprotonálódás elősegítését szolgálja. A reakció nem specifikus, adják a hidantoinok, bizonyos piridin és piperidin származékok, szulfonamidok, purinok is.

**Benzoát**

a) Az előírt oldat 1 ml-éhez 0,5 ml *R1 vas(III)-klorid-oldat*ot elegyítünk. Sárgás-rózsaszínű csapadék keletkezik, amely *R éterben* oldódik.

A csapadék valószínűleg hexabenzóato-vas(III) komplex benzoátja:



b) A vizsgálandó – szükség esetén az előírt módon előkészített – anyag 0,2 g-ját kémcsőben 0,2-0,3 ml *R tömény kénsavval* megnedvesítjük. A kémcső alját enyhén melegítve, fehér szublimátum rakódik le a kémcső falán.

A kénsav kiszorítja sójából a benzoésavat, ami könnyen szublimál. A mintát óvatosan kell melegíteni, nehogy elszenesedjen!

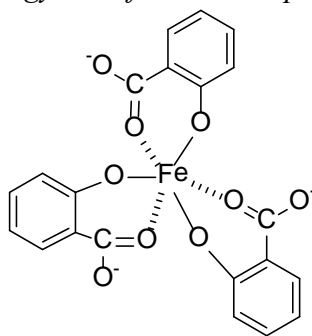
c) Kb. 0,5 g vizsgálandó anyag 10 ml *R vízzel* készült oldatát vagy az előírt oldat 10 ml-ét vizsgáljuk. Az oldathoz 0,5 ml *R tömény sósavat* elegyítve csapadék válik le. A meleg *R vízből* átkristályosított és vákuumban szárított kristályok olvadáspontja: 120-124°C.

Oldatának megsavanyításakor benzoésav válik ki, amit olvadáspontja alapján azonosítunk.

Citrát

Kb. 50 mg citromsavnak megfelelő mennyiségű vizsgálandó anyag 5 ml *R vízzel* készült oldatát vagy az előírt oldat 5 ml-ét vizsgáljuk. Az oldatot 0,5 ml *R tömény kénsavval* és 1 ml *R kálium-permanganát-oldattal* elegyítjük, és a kálium-permanganát színének eltűnéséig melegítjük. Ezután *R nitroprusszid-nátrium R hígított kénsavval* készült 100 g/l töménységű oldatának 0,5 ml-ét és *R szulfamidsav* 4 g-ját adjuk hozzá. A keverékhez a szulfamidsav oldódásáig *R tömény ammónia-oldat*ot csepegtetünk. Az oldat az *R tömény ammónia-oldat* feleslegétől ibolyaszínűre, majd ibolyáskékre színeződik.

Kelát komplex keletkezik a fenolos hidroxilcsoport és a karboxilcsoport karbonil oxigénjével, ami jóval stabilabb az egyszerű fenolok komplexénél.

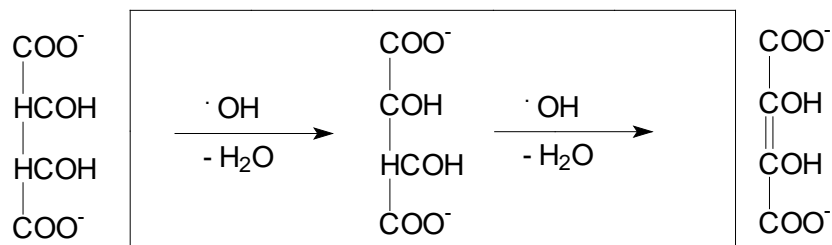
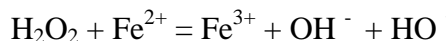


b) 0,5g vizsgálandó anyag 10 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 10 ml-ét vizsgáljuk. Az oldatból 0,5 ml *R* tömény sósav hozzáadására csapadék válik le. A forró *R* vízből átkristályosított és vákuumban szárított kristályok olvadáspontja: 156-161°C.

Tartarát

a) Kb. 15 mg vizsgálandó anyag 5 ml *R* vízzel készült oldatát vagy az előírt oldat 5 ml-ét vizsgáljuk. Az oldathoz *R* vas(II)-szulfát 10 g/l töménységű oldatának 0,05 ml-ét és *R* hígított hidrogén-peroxid-oldat 0,05 ml-ét elegyítjük. Múlékony, sárga színeződés észlelhető. Elszíntelenedés után az oldathoz *R* hígított nátrium-hidroxid-oldatot csepegtetünk. Intenzív kék szín keletkezik.

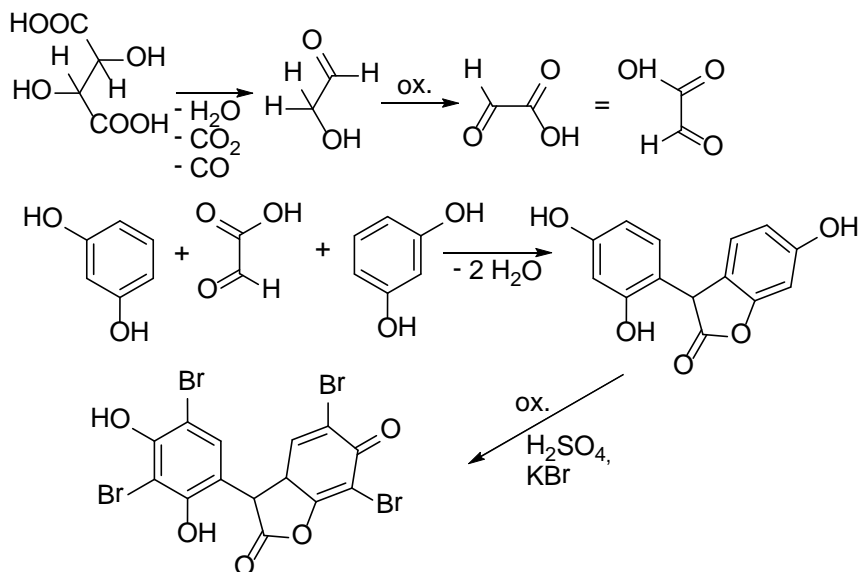
A hidrogén-peroxid vas(II)-ionok jelenlétében a borkósavat dihidroxi-fumársavvá, a vas(II)-ionokat vas(III)-ionokká oxidálja, és a két termék lúgos közegben ibolyás-kék komplexet képez.



b) A milliliterenként kb. 15 mg borkósavnak megfelelő mennyiségű vizsgálandó anyagot tartalmazó oldat vagy az előírt oldat 0,1 ml-ét vizsgáljuk. Az oldathoz *R* kálium-bromid-oldatának (100 g/l) 0,1 ml-ét és *R* rezorcin-oldatának (20 g/l) 0,1 ml-ét elegyítjük, majd 3 ml *R* tömény kénsavat is adunk hozzá. Az 5-10 percen át vízfürdőn melegített oldat sötétkékre színeződik. A lehűlt oldatot *R* vízbe öntve, a szín vörösre változik.

Pesez reakció: *a borkósavból dekarboxileződés, dekarbonileződés és dehidratáció hatására glikolaldehid keletkezik, ami glioxilsavvá oxidálódik. A glioxilsav, mint aldehid, két molekula rezorcinnal difenilmetán származékká kondenzálódik. Ezzel egyidőben gyűrűzáródással laktonná alakul. Ez a brómmal reakcióba lépve kinoidális szerkezetű brómszubsztituált származékká alakul, ami tömény kénsavban kék oxóniumsó formájában van jelen. A vízfürdőn történő melegítés elősegíti az egyes reakciólépések lezajlását:*

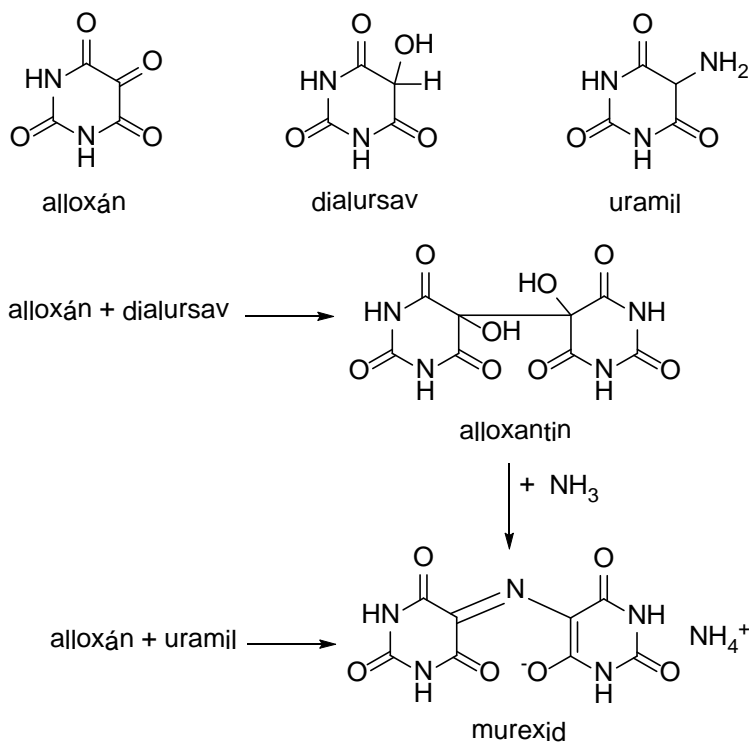
VII-6. ábra:



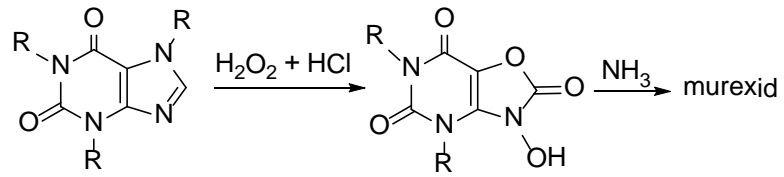
Xantin származékok

A vizsgálandó anyag néhány mg-jához vagy előírt mennyiségéhez 0,1 ml *R* tömény hidrogén-peroxid-oldatot és 0,3 ml *R* hígított sósavat adunk. A keveréket vízfürdőn szárazra párologtatjuk. A sárgászöldes maradék 0,1 ml *R2* ammónia-oldat hozzáadására ibolyászínes színűre változik.

A reakcióban murexid, illetve *N*-metil-származékai keletkeznek. Korábbi elképzelések szerint a xantin származékok oxidatív – hidrolitikus lebomlásával pirimidin származékok keletkeznek, amik (pl. alloxán és uramil) purpursavvá kondenzálódnak, ennek ammónium sója a bíborvörös murexid. A metilezett xantin származékok reakciójában a megfelelő *N*-metil-murexidek keletkeznek, amelyek szintén bíborvörösek.



Újabb vizsgálatok szerint az oxidáció során oxazolo[4,5-d]pirimidin keletkezik, ez reagál az ammóniával murexid képződése közben.



VIII ÖSSZETETT GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK VIZSGÁLATA

A gyógyszerkészítmény meghatározott gyógyszerformájú, általában több alkotórészből: hatóanyag(ok)ból és segédanyag(ok)ból álló gyógyszert jelent. Az összetett gyógyszerkészítmények lehetnek magisztrális, valamint törzskönyvbe bejegyzett gyári készítmények.

Az összetett gyógyszerkészítmények vizsgálata tulajdonképpen a gyógyszer-analitikai módszerek kiterjesztése többkomponensű rendszerekre, illetve különböző gyógyszerformákra.

VIII.1 A vizsgálat célja, a megfelelő módszer kiválasztása

Egy adott összetett gyógyszerkészítmény vizsgálatához alkalmas módszer kiválasztásánál alapvető kérdés, hogy a vizsgálatot milyen célból (kvalitatív vagy kvantitatív meghatározás) kívánjuk elvégezni és a vizsgálni kívánt anyagok milyen kémiai, ill. fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, valamint milyen gyógyszerformáról van szó.

VIII.1.1 Az alkalmazott módszer szelektivitása és érzékenysége

Összetett gyógyszerkészítmények esetén az összetétel meghatározott, tehát adott, hogy mely komponenseket kell azonosítani, illetve mennyiségileg meghatározni. Az összetevők ugyanakkor különböző módon viszonyulhatnak egymáshoz. Lehetnek egymással szemben közömbösek, vagyis egy megfelelően kiválasztott szelektív és specifikus reakció esetén nem zavarják egymás meghatározását.

Sokkal gyakrabban fordul elő azonban, hogy nem találunk megfelelően szelektív és specifikus reakciót, amivel a komponensek egymás mellett könnyen kimutathatók lennének, vagyis zavarják egymást. Még ha létezik is specifikus reakció, a komponensek mennyiségi viszonyai miatt - amikor a meghatározandó komponens csak nagyon kis mennyiségben van jelen a többihez képest - a reakció nem elég érzékeny. Tehát a kis mennyiségben szereplő komponensek azonosításánál, meghatározásánál igen érzékeny reakció szükséges.

Az alkalmas módszer kiválasztásánál tehát kulcsfontosságú a kiválasztott módszer *szelektivitása, specificitása, érzékenysége és pontossága*.

A kísérő komponensek, társhatóanyagok, segédanyagok sokszor csak a reakció értékelését nehezítik meg. Például a titrálás végpontját jelző indikátor átcsapásának észlelését akadályozzák, vagy spektrofotometriás meghatározásnál háttérspektrumként jelentkeznek. Az egyes komponensek között létrejövő kölcsönhatások következtében megváltozhatnak egyes anyagok oldékonysági tulajdonságai, minek következtében a várakozástól eltérő eredmények születhetnek. Előfordulhat, hogy a készítmény egyes komponensei a meghatározandó komponens mérését nagymértékben zavarják, például többlet mérőoldat fogyást, vagy spektrofotometriás mérésnél fényabszorpció többletet okoznak. Amennyiben a kísérő komponens zavaró hatása nagymértékű, és nem lehet kiküszöbölni, akkor a meghatározandó komponenseket el kell választani.

VIII.1.2 A komponensek elválasztásának lehetőségei

A meghatározandó komponens elválasztásának több alternatívája lehet. Oldékonysági adatok ismeretében lehetőség van egy megfelelően kiválasztott oldószer segítségével a vizsgálandó komponens *szelektív kioldás*ára, ami főleg szilárd fázisú minták esetén valósítható meg.

Amennyiben a komponensek kémiai tulajdonságai lehetővé teszik, szintén jól használható megoldás a *megoszláson alapuló elválasztás*. A folyadék-folyadék extrakció egymással nem elegyedő folyadékfázisok közötti megoszláson alapszik. Az egymással nem elegyedő fázisok egyike rendszerint vizes közeg, míg a másik valamilyen szerves oldószer. A vizes közeg kémhatásának változtatásával az ionizálható csoportot tartalmazó vegyületek protonáltsági állapota, így töltése is befolyásolható. Ezáltal a vegyület megoszlását is befolyásolni lehet, hiszen általánosságban elmondható, hogy a töltéssel rendelkező részecskék általában a vizes fázisban, míg a töltéssel nem rendelkező, semleges részecskék az apoláris fázisban lesznek megtalálhatóak. Például a gyógyszervegyületek meghatározó csoportját képezik a gyenge szerves bázisok szerves savakkal képezett sói, amelyek vízben jól oldódnak. Ha a vizes fázist meglúgosítjuk, akkor felszabadul sójából a bázis, amelyik - mint nemionizált részecske - könnyen átoldódik a szerves fázisba.

Természetesen akadnak kivételek is, például a több gyógyszerkészítményben is előforduló papaverin-hidroklorid. Lúgos közegből a papaverin bázis természetesen átrázható szerves oldószerbe, például kloroformba. Ugyanakkor savas közeg esetén, annak ellenére, hogy a papaverin egyszeres pozitív töltést hordoz, ugyancsak átkerül a szerves fázisba, sőt vele együtt ellenionként a klorid ion is megjelenik a kloroformos fázisban. Ezt a tartalmi meghatározás során figyelembe kell venni.

A kirázásos módszer akkor is előnyös lehet, ha nagyon kis mennyiségű hatóanyagot kell vizsgálni, hiszen az extrakciót követően az oldattérfogat csökkentésével (pl. bepárlás révén) a vizsgálandó anyag koncentrációja megnövelhető.

Tartalmi meghatározás esetén kritikus a kirázás határfoka. Az extrakció teljessé tehető a komponens megoszlási állandójának és ionizációs képességének ismeretében, hiszen kiszámítható, hogy milyen pH értékre kell beállítani a vizes oldat kémhatását, milyen oldószer térfogatokat és hányszori kirázást célszerű alkalmazni.

Ha valamilyen oknál fogva sem a szelektív kioldás, sem a folyadék-folyadék extrakció nem vezet eredményre, akkor célszerű megfelelő *kromatográfiás elválasztást* használni.

Amennyiben az összetett készítmény komponenseinek az *azonosítása* a feladat, úgy mind hatékonyságát, mind variabilitását tekintve a vékonyréteg kromatográfia (VRK) a leginkább alkalmas módszer. Megfelelően validált rendszerekben több lehetőség is nyílik az azonosításra. A kifejlesztést követően egyes esetekben az anyagok retenciós faktorának (R_f) a meghatározása is elegendő lehet az azonosításhoz. Nagyobb biztonságot nyújt azonban, ha megfelelő standardok mellett végezzük a meghatározást, hiszen a kromatográfiás körülmények esetleges változtatása, ami az R_f értékeket befolyásolhatja, nem zavarja az azonosítást. A VRK előnyei között szerepel, egyszerű kivitelezhetősége mellett, a kis anyagigény és hogy egyidejűleg relative nagyszámú minta is vizsgálható. További előnyt jelent, hogy standard anyagok alkalmazása révén félkvantitatív következtetések is levonhatók a meghatározást követően, sőt denzitométer használata esetén az egyes komponensek kvantitatív meghatározására is van lehetőség.

VIII.1.3 **Az egyes gyógyszerformák vizsgálati módszerei**

Az összetett gyógyszerkészítmények vizsgálata kapcsán elsődleges célunk a hatóanyagok kimutatása, illetve mennyiségi meghatározása. Ahhoz, hogy a hatóanyagot szelektíven tudjuk vizsgálni, az esetek nagy részében valamilyen előkészítő műveletet kell végrehajtanunk. Az előkészítés lehetővé teszi, hogy a hatóanyag(ok) szabadabbá váljanak, illetve szükséges lehet a hatóanyagok elválasztása egymástól vagy valamely zavaró segédanyagtól. Az előkészítő műveletek nagymértékben függenek az adott gyógyszerformától is.

Általánosságban elmondható, hogy az összes gyógyszerformánál figyelembe veendő a sajátságok vizsgálata, a töltettömeg, az azonosság vizsgálata, a hatóanyag-tartalom meghatározása, a hatóanyag-tartalom egyenletes eloszlásának vizsgálata, a tisztaság vizsgálata. Az összetétel alapján - bomlékony gyógyszeranyag jelenléte esetén - szükséges a feltételezett bomlástermékekre is vizsgálni.

VIII.1.3.1 Szilárd gyógyszerformák

A szilárd gyógyszerformák - a szerkezetüket tekintve - diszperz és koherens rendszerek lehetnek. A diszperz rendszerek közé tartoznak a porok, hintőporok, a teakeverékek. A koherens rendszerek közé sorolhatók a granulátumok, tabletták, a bevont tabletták és a pilulák is.

Porkeverékek vizsgálata

A porkeverékeket többféle szempont szerint osztályozhatjuk, a kiszerelés módja szerint megkülönböztetünk osztott és osztatlan porokat, a felhasználás helye szerint belsőleges, illetve külsőleges porokat, porkeverékeket (hintőporok). A különbségek a vizsgálatokat alapvetően nem befolyásolják, a minősítés kritériumai azonban különbözőek lehetnek.

Az osztott porok egyedi tömegeiben eltérések mutatkozhatnak, ezért az analízis előtt megállapítjuk az egyes porok egyedi tömegét, kiszámítjuk az átlagtömeget, és az eredményt erre vonatkoztatjuk. Ha a porkeverék teljes hatóanyagtartalmára vagyunk kíváncsiak, akkor egyesítjük és homogenizáljuk a porkeveréket, és az ebből vett mintákat analizáljuk.

A külsőleg használt porkeverékek (hintőporok) vizsgálatánál a minta bemérését nem szükséges 0,01 g pontossággal végezni.

Egyes azonosítási vizsgálatokhoz nincs is szükség előkészítésre, például, ha a porkeverék előírt mennyiségére a megfelelő reagenst cseppentve egyértelmű színreakció történik. Ez csak akkor alkalmazható, ha a többi komponens a reagenssel az adott körülmények között nem reagál. Amennyiben nem áll rendelkezésünkre ilyen egyszerűen elvégezhető reakció, a porkeveréket fel kell oldani. Az oldószer kiválasztásánál szem előtt kell tartani, hogy a meghatározandó komponenst jól, és lehetőség szerint szelektíven oldja, vagyis lehetőleg ne oldódjanak az egyéb komponensek, legalábbis azok nem, amelyek a meghatározást zavarják. Az oldás így egyben elválasztási technika is lehet.

Tabletták vizsgálata

A tabletták elsődlegesen gyári készítmények. A hatóanyag-tartalom vizsgálatát az átlagtömeg megállapításával kell kezdeni, az eredményeket erre vonatkoztatjuk. Az átlagtömeget minimum 10, de kellően nagyszámú minta esetén akár 50 tablettából számolhatjuk ki. Lehetőleg minél nagyobb számú tablettát porítunk el és a kellően

homogenizált mintából történik a bemérés. Alkalmas oldószerben feloldott mintát vizsgálunk. A hatóanyag kinyerésére történő megfelelő eljárást az összetevők tulajdonságai szabják meg. Célszerű a hatóanyag szelektív kioldására törekedni. Sok esetben használható etanol vagy metanol, mert a hatóanyagok nagy része igen, de a tablettázási segédanyagok nagy hányada viszont nem oldódik az oldószerben. Ily módon szűrővel eltávolíthatók a zavaró komponensek. Amennyiben csak valamilyen vizes oldószerrel tudjuk a hatóanyagot oldatba vinni, számolni kell azzal, hogy egyes segédanyagok kisebb-nagyobb mértékben oldódnak.

A *pilula*, mint gyógyszerforma kikerült a FoNo VII.-ből, de elméletileg a tablettákra vonatkozó tudnivalók érvényesek rá.

Drázsék vizsgálata

A drázsék hatóanyagait magába foglaló drázsémagot - ellentétben a tablettákkal - egy külső bevonat veszi körbe. A drázsémag vizsgálata előtt, el kell távolítani a bevonatot, erre a gyakorlatban két módszert alkalmaznak: lehetséges eljárás a drázsébevonat leoldással történő eltávolítása, valamint a bevonat lekaparással (ledörzsöléssel) történő eltávolítása. Az első esetben a leoldás előtt kell a drázsék átlagtömegét meghatározni, a második esetben az egyedi drázsémag tömegekből számítjuk a drázsémag átlagtömegét. Mindkét módszernek lehetnek hibái. Az első esetben gondot okozhat, ha a leoldó folyadék nedvesíti a drázsémagot, és ezt követően nemvizes bázismérést kívánunk végezni, ilyenkor a megkötött víz is fogyasztja a jégecetes perklórsav-mérőoldatot. A második módszer fő hibája, hogy a héj fizikai lekaparása során vagy a drázsémagból is lekaparhatunk, vagy a külső héj eltávolítása nem lesz tökéletes.

VIII.1.3.2 Folyékony gyógyszerkészítmények

A folyékony gyógyszerkészítmények anyagszerkezeti szempontból homogén, kolloid vagy heterogén rendszerek lehetnek. A homogén rendszerekben a hatóanyag (és segédanyagok) a készítmény vivőanyagában molekuláris illetve ionos eloszlásban van jelen (pl. valódi oldatok, szirupok, szemcseppek). A kolloid rendszerek kolloid dimenziójú részecskéket (pl. makromolekulás anyagokat) tartalmaznak. A heterogén rendszerekben a kolloid dimenzióval nagyobb méretű részecskék találhatók a vivőanyagban (pl. emulziók, szuszpenziók).

Oldatok vizsgálata

A gyógyászatban használt oldatokat többféleképpen csoportosíthatjuk, lehetnek külsőleges és belsőleges célra szánt oldatok, sterilizált vagy aszeptikus körülmények között gyártott (szemcseppek, injekciók, infúziók) oldatok. A hatóanyagot oldott állapotban tartalmazzák, üledékmentes, tiszta, homogén rendszerek.

Ha a meghatározás szempontjából nem zavaró az oldószer, mely a legtöbb esetben víz, ritkábban alkohol vagy egy oldószerkelet, a bemérést készíthetjük közvetlenül az oldatból. Híg vizes oldatok esetén térfogatossággal történő bemérést eszközölünk, de ha kisebb sűrűségű alkoholos vagy nagyobb sűrűségű, töményebb vizes oldatokkal dolgozunk, akkor a bemérés tömegre történik.

Amennyiben az oldószer zavarja a meghatározáshoz alkalmazott módszert, akkor a mintát óvatosan, vízfürdőn szárazra párolhatjuk, és a száraz maradékkal folytatjuk a meghatározást. Ha a szárazra párolás során az anyag bomlást szenvedne, a meghatározandó komponenst más oldószerbe rázzuk ki, és közvetlenül abból végezzük a meghatározást. Színes oldatok esetén szintén szükség lehet a vizsgált anyag

elválasztására, illetve tartalmi meghatározásnál olyan végpontjelző módszert kell választani, ahol nem zavar az oldat színe (pl. elektroanalitikai módszerek). Illékony oldószerek esetén nagy figyelemmel kell eljárni, kerülni kell annak lehetőségét, hogy a bemérés során az oldószert párologása miatt hiba jelentkezzen.

Injekciós oldatok bemérésénél figyelembe kell venni, hogy térfogatuk kb. 10-20%-kal nagyobb a feltüntetetténél. A szemcseppek vizsgálatára a belsőleges oldatokra hasonlóak vonatkoznak, egyéb külsőleg használt oldatok esetén a minta bemérését nem szükséges 0,1 mg pontossággal megtenni.

Szuszpenziók, emulziók vizsgálata

Szuszpenziók esetén a nem oldódó szilárd hatóanyag a folyékony diszperziós fázisban valamilyen stabilizáló anyaggal van eloszlatva, így egyenletes eloszlásban lebeg benne. Az emulzióknál a hatóanyag oldott formában van, egymással nem elegyedő fázisokból álló folyékony készítmény, amelyben az egyik fázis a másikban tartósan diszpergált. Inhomogén gyógyszerformákról van szó, a mintavételezést megnehezíti, hogy a hatóanyagok sok esetben leülepednek, ezért nem homogén az eloszlásuk. A bemérést megelőzően gondoskodni kell a minta homogenizálásáról, amit egy alapos összerázással megtehetünk. A mintát csakis tömegre mérhetjük be.

A segédanyagok zavaró hatásával általában nem kell számolni, mert a leggyakrabban használt emulgeáló szerek kémiaiilag indifferens anyagok. A ritkábban alkalmazott felületaktív anyagok azonban zavarhatják a meghatározást.

VIII.1.3.3 Félszilárd gyógyszerkészítmények vizsgálata

A félszilárd gyógyszerkészítmények - anyagszerkezeti szempontból - koherens (összefüggő szerkezetű) rendszerek. A koherens szerkezet lényegét egy összefüggő váz alkotja, amely bezárja és megköti a rendszerint nagyobb mennyiségű folyadékot vagy folyadék elegyet. A heterogén koherens rendszerek csoportjába sorolhatjuk a kenőcsöket, krémeket, valamint a kúpokat, és a kolloid koherens rendszerek közé tartoznak a gélek.

Kenőcsök, krémek vizsgálata

A krémek főként hidrophil vivőanyagban hordozzák a hatóanyagot, tehát általában nagy víztartalmú, lágy konzisztenciájú rendszerek. A kenőcsök lipofil vivőanyag alapúak, a hatóanyagot oldott, emulgeált vagy szuszpendált állapotban tartalmazzák.

A vizsgáló módszer kiválasztásakor figyelembe kell venni a hatóanyag jellegét is. A hatóanyagot általában nem lehet közvetlenül vizsgálni, szükség van előkészítő műveletekre, amikor felszabadítjuk, elválasztjuk a hatóanyagot. Gyakran alkalmazzák a kenőcsalapanyag "kifagyasztás"-án alapuló módszert. A készítmény vízfürdön történő megolvasztása valamilyen kivonószer jelenlétében történik, majd ezt követően az elegyet lehűtve a vivőanyagot kifagyasztjuk. A megdermedt vivőanyag mellől a kivonó folyadék, amely már a hatóanyagot is tartalmazza, dekantálható vagy szűrhető. Jobb kivonás érhető el szilárd paraffin használatával, mert a megolvasztott kenőcsalapanyag hűtéskor gyorsabban szilárdul meg, és így csökken a zárványképződés veszélye. A műveletek többszöri megismétlése tökéletes elválasztást eredményez. A vizsgáló módszer validálásakor tehát az egyik legfontosabb kérdés a teljes kivonás körülményeinek a tisztázása.

Kúpok vizsgálata

A kúpok a vonatkozó testüregben (végbél, hüvely), testhőmérsékleten megolvadó vagy testnedvekben feloldódó gyógyszerkészítmények.

A kúpok vizsgálatát megelőzi az átlagtömeg megállapítása. A kúpok esetén a hatóanyag homogén eloszlása a gyakorlatban kérdéses. A kútból történő mintavétel esetén nem a kúp hegyéből vagy végéből kell mintát venni, hanem hosszában kell a kúpot elvágni a mintavételezéshez, de jobb megoldás, ha az egész kúpot, vagy több kúpot aprítunk fel a bemérés előtt.

A hatóanyag meghatározásnál, ha a kúpalapanyag nem zavarja azt, alkalmazható a hatóanyag és alapanyag együttes feloldása valamilyen apoláris oldószerben (pl. kloroform). Gyakori megoldás, hogy a minta oldásához oldószerkeletet használunk (pl. kloroform - petroléter), amelynek egyik komponense a hatóanyagot, másik komponense az alapanyagot oldja. Majd a hatóanyagot egy megfelelő pH-jú vizes oldószerbe átrázhatjuk. A kioldást kifagyasztással is lehet kombinálni. A vízfürdön történő megolvasztás és az alkalmas kivonó folyadékkal történő hatóanyag kivonás után, a kúpalapanyagot kifagyasztjuk.

VIII.1.4 Az elvárható eredményekkel szemben támasztott követelmények

Az összetett gyógyszerkészítmények vizsgálatánál az egyes komponensek meghatározásánál kapott eredményekkel szemben nem támaszthatók olyan igények, mint az alapanyag vizsgálatoknál. Míg a kémiai anyagok vizsgálata során a deklarált hatóanyag tartalomnak $\pm 1-1,5\%$ lehet az eltérése, úgy összetett készítmények esetén, a körülményektől függően, ez $\pm 2-10\%$ között lehetséges.

Az enyhébb követelményeket egyrészt a segédanyagok, másrészt a társhatóanyagok esetleges zavaró hatása indokolja. A pontossággal szemben támasztott követelményeket szükségszerűen befolyásolhatják: a hatóanyag abszolút mennyisége, a ható- és segédanyagok mennyiségi arányai, az alkalmazott segédanyagok és társhatóanyagok tulajdonságai, az előkészítő eljárások és az alkalmazott vizsgálati módszerek.

A deklarált értéktől való eltérést növelheti az is, hogy a gyógyszerkészítésnél az egyes komponensek lemérése nem analitikai pontossággal történik, és ezt a pontatlanságot az analízis során továbbvisszük. Az osztott gyógyszerformáknál (pl. tabletták, draszták stb.) az elosztásból eredő egyedi súlyok szórását úgy küszöbölhetjük ki, hogy a mérési eredményeket az átlagtömegre vonatkoztatjuk. A hatóanyag esetleges inhomogén eloszlásából adódó eltéréseket (pl. kúpok, kenőcsök stb.) az átlagtömegre történő vonatkoztatás sem küszöböli ki.

A meghatározást előkészítő műveletek közül a hatóanyag kioldódásának hatékonysága is nagyban befolyásolja az elvárható pontosságot. Amennyiben megfelelően szelektív reakció nem áll rendelkezésre, a meghatározandó komponenst el kell választani, ami a meghatározás pontosságával szembeni követelményeket csökkenti.

A magisztrális gyógyszerkészítmények vizsgálata és minősítése független az előállítás helyétől, az igény jellegétől (vényre vagy vénynélkül), de a minősítést befolyásolja az elkészített gyógyszer mennyisége. A számszerű eredmény célszerűen megbízhatósági intervallummal (lásd. Ph.Hg.VIII./I.570./6.2.3.) fejezendő ki és magisztrális készítményeknél ajánlott a $P = 0,90$ megbízhatósági szint használata. Az átlagérték

kerekítése a \pm határokkal jelzett megbízhatósági intervallum első két értékes jegyéig történjen.

A magisztrális gyógyszerkészítmény minősítése a gyógyszerkönyvi cikkelyek, OGYI-A-minőségi előírások, illetve az OGYI-P-25-2010 irányelv követelményei szerint történik.

VIII.2 Azonosítási reakciók

Összetett készítmények komponenseinek azonosítását egyrészt megkönnyíti, hogy a készítmény deklarált összetételű, ezért az adott komponensek azonosítási reakcióit elvégezve egyértelműen eldönthető, hogy adott komponens tartalmazza-e a készítmény vagy nem. Másrészt, mivel összetett készítményről van szó, és több komponens is jelen van egymás mellett, különböző arányokban, így nem biztos, hogy az alapanyagoknál alkalmazott gyógyszerkönyvi azonosítási reakciók minden esetben, változtatás nélkül használhatók.

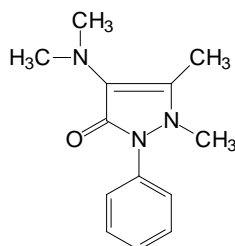
A feladat tehát a gyógyszerkészítmény meghatározott összetétele szerinti komponensek jelenlétének megbízható, kétséget kizáró bizonyítása. Ugyanakkor nem feladat egyéb komponensek keresése, azonosítása, hiszen a készítmény nem tartalmazhat egyéb komponenseket.

VIII.2.1 Klasszikus kémiai azonosítási reakciók

A kémiai azonosításkor elsődleges cél az aktuális gyógyszerkönyv (Ph.Hg.VIII.) azonossági reakciói közül kiválasztani egyet vagy akár többet, amivel változtatás nélkül azonosítható a vizsgált komponens, tehát a reakció megfelelően szelektív és specifikus, vagy a zavaró komponensektől egyszerű elválasztással meg lehet szabadulni. A jelenleg érvényben levő gyógyszerkönyvben azonban az egyszerűen elvégezhető "kémcsőreakciók" csak másodlagos szereppel bírnak az egyéb, főként a vegyület fizikai-kémiai tulajdonságait és szerkezetét vizsgáló módszerek (olvadáspont mérés, UV-VIS-, IR-spektroszkópiai módszerek) mellett. Amennyiben a Ph.Hg.VIII. előiratai között nincs alkalmas módszer az adott komponens azonosítására, úgy a Ph.Hg.VII. által alkalmazott reakciók közül célszerű választani, esetleg a vizsgált vegyület kémiai szerkezetét ismerve egyéb, rá specifikus módszert alkalmazni.

A ma forgalomban levő összetett készítményekben leggyakrabban előforduló hatóanyagok azonosítása "hagyományos" kémiai reakciókkal az alábbiak szerint történhet:

Aminofenazon



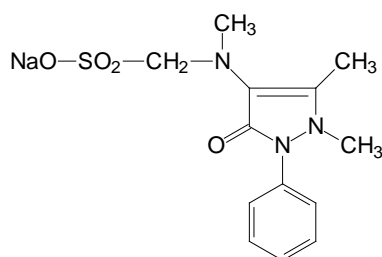
Az aminofenazon a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben már nem hivatalos vegyület, és a FoNo-s készítményekben is nagyrészt lecserélték más hatóanyagokra, azonban régebbi

FoNo-s és néhány gyári készítményben, valamint főleg egyedi összetételű magisztrális készítményekben még megtalálható.

Az aminofenazon kimutatása könnyű oxidálhatóságán alapszik. Különböző oxidálószer hatására (vas(III)-ionok, ezüst-ionok, hidrogén-peroxid, salétromsav stb.) színes gyökkation keletkezik belőle. A társhatóanyagok jelenléte határozza meg a megfelelő oxidálószer kiválasztását. Amennyiben a jelenlevő más komponens fenolos-OH csoportot tartalmaz, nem használható vas(III)-klorid oxidálószerként, a színes komplex képződése miatt. Halogenid-ionok jelenlétében az ezüst-nitrát, mint oxidálószer használata kerülendő, a csapadékképződés miatt. Ha paracetamol tartalmaz a készítmény, akkor a salétromsav nem alkalmas.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Supp. antipyreticum pro infante*, *Supp. antipyreticum pro parvulo*.

Metamizol

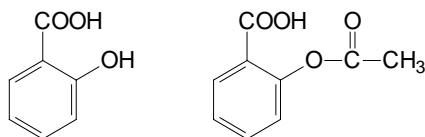


A metamizol kimutatása egyrészt könnyű oxidálhatósága alapján történhet. Az aminofenazonhoz hasonlóan, vizes oldatában enyhe oxidálószer hatására színes termékek képződnek.

Másrészt a metamizol hidrolízise során (például savas oldatát forralva) keletkező kén-dioxid és formaldehid mutatható ki. Előbbi kimutatása jódátos-keményítő szűrőpapír csíkkal történhet, hiszen a kén-dioxid a jódátot jóddá redukálja. A hidrolízis során keletkező formaldehid pedig aril-metán festékképzésen alapuló reakció alkalmazásával, például kromotrópsavas reakcióval, mutatható ki könnyen.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Pulv. analgeticus*, *Pulv. antimigrainicus*, *Pulv. asthmalyticus*, *Pulv. combinatus*, *Sol. noraminophenazoni pro parvulo*, *Supp. analgeticum*, *Supp. analgeticum forte*, *Supp. noraminophenazoni*, *Supp. spasmolyticum*.

Szalicilsav, acetilszalicilsav



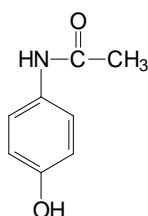
A szalicilsav, mint fenolos-OH csoportot tartalmazó vegyület vas(III)-ionokkal ibolyaszínű komplexet képez. Az acetilszalicilsav közvetlenül nem, csak hidrolízist követően ad pozitív reakciót. Ez a különbség alkalmas a két anyag megkülönböztetésére is. Az acetilszalicilsav hidrolízisét általában lúggal célszerű elvégezni, mert az enyhén lúgos közeg a komplexképződési reakciónak is kedvez.

A komplexképződési reakció általában jól használható szalicilsav és acetilszalicilsav azonosítására, azonban néhány esetben, amikor a társhatóanyag szintén

fenolos-OH csoportot tartalmazó vegyület, más megoldást kell keresni. Például a *Pulvis antidoloricus* készítmény esetén a paracetamol, mint szintén fenolos-OH csoportot tartalmazó vegyület hiúsítja meg a reakció használhatóságát. A *Spiritus salicylatus cum resorcino* készítmény rezorcint tartalmaz, ami szintén komplexet képez vas(III)-ionokkal, valamint oldékonyságukban sincs akkora különbség, ami elválasztásukat lehetővé tenné. Ezek alapján ennél a két készítménynél a vékonyréteg-kromatográfia a leginkább használható eljárás a komponensek egymás melletti azonosítására.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Collod. cum acido salicylico*, *Crem. erythromycini*, *Past. antirheumatica*, *Pulv. antidoloricus*, *Pulv. chinacisalis cum vitamino C*, *Pulv. cholagogus*, *Pulv. codacisali*, *Pulv. coffacyli cum codeino*, *Pulv. combinatus*, *Pulv. spasmalgeticus*, *Spars. antimycoticum*, *Spars. antisudoricum*, *Spir. capsici*, *Spir. iodosalicylatus*, *Spir. salicylatus*, *Spir. saliylatus cum resorcino*, *Ung. ad vulnera*, *Ung. dithranoli*, *Ung. salicylatum*, *Ung. sulfuratum et salicylatum*, *Ung. triplex*.

Paracetamol

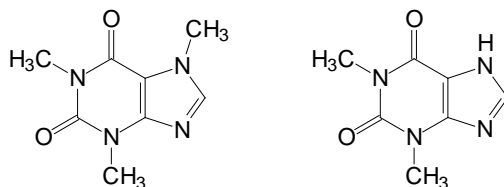


Amennyiben a paracetamol az egyedüli hatóanyag a készítményben, úgy gyógyszerkönyvi reakciója (savas hidrolízist követő oxidáció dikromáttal) alkalmas azonosítására.

A paracetamol szabad fenolos-OH csoportot tartalmaz, így vas(III)-ionokkal kék színű komplexet képez. Amikor más komplexképző vegyület is jelen van, más megoldást kell keresni, például a 25%-os salétromsavval történő lecsepegtetést. A szerkezetileg nagyon hasonló fenacetin azonosítási reakcióját a paracetamol is adja, a reakció során lassan barnás-sárga színeződés alakul ki.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Pulv. antidoloricus*, *Pulv. paracetamoli cum codeino*, *Pulv. spasmalgeticus*, *Supp. antimigrainicum*, *Supp. paracetamoli*.

Koffein, teofillin



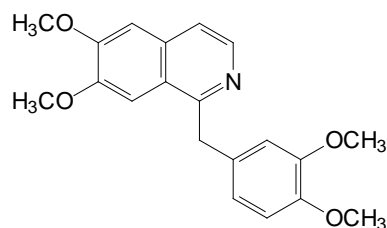
A xantin-vázis vegyületek csoportreakciója, a *murexid*-reakció általában alkalmazható koffein és teofillin azonosításra. A problémát az okozhatja, hogy több készítmény, a koffeinnél vagy teofillinnél egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben tartalmaz más hatóanyagot, például acetilszalicilsavat, paracetamolt vagy metamizolt. A *murexid*-reakció reagensei, például a hidrogén-peroxid ezekkel az anyagokkal is reakcióba lép, amelyek így gyakorlatilag "elfogyasztják", és nem lesz elegendő

mennyiségben jelen a xantin-váz oxidálásához. Megoldást nyújt, ha a meghatározandó koffeint/teofillint előbb kloroformmal kivonjuk a készítményből, majd a kloroform elpárologtatása után végezzük el a murexid-reakciót.

A teofillin azonosítása a gyógyszerkönyvi reakciója (teofillidin reakció) segítségével is történhet.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Pulv. analgeticus*, *Pulv. antidoloricus*, *Pulv. antimigrainicus*, *Pulv. asthmalyticus*, *Pulv. coffacyli cum codeino*, *Pulv. coffeini*, *Pulv. combinatus*, *Pulv. theophyllini compositus*, *Sol. theophyllini*, *Supp. analgeticum*, *Supp. antiemeticum*, *Supp. antimigrainicum*, *Supp. theophyllini*, *Supp. theophyllini compositum*.

Papaverin

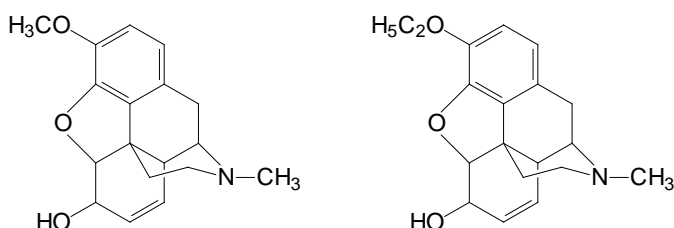


A papaverin azonosítására rendszerint használt *Koralin*-reakció a *Pulv. cholagogus* kivételével jól alkalmazható összetett készítmények esetén is. Az ecetsav-anhidriddel történő melegítést követően, az elegyhez cseppentett tömény kénsav hatására kialakuló sárgás-zöld fluoreszcencia a papaverin szelektív és érzékeny reakciója.

A *Pulv. cholagogus* a papaverin mellett dehidrokólsavat is tartalmaz, amely mint szteránváz vegyület, a fenti közegben szintén fluoreszcenciát mutat, ami zavarja a papaverin kimutatását. A két vegyületet egymástól el kell választani a meghatározás megelőzően.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Pulv. antimigrainicus*, *Pulv. antispasmodoloricus*, *Pulv. asthmalyticus*, *Pulv. cholagogus*, *Pulv. spasmalgeticus*, *Supp. papaverini pro parvulo*, *Supp. spasmolyticum*, *Supp. theophyllini compositum*.

Kodein, etilmorfin



A morfinánváz vegyületek csoportreakciói közül elsődlegesen a *Marquis*-reakciót (formaldehid, tömény kénsav) célszerű megpróbálni. Az esetlegesen jelen levő metamizol és a koffein egyáltalán nem, a paracetamol pedig lassan reagálnak, így lényegében nem zavarhatnak.

A *Calmborg-Husemann*-reakcióban (tömény kénsav, vas(III)-klorid, majd salétromsav) alkalmazott vas(III)-ionok zavarhatják a meghatározást amennyiben a készítmény fenolos hidroxil-csoporttal bíró vegyületet (szalicilsav, paracetamol) is

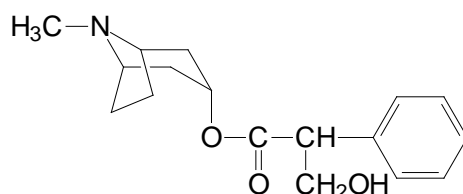
tartalmaz, hiszen ibolyaszínű színű komplexet képeznek. Ha a készítmény aminofenazont, vagy metamizolt tartalmaz társhatóanyagként, akkor a vas(III)-ionok, mint oxidálószer, elreagálnak az említett vegyületekkel és színes termékek képződnek.

Az etilmorfin esetében lehetőség van az etoxi-csoport kimutatására is abban az esetben, ha a készítmény nem tartalmaz egyéb olyan összetevőt, amelyből az adott reakcióban acetaldehid szabadul fel. Az etoxi-csoportból képződő acetaldehid, egy vizet tartalmazó kémcsőbe való átdestillálást követően, nitroprusszid-nátrium, valamint morfolin hozzáadását követően kék színeződést ad.

Az említett reakciókat kiegészítendő, lehetőséget jelent az anionok azonosítása is. A FoNo-s készítményekben az etilmorfin klorid-sóként, a kodein pedig foszfát-sóként van jelen.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Gutta aethylmorphini*, *Oculent. dionini*, *Pulv. antidoloricus*, *Pulv. codacisali*, *Pulv. coffacyli cum codeino*, *Pulv. paracetamoli cum codeino*, *Pulv. theophyllini comp.*, *Supp. analgeticum forte*.

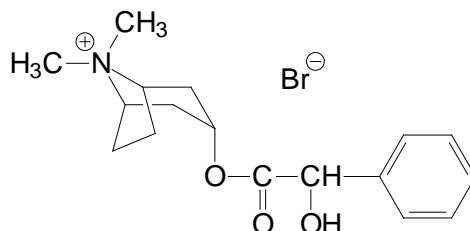
Atropin



Az atropin dózisa az összetett készítményekben - erős hatása miatt - nagyon kicsi. Az *Oculogutta atropini* kivételével (amely készítésénél közvetlenül atropin-szulfátot mérünk be) az összetett készítmények előállításakor szárított belladonna-kivonatot (*Extractum belladonnae siccum*) ír elő a FoNo. Az atropin kimutatására alkalmas *Vitali*-reakció nem elég érzékeny ahhoz, hogy az atropin közvetlenül a készítményből kimutatható legyen, így előzetes elválasztása (például lúgos kirázása kloroformba) és az extraktum töményítése (bepárlása) szükséges.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Oculogutt. atropini*, *Pulv. antispasmodoloricus*, *Pulv. purgativus cum belladonna*, *Supp. spasmolyticum*, *Supp. antiemeticum*, *Supp. contra nodum*.

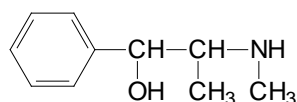
Homatropin-metilbromid



A homatropin-metilbromid mint kvaterner ammónium-vegyület lúgos közegben tetrafenil-boráttal csapadékot képez. A reakciót az esetleg jelen levő kálium-ionok és más kvaterner ammónium-vegyületek zavarhatják. Az azonossági reakció kiegészíthető a bromid-ion azonosításával is.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Pulv. cholagogus*, *Pulv. spasmalgeticus*.

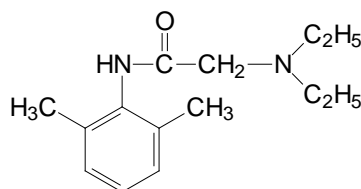
Efedrin



Az efedrint a készítmények, a többi alkotórészhez képest kis mennyiségben tartalmazzák. A *Chen-Kao*-reakció (réz(II)-ionokkal, lúgos közegben ibolyaszínű komplexképződés) kisebb megszorításokkal (a komplex a jelenlevő segédanyagok nagy mennyisége miatt nem rázható át szerves oldószerbe) alkalmazható efedrin kimutatására. Ugyanakkor az efedrin, mint szekunder amin, ninhidrinnel is pozitív reakciót ad, ami szintén lehetőséget nyújt az azonosítására.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Gutt. expectorans composita*, *Mixt. pectoralis*, *Nasogutt. ephedrini*, *Supp. ad nodum*, *Supp. haemorrhoidale*, *Ung. haemorrhoidale*.

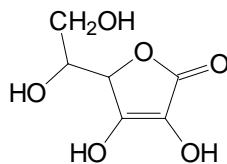
Lidokain



A lidokain azonosítása - könnyen kimutatható funkciós csoportok hiányában - igen nehézkes, még alapanyagként is. Azonosítása összetett gyógyszerkészítményben szinte kizárólag vékonyréteg-kromatográfiai technika alkalmazása révén tud megvalósulni.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Hydrogel. anaestheticum*, *Mucil. ad catheterem*, *Sol. gingivalis*, *Sol. metronidazoli*, *Supp. haemorrhoidale*, *Ung. anaestheticum*, *Ung. contra oxyurim*, *Ung. haemorrhoidale*, *Ung. lidocaini ad rhagades*

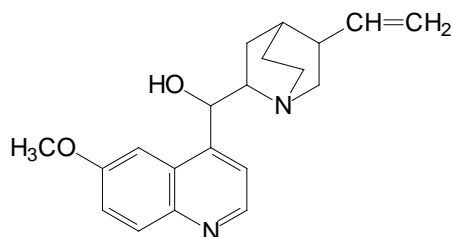
Aszkorbinsav



Az aszkorbinsav azonosítására jól használható az endiol szerkezetnek köszönhető komplexképződési reakció vas(II)-ionokkal. Ez az azonosítási reakció szalicilsav jelenlétében és elvégezhető.

Az aszkorbinsav könnyű oxidálhatósága révén is azonosítható, az alkalmas oxidálószerrel a jelen levő társhatóanyagok határozzák meg. Amennyiben halogenid-ionok is jelen vannak, nem alkalmazható ezüst-nitrát oxidálószerként. Ha a társhatóanyagok alkaloidok, akkor a jód-oldat nem megfelelő reagens.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmények: *Emuls. olei jecoris composita*, *Puly. chinacisalis cum vitamino C*

Kinin

A kinin legegyszerűbb kimutatási reakciója, hogy kénsavas közegben kék fluoreszcenciát mutat, amely sósav hatására megszűnik. A reakció szelektív és érzékeny.

A FoNo VII.-ben előforduló készítmény: *Pulv. chinacisalis cum vitamino C*

VIII.2.2 Azonosítás kromatográfiás elválasztás révén

Amennyiben egy összetett gyógyszerkészítmény komponenseinek az azonosítása klasszikus, egyszerű kémcsőreakciók elvégzésével nem valósulhat meg, mert az összetevők zavarják egymás kimutatását, és a komponensek egymástól való elválasztása is nehézkes, érdemes vékonyréteg-kromatográfiás módszerekhez nyúlni.

Egy alkalmas, validált rendszer felállításához több szempontot is figyelembe kell venni. Fontos, hogy a vizsgált készítmény összes hatóanyaga megbízhatóan elváljon egymástól, és a kromatogram minden foltja azonosítható legyen, akár standard anyagok futtatása révén, akár egy alkalmas adatbázis alapján.

Az összetett készítmények vékonyréteg-kromatográfiával történő azonosítására elsősorban adszorpciós, vagyis normál-fázisú kromatográfiás rendszereket dolgoztak ki. A futtató elegy összetételét elsősorban a szétválasztandó komponensek sav-bázis tulajdonságai szabják meg. Amennyiben a meghatározandó alkotórészek nagyobb hányada bázikus karakterű vegyület, úgy célszerű, hogy a mozgó fázis valamilyen bázikus komponenst (pl. ammónia) is tartalmazzon. Ez a bázikus összetevő visszاسzorítja a vizsgált bázisok protonálódását, és a bázikus komponensek polaritásuknak megfelelően vándorolnak. A savas karakterű anyagok ebben a rendszerben (hiszen főként töltéssel rendelkező részecskéként vannak jelen) nem, vagy csak nagyon kis mértékben vándorolnak. Ha a vizsgált összetett készítmény túlnyomórészt savas karakterű anyagokat tartalmaz, akkor érdemes olyan futtató elegyet készíteni, amelynek savas összetevője (pl. ecetsav, hangyasav) is van. A savas karakterű komponensek disszociációja így visszاسzorul, és töltés nélküli részecskéként vándorolnak a lemezen, míg a bázikus vegyületek a felcseppentés helyén maradnak, hiszen töltéssel rendelkező (protonált) formába kerülnek.

Horváth P. és munkatársai három kromatográfiás rendszert dolgoztak ki, amellyel a FoNo VII.-ben megtalálható készítmények hatóanyagai gyakorlatilag mind elkülöníthetők egymástól (*Acta Pharmaceutica Hungarica* 76. 173-180. 2006)

VIII.3 Tartalmi meghatározások

Egy összetett gyógyszerkészítmény komponenseinek tartalmi meghatározásakor - hasonlóan az azonossági vizsgálatokhoz - számításba kell venni az adott gyógyszerforma sajátosságait, a meghatározni kívánt hatóanyag kémiai tulajdonságait, mennyiségi arányait a többi komponenshez viszonyítva, valamint a jelen levő egyéb hatóanyagokat és segédanyagokat. A megfelelő módszer kiválasztásának legfőbb követelménye, hogy az eljárás *szelektív*, *specifikus* és megfelelően *érzékeny* legyen. Amennyiben a készítmény több hatóanyagot is tartalmaz, akkor a hasonló karakterű anyagokat (például kettő bázikus tulajdonságú vegyületet) szelektíven mérni tudjuk az egyéb komponensek mellett (például egy savas karakterű anyag mellett), ugyanakkor szükség van specifikus meghatározási módszerre is, amellyel a hasonló karakterű anyagok közül legalább egy "külön" is mérhető. (A későbbiekben erre több példát is láthatunk.)

Szintén fontos, hogy a választott eljárás megfelelően érzékeny is legyen, hiszen az összetett készítményeknél igen gyakran előfordul, hogy a hatóanyag egy vagy akár több nagyságrenddel is kisebb mennyiségben van jelen, mint más hatóanyagok vagy segédanyagok. A meghatározni kívánt komponens teljes mennyiségében kell megmérni. Egyszerűbb esetben nem zavarnak más összetevők és közvetlenül, elválasztás nélkül mérhető az adott anyag. Sok esetben azonban el kell választani a komponens a többi összetevőtől. A módszer kidolgozásakor, illetve validálásakor bizonyítani kell, hogy az elválasztást követően teljes, vagyis kvantitatív az anyag visszanyerése.

VIII.3.1 Bázisok meghatározása

A gyógyszerkészítmények hatóanyagainak igen nagy hányada bázikus karakterű. A bázicitást elsősorban valamely amincsoport képviseli, illetve bázisként viselkednek a gyenge savak sói is. A nitrogén tartalmú bázisok meghatározási lehetőségeit tulajdonképpen két szempont határozza meg. A legfontosabb a bázis erőssége, ami igen tág határok között változhat (pK_S 2-13) és alapvetően a kémiai környezet határozza meg. A másik alapvető szempont a molekula vízdékonysága.

VIII.3.1.1 Meghatározás acidimetriás módszerrel

A gyógyszerként használt bázikus vegyületek zömében pK_S 4-9 értékkel rendelkeznek, vannak azonban ennél is gyengébb bázisok (pl. xantinszármazékok $pK_S \approx 14$). Ezek a vegyületek vizes közegben acidimetriával nem mérhetők.

Korábban indirekt módon - savfelesleg alkalmazásával - határozták meg vizes közegben a bázikus vegyületeket:

Klasszikus alkaloid meghatározás

A módszer lényege, hogy a szervesetlen lúggal (NaOH, NH_3 , Na_2CO_3) felszabadított alkaloidbázist szerves oldószerbe rázzuk ki, az oldószer elpárologtatása után ismert mennyiségű savat adunk a mintához, majd a savfelesleget lúg mérőoldattal visszamérjük. Ezt a meghatározást pl. a morfin-vázis alkaloidok köréből kodein, etilmorfin mérésére használhatjuk (pK_S 8-10).

Kiszorításos módszer

A kiszorításos módszer például papaverin sósavas sójának meghatározására alkalmas. Nátrium-hidroxid mérőoldattal titráljuk a papaverinsó sósav komponensét, és a titrálás során felszabaduló bázist ($pK_s = 5,9$) kloroformba rázzuk át, így az nem zavarja a sósav semlegesítését. A módszer a papaverinnél erősebb bázisok meghatározására nem alkalmas.

Nemvizes közegű bázismeghatározás

A gyógyszeranalitikában manapság az előbbi eljárásokat teljes mértékben kiszorítja a **nemvizes közegű bázismeghatározás**. Ezt indokolja egyrészt a vegyületek rossz vízdékonysága, másfelől a gyenge bázicitás. A megfelelő oldószer megválasztása esetén, valamennyi, gyógyszereink között szereplő szerves bázis meghatározható.

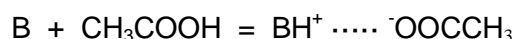
A használt oldószer - az oldott anyaggal kialakuló kölcsönhatás alapján - az alábbi csoportokba sorolható:

Közömbös oldószer: (pl. benzol, hexán, ciklohexán, kloroform, széntetraklorid stb.) a bennük oldott vegyületekkel lényeges kölcsönhatásba nem lépnek, azok báziserősségét nem befolyásolják. Az oldószer nem vesz részt a semlegesítési folyamatban.

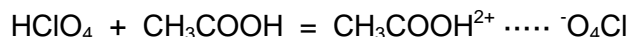
Differenciáló oldószer: (pl. acetone, etil-metil-ke-ton, acetonitril, nitrobenzol stb.) a bennük oldott vegyületek báziserőssége differenciálódik, vagyis a vízben egymáshoz közel eső pK -értékek az illető oldószerben jelentősen eltérnek. Oka az oldott anyag és oldószer specifikus kölcsönhatása.

Nivelláló oldószer: a savas karakterű oldószer (pl. ecetsav, ecetsavanhidrid, hangyasav stb.) a bennük oldott gyenge bázisok erősségét fokozzák, és egyben csökkentik az erősségük közötti különbségeket is.

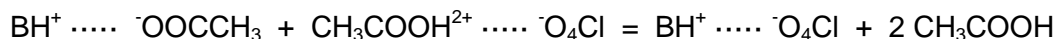
Gyenge bázisok nemvizes közegű kvantitatív mérésénél elsősorban nivelálló oldószer (pl. ecetsavat) használunk, hiszen szükséges lehet a bázicitás felerősítése. A savas oldószer protondonorok, jégecetes közegben a képződött acetát-ion a legerősebb bázis, emiatt a bennük oldott savak erőssége csökken, ugyanakkor a bázisok erőssége nő.



Mérőoldatként főként *perklórsavat* használunk, mert nemvizes közegben is csaknem teljes mértékben disszociálódó erős sav. Legtöbbször jégecetes oldatát alkalmazzuk. Magában a mérőoldatban is végbemegy egy protonátadási folyamat. A perklórsav olyan erős sav, hogy át tudja adni savi hidrogénjét az ecetsav molekulának.



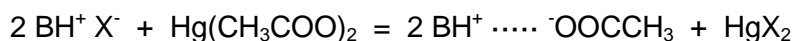
Összességében tehát az oldószer közvetítésével a szerves bázis folyamatosan és pillanatszerűen átveszi a sav mérőoldat protonját.



Végpontjelzésre a vizes közegben is használatos indikátorok alkalmasak, figyelembe kell azonban venni, hogy színátcsapásuk eltérhet a vizes közegben észlelt átcsapástól.

A legtöbb esetben nem a szabad bázis van a készítményben, hanem valamilyen haloid savval képezett sója. Ilyen esetekben a jégecetes közegű meghatározásokat a savkomponens zavarja, annak ellenére, hogy a vizes közegű savi erősség csökken,

hiszen a savakkal szemben az ecetsav differenciáló oldószerként viselkedik. A zavaró hatás kiküszöbölésére megoldás lehet, hogy a bázist lúgos közegben - valamilyen szerves lúg segítségével - felszabadítjuk sójából és kirázással valamilyen apoláris, vízzel nem elegyedő oldószerbe (pl. kloroformba) extraháljuk. Szintén megoldást jelent, ha a só oldatához higany(II)-acetát oldatot adunk, ebben az esetben bázis-acetát és rosszul disszociáló higanyhaloid keletkezik. A protonált bázis-acetát analóg a fenti egyenletben keletkező bázis-acetáttal.



A higany(II)-acetát helyett ecetsavanhidridet is alkalmazhatunk, ilyenkor ecetsav és savklorid képződik. Előnye, hogy kevésbé környezetkárosító, mint a higany vegyületek, másrészt könnyen oxidálható hatóanyagok, esetében is használható, nem úgy, mint a gyenge oxidálószer szerepet is betöltő higany(II)-acetát.

Közvetlenül titrálhatók a kénsavas ammóniumsók, mert jégecetben a kénsav csak egyértékű sav. Például atropin-szulfát esetén az egyik amin-N mérhető. Egyenértékű tömeg a molekulatömeggel megegyezik.

A gyógyszerek között szerepelnek olyan gyenge bázisok, amelyek pK_s értéke kisebb, mint 1 (pl. koffein), ilyenkor a jégecet nem elég erős sav ahhoz, hogy protonálja a bázist. Ez esetben ecetsav-anhidridet lehet alkalmazni a molekula bázicitásának felerősítésére és a proton átadás közvetítésére.

VIII.3.1.2 Bázisok meghatározása gyógyszerkeverékekben

Bázis meghatározása semleges anyag mellett

A legtöbb esetben a bázikus komponens, a megfelelő oldószerrel való oldást követően, közvetlenül meghatározható. Egyes gyógyszerformák a hatóanyag mellett nagy mennyiségű segédanyagot tartalmaznak, amelyek többsége közömbös, nem zavarja a meghatározást, de bizonyos esetekben megnöveli az ionerősséget, befolyásolja a disszociációs folyamatokat.

Problémát okozhat, hogy a semleges anyag nem oldódik és az indikátor színváltozását a zavarosság miatt nem észleljük. Ez a hibaforrás, szűréssel kiküszöbölhető. Egyes segédanyagok nedvszívó képessége is okozhat túlfogyást, mivel nemvizes közegű titrálásoknál a víz bázisként viselkedik. A víz zavaró hatását kiizzított nátrium-szulfáttal fedett vattapamaton keresztül történő szűréssel lehet kiküszöbölni.

Bázis meghatározása savas karakterű vegyület mellett

Az amino csoportot tartalmazó bázikus gyógyszervegyületek vízben általában rosszul oldódnak, ezért gyógyszerészeti gyakorlatban többnyire szerves vagy szerves savakkal (tartarátok, maleinátok, szalicilátok) képzett sóikat használják. Gyenge szerves savak sávsűrűsége a bázisok mérésére használt oldószerben annyira lecsökken, hogy a meghatározás szempontjából semleges anyagoknak számítanak. (Lásd előbb.) Hasonlóképpen mérhetők a bázisok pl. acetilszalicilsav, barbitúrsavszármazékok mellett. Haloid savak esetében az előző pontban említett megoldások alkalmazhatók.

Szabad bázis és bázis sójának meghatározása egymás mellett

A fentiekben említett, haloid sók meghatározására alkalmas módszer felhasználható keverékekben, a szabadon és só formában jelen levő bázisok egymás melletti meghatározására. Például aminofenazont és papaverin-kloridot tartalmazó készítmény

két komponense egy bemérésből meghatározható. Az oldószer és indikátor megválasztása nagy körütekintést igényel. Ilyenkor először a szabad bázist titráljuk meg, majd az oldathoz higany(II)-acetátot adva titrálhatóvá válik a másik bázissal ekvivalens mennyiségű, szabaddá váló acetát.

Szintén megoldást jelent, ha két bemérésből végzünk meghatározást. Például lidokaint és efedrin-kloridot tartalmazó készítményben a lidokain kloroformban jól oldódik, az efedrin-klorid viszont nem. A kloroformos oldatot megsűrve, a só a szűrőn marad, a kloroformos oldatból a lidokain szelektíven titrálható. Egy másik bemérésből vizes-lúgos közegű extrakciót kell végezni, így sójából felszabadul a bázis, és a két szabad bázis átoldódik a kloroformos fázisba, majd itt együttesen megtitrálhatók.

Acilezhető és nem acilezhető aminok meghatározása egymás mellett

Az ecetsav-anhidrid a primer és szekunder aminokat acilezi, ennél fogva az acilezhető és a nem acilezhető bázisokat (tercier aminok) egymás mellett mérhetjük, ecetsav-anhidrid jelenlétében. Két, egymástól független meghatározást végzünk, egyet ecetsavas közegben, a másikat ecetsav-ecetsav-anhidrid elegyben. Az első az összbázicitást, a második a nem acilezhető vegyületek mennyiségét adja meg. Például kodein-klorid és efedrin-klorid tartalmú készítmény esetén, hiszen a kodein terciér-amin, az efedrin szekunder-amin. Az utóbbi ecetsav-anhidriddel reagáltatva acileződik, savamid képződik, amely már nem bázikus tulajdonságú, tehát az acilezést követően a kodein szelektíven mérhetővé válik.

Különböző erősségű bázisok meghatározása egymás mellett

Mint azt korábban is láthattuk, a gyógyszerkészítményekben gyakran előforduló koffein olyannyira gyenge bázis ($pK_s < 1$), hogy jégecetes közegben nem titrálható perklórsavval.

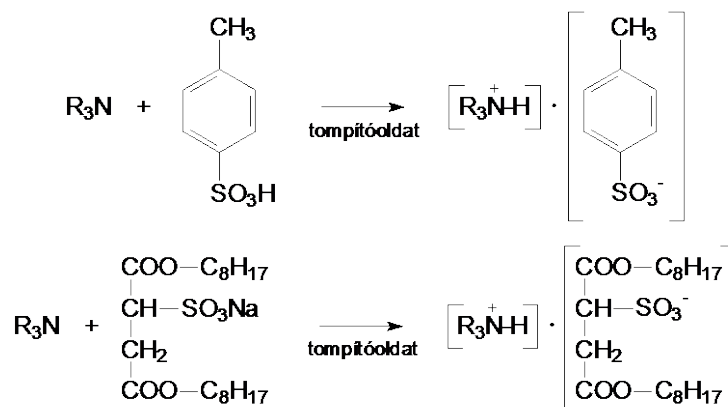
Ha a készítmény például kodein- vagy etilmorfin-kloridot tartalmaz koffein mellett, akkor a bázis lúggal történő felszabadítását és kloroformos extrakcióját követően a morfin-vázis alkaloid nemvizes közegű titrálás során meghatározható, a szintén a kloroformos fázisban jelen levő koffein nem zavar. Ezután a már megtitrált oldathoz ecetsav-anhidridet adva felerősítjük a koffein bázicitását, és perklórsavval tovább folytatva a titrálást meghatározhatjuk a koffein mennyiségét. Az első lépésben megtitrált alkaloid nem zavar.

Forgalomban van olyan összetett készítmény, amely koffein mellett aminofenazont tartalmaz. Az aminofenazon meghatározása perklórsavval, jégecetes közegben szelektív módon történik. Ebben az esetben az aminofenazon egyértékű bázisként mérődik, a dimetil-aminocsoport nitrogénje protonálódik. A koffein meghatározása azonban az előbbieken ismertetett módon ebben az összetételben nem tud megvalósulni. A koffein bázicitásának felerősítésére szolgáló ecetsav-anhidrid ugyanis a már megtitrált aminofenazon pirazon gyűrűjében levő nitrogének bázicitását is felerősíti, így azok szintén fogyasztanak perklórsav mérőoldatot, de a meghatározás nem lesz kvantitatív. Ilyen esetben más megoldást, például spektrofotometriás módszert kell alkalmazni a koffein meghatározására.

VIII.3.1.3 Bázisok meghatározása egyéb módszerekkel

Meghatározás ionpárképzésen alapuló módszerrel

A módszer alapja, hogy a meghatározandó bázikus vegyületek bizonyos szerves savakkal rosszul disszociáló ionpárokat képeznek. Erre a célra leggyakrabban használt sav a *p*-toluolszulfonsav, ill. dioktil-szulfo-szukcinát (Na-só).



Mérőoldatként a *p*-toluolszulfonsav kloroform-fenol (10:1) elegyével készített oldatát, illetve nátrium-szulfo-szukcinát vizes oldatát használhatjuk. A titrálás végpontjelzésére valamilyen sav-bázis indikátor alkalmazható. A titrálás kezdetén a meghatározandó vegyület képez komplexet az indikátorral, ennek a színét látjuk, majd a mérőoldat egy stabilabb komplexet (ionpárt) képez a meghatározandó bázissal, és kivonja azt az indikátor komplexéből. A végpontot az indikátor saját színe jelzi. A képződött ionpárt a titrálás során folyamatosan szerves oldószeres fázisba rázzuk át, elősegítve az egyensúlyra vezető reakció kvantitatív lefutását.

Csak az igen gyenge bázisok ($pK_s < 8$) mérhetőek ezzel a módszerrel. Az eljárás nem specifikus, a keverék egyéb bázikus komponensei zavarják a reakciót, a meghatározás előtt a zavaró hatásokat meg kell szüntetni.

Meghatározás csapadékképzésen alapuló módszerrel

Az alkaloidok csapadékképző reakciói általában a bázikus nitrogén és a csapadékképző reagens kölcsönhatásán alapszanak. Amennyiben az adott körülmények között a csapadék összetétele állandó, a leválasztás kvantitatív meghatározásra is alkalmas. A leggyakrabban használt csapadékképző reagens: foszformolibdénsav, K_2HgI_4 (Mayer-reagens), nátrium-tetrafenilborát (Kalignost-oldat) stb.

A nátrium-terafenilborát (NaTFB) primer, szekunder és terciér aminokkal csak savanyú közegben, a kvaterner ammónium-vegyületekkel savas és lúgos közegben egyaránt fehér csapadékot képeznek. Ez alkalmassá teszi a reakciót a kvaterner ammónium-vegyületek szelektív elválasztására. Például a metilhomatropin lúgos közegben csapadékot képez a reagenssel. A csapadékot kiszűrve, a csapadék mosását követően gravimetriásan mérhető, vagy acetoneban történő oldását követően argentometriásan is titrálható, potenciometriás végpontjelzés mellett.

A foszformolibdénsav és Mayer-reagens a legtöbb alkaloiddal és aminvegyülettel is csapadékot képez, így elsősorban azonosítási célokra, mint csoportreagensek használhatók.

A Dragendorff-reagens (bázisos bizmut-nitrát kálium-jodidot is tartalmazó ecetsavas oldata) az alkaloidok és általánosságban terciér aminok vékonyréteg-

kromatográfiás meghatározása során alkalmazott előhívó reagens. A keletkező csapadék kvantitatív meghatározást is lehetővé tesz, például a csapadék jódtartalmának oxidimetriás, vagy a bizmuttartalom komplexometriás meghatározása révén.

Meghatározás színreakciók alapján

Az alkaloidok és szerves aminok számos reakcióban az alkalmazott reagenssel színes terméket képeznek. A színreakciók nagy részét azonosításra használjuk, bizonyos esetekben, ha a reakció az adott körülmények között kvantitatív módon megy végbe, akkor mennyiségi meghatározásra is alkalmas.

A *tömény savakkal, savanhidridekkel* kapott színes termékek (*Koralin*-reakció, *Calmborg*-reakció), mivel a reakciók nem sztöchiometrikus lefutásúak, a vegyületek azonosításra alkalmasak.

Az *aldehidek* közé tartozó *Marquis*-reagens (formaldehid-tartalmú tömény kénsav) a morfincsoportbeli alkaloidok azonosítására használatos. A p-amino-benzaldehidet többféle formában alkalmazzák (*Ehrlich*-reagens, *Van Urk*-reagens), főként azonosításra, de egyes esetekben kvantitatív meghatározásra is, például a reakcióban keletkező színes Schiff-bázis spektrofotometriás mérése alapján.

VIII.3.2 Gyenge savak meghatározása

Terápiás célra, néhány szélsőséges esettől eltekintve, olyan - savi funkciós csoporttal rendelkező - molekulákat alkalmaznak, amelyek pK_s értéke nagyobb, mint 3. Savként mérhető funkciós csoportok: karbonsavak, szulfonsavak, enolok, fenolok, szulfonamidok, ureidek stb.

VIII.3.2.1 Meghatározás alkalimetriás módszerrel

A gyógyszerként használt savas vegyületek közül a pK_s 1-6 intervallumba eső vegyületek lúggal történő semlegesítése vizes közegben is elvégezhető (pl. szalicilsav, acetilszalicilsav). Minél gyengébb egy sav, annál inkább célszerű nem közvetlenül mérni, hanem lúgfelesleget alkalmazva visszamérni. A barbitálok imines hidrogénje ugyancsak semlegesíthető vizes közegben, az alkalmazott alkohol a vegyület oldásához szükséges.

A barbitáloknál is gyengébb savi karakterű vegyületek (pl. fenolok egy része, xantinszármazékok) semlegesítése csak *nemvizes közegben* végezhető el. A közömbös oldószerek (lásd előbb) mellett elsősorban a savi erősség fokozására alkalmas bázikus karakterű *nivelláló oldószerek*, például piridin, dimetil-formamid, etilén-diamin stb. használatosak.

Mérőoldatként egyrészt alkáli-alkoholátok (pl. nátrium-metilát) normál vagy izo-alkoholok változó arányú benzolos elegyével készült oldata használható. Másrészt tetraalkil-ammónium-hidroxidok (pl. tetrabutil-ammónium-hidroxid) metanollal, illetve metanol-benzol elegyével készült oldatát alkalmazzák.

Végpontjelzésre leginkább ftalein típusú indikátorokat (fenolftalein, timolftalein) használnak, illetve bázikus oldószerek esetén pl. metanilsárga, azoibolya indikátorokat.

Savak egymás melletti meghatározása akkor lehetséges, ha a savi disszociációs állandók között legalább négy nagyságrend különbség van, ilyenkor potenciometriás végpontjelzést alkalmazva a titrálási görbén külön lépcsőként jelenik meg a két eltérő erősségű savhoz tartozó potenciálugrás.

VIII.3.2.2 Argentometriás meghatározások

Igen gyenge savak esetén ($pK_s > 7$) időnként alkalmazható a kiszorításos titrálás, amikor valamilyen fémionnal, általában ezüst-ionnal, leszorítjuk a molekuláról a protont (pl. barbiturátok, teofillin stb.). Ha a reakció lefutása kvantitatív, ezüst-nitrát mérőoldattal közvetlenül csapadékos titrálást végezhetünk, melynek végpontját vizuálisan vagy műszeresen jelezzük.

Ha csak ezüst-nitrát feleslegében cserélhető le ezüsttel kvantitatív módon a savi hidrogén, az oldhatatlan ezüstsó elválasztása után az ezüst-ionok feleslegét mérjük vissza (indirekt argentometria).

A molekuláról leszorított protont is titrálhatjuk vizes mérőoldattal. Gyógyszerkönyvi meghatározás szerint, a barbitálszármazékot piridinben kell oldani, ezüstionokkal reagáltatni, majd etanos nátrium-hidroxid-oldattal titrálni. A piridin oldószer, segédkomplex-képző és protonátvivő szerepet egyaránt betölt.

VIII.3.3 Műszeres analitikai eljárások alkalmazása

Egyes összetett gyógyszerkészítmények komponenseinek azonosítása, illetve tartalmának meghatározása egyszerűen elvégezhető kémiai reakciók, illetve titrimetriás eljárások alkalmazásával nem, vagy csak igen nehezen végezhető el. Ennek hátterében a már említett tényezők állnak: hatóanyagok vagy segédanyagok zavarják egymás meghatározását. Ilyen esetekben célszerű műszeres analitikai eljárásokhoz nyúlni.

A kromatográfiai módszerek közül a vékonyréteg-kromatográfia elsősorban összetett készítmények hatóanyagainak azonosítására használható. (Lásd. II.2.2. fejezet) A folyadékkromatográfiai módszerek és UV-VIS spektrofotometriai eljárások a kvalitatív és kvantitatív meghatározás során is alkalmazhatóak.

VIII.3.3.1 Nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfia

A nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfiai (HPLC) módszereket a rutin analitikai vizsgálatok során is kiterjedten alkalmazzák, hiszen a különböző mozgó- és állófázisok kombinálása révén szinte bármilyen összetételű készítmény komponensei elválaszthatók egymástól.

A folyadékkromatográfiai elválasztás elvi hátterét, paramétereit, a készülék leírását az arra vonatkozó fejezet tartalmazza (IV.3).

Amennyiben az egyes összetevők azonosítása a cél, a retenciók alapján (standard anyagokkal, illetve adatbázisokban megtalálható adatokkal összevetve) ez könnyen megtehető.

A megfelelő detektálási módszer alkalmazásával a komponensek mennyiségi viszonyai is meghatározhatók. A minta-előkészítésnek kiemelt jelentősége van. Az egyes összetevők mennyiségi meghatározásának legegyszerűbb módja, hogy az anyagok garantált minőségű standardjaiból ugyanolyan koncentrációjú összehasonlító oldatot készítünk, mint ami a receptúrában is megtalálható, és ennek az oldatnak a csúcs alatti területét hasonlítjuk össze a vizsgált készítmény komponenseinek a csúcs alatti területeivel.

Több komponens esetében a kvantitatív meghatározás legfontosabb szempontja, hogy első lépésben meg kell határozni az összetevők elúciós sorrendjét és deklarálni kell a megfelelő felbontást és csúcshimetriát. Igazolni szükséges, hogy a mérendő anyagok rendelkeznek a meghatározhatósági határt elérő, illetve azt meghaladó csúccsal. Ezenkívül, meg kell határozni az esetlegesen megjelenő idegen csúcsok (amelyek szennyezőktől, bomlástermékekből származnak) mennyiségét és intenzitását.

VIII.3.3.2 Spektrofotometria

A kromatográfiai módszerek (elsősorban a HPLC) elterjedésének következtében a gyógyszeranalitikai gyakorlatban csökkent a spektrofotometriai módszerek szerepe. Bár az is megemlítendő, hogy a HPLC-készülékekben a leginkább UV detektorokat használnak a kromatogramok elkészítéséhez.

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv főként azonossági és tisztasági vizsgálatok elvégzéséhez használ spektrofotometriai eljárásokat. Az összetett készítmények analízise során azonban elsősorban a komponensek tartalmának meghatározásához használt módszer. Megfelelő pontossága, kis anyagigénye, esetenként szelektivitása és könnyen áttekinthető matematikai háttere miatt sok esetben igen előnyösen alkalmazható.

A spektrofotometriai eljárások elvi hátterével, felhasználhatóságával, a spektrofotométer felépítésével, illetve többkomponensű rendszerek spektrofotometriás vizsgálatával az arra vonatkozó fejezet foglalkozik (Lásd. III.14).

VIII.4 Példák a gyakorlatból

Pulvis antidoloricus

Összetétel:

| | |
|------------------------------|----------------------------|
| Ethylmorphini hydrochloridum | 0,20 g |
| Coffeinum | 0,50 g |
| Paracetamolum | 3,00 g |
| Acidum acetylsalicylicum | 5,00 g |
| | <i>10 db osztott porra</i> |

Kémiai azonosítás:

Etilmorfin-klorid: A porkeverékre porcelántálcán néhány csepp Marquis-reagenst (tömény kénsav és formaldehid) cseppentünk, ibolya színeződést látunk. A reakció a morfin-vázis alkaloidok jellegzetes reakciója, a többi komponens nem zavarja.

Koffein: A xantinvasz vegyületek csoportreakciója, a murexid-reakció a koffein azonosítására ebben az összetételben, közvetlenül nem használható, csak a koffein lúgos közegből, kloroformmal történő előzetes extrakcióját követően. Adott körülmények között ugyanis a paracetamol is erősen megsárgul, majd a bepárlás után ammóniával is különböző színű termékek keletkeznek, amelyek zavarják a koffein azonosítását.

Paracetamol: A paracetamol, mint fenolos vegyület vas(III)-ionokkal lilás színű komplexet képez. A reakció ebben az összetételben szelektív, mert a jelen levő acetilszalicilsav közvetlenül nem, csak hidrolízist követően képez komplexet vas(III)-ionokkal. Szintén szelektív a 25%-os salétromsav hatására bekövetkező reakció is, amikor a lecseppentett porkeverék narancsárga színeződést mutat. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben használt indanilin-reakció viszont nem használható jelen esetben, mert az acetilszalicilsav zavarja a reakciót.

Acetilszalicilsav: Az összetételben jelen levő paracetamol kémiai sajátosságait figyelembe véve, az acetilszalicilsav kimutatására a hidrolízist követő, vas(III)-kloriddal szalicilsavként történő azonosítás nem, valamint az acilcsoport kimutatását szolgáló kalcium-hidroxidot és nitrobenzaldehydet alkalmazó reakció sem alkalmas. Ilyen esetekben a legcélravezetőbb megoldás a komponensek azonosítására a vékonyréteg-kromatográfia alkalmazása.

Tartalmi meghatározás:

Etilmorfin-klorid: A porkeverék lúgos közegből történő extrakcióját, és víztelenítését (vízmentes nátrium-szulfáton történő szűrés) követően a kloroformos fázisba került

szabad etilmorfin bázis szelektív módon titrálható jégecetes perklórsav mérőoldattal, tropeolin indikátor mellett. A szintén a szerves fázisban levő koffein a mérést nem zavarja, hiszen a koffein nagyságrenekkel gyengébb bázis, mint az etilmorfin, és ebben a közegben nem mérődik.

Koffein: A már megtitrált kloroformos fázisban jelen levő koffein bázicitását ecetsav-anhidrid hozzáadásával meg lehet növelni, ezáltal mérhető lesz. Szudán III indikátor mellett, jégecetes perklórsavval egyértékű bázisként titrálható.

Acetilszalicilsav: A porkeverék alkoholban történő oldását követően az acetilszalicilsav tartalom, fenolftalein indikátor mellett, nátrium-hidroxid-mérőoldattal történő titrálás során meghatározható. A titrálást a paracetamol nem befolyásolja, de a jelen levő etilmorfinsó sósav komponense szintén mérőoldatot fogyaszt, ezért a fogyásból le kell vonni az etilmorfin-kloridra fogyott ml-ek számát.

Paracetamol: A paracetamol meghatározása ebben a készítményben titrimetriás módszerrel (például bromatometrián) nem tud megvalósulni, ugyanis a jelen levő acetilszalicilsav zavarja a meghatározást. A paracetamol mennyiségének meghatározása spektrofotometrián történhet, a porkeverék metanolban történő oldását követő abszorbancia-méréssel. A titrimetriás módszerekkel meghatározott többi komponens abszorbanciája a koncentráció és a fajlagos abszorpciós koeficiensek segítségével kiszámolható. Ezek összegét levonva a mért abszorbancia értékből, megkapjuk a paracetamolra eső részt, amiből - a fajlagos koeficiens ismeretével - kiszámolható a koncentrációja.

Pulvis cholagogus

Összetétel:

| | |
|----------------------------|----------------------------|
| Homatropini methylbromidum | 0,03 g |
| Phenolphthaleinum | 0,50 g |
| Papaverini hydrochloridum | 0,60 g |
| Acidum dehydrocholicum | 2,50 g |
| Natrii benzoas | 2,50 g |
| Natrii salicylas | 2,50 g |
| | <i>10 db osztott porra</i> |

Kémiai azonosítás:

Homatropin-metilbromid: A porkeverék vizes rázadékából savanyítás hatására kiválik a dehidrokólsav és a benzoésav, amit kiszűrhetünk. A szüredék lúgosítás hatására rózsaszínű lesz a fenolftalein miatt, a hozzáadott nátrium-tetrafenil-boráttól pedig zavarossá válik. Ennek oka, hogy a homatropin-metilbromid, mint kvaterner ammónium-vegyület lúgos közegben is reagál a tetrafenil-boráttal, míg a lúgos közegben protonált állapotban levő papaverin nem lép vele reakcióba.

Fenolftalein: A porkeverék vizes rázadéka néhány csepp nátrium-hidroxid-oldat hatására rózsaszínű lesz, hiszen a fenolftalein, mint sav-bázis indikátor lúgos közegben mutat színváltozást.

Papaverin-klorid: A papaverin kimutatására szolgáló koralin-reakció (ecetsav-anhidrides melegítés és tömény kénsav hatására kialakuló sárgászöld fluoreszcencia) közvetlenül nem alkalmazható, mert a dehidrokólsav zavarja. A két komponens egymástól el kell választani, lúgos extrakciót követően a felszabadult papaverin bázis a kloroformos fázisba kerül, míg a dehidrokólsav a lúgos-vizes közegben marad. A kloroformos fázisban már szelektíven elvégezhető a koralin-reakció.

Dehidrokólsav: A papaverin meghatározása során nyert lúgos-vizes fázis átsavanyítása után a protonálódott, és így töltés nélküli dehidrokólsav a kloroformos kirázást

követően a szerves fázisba kerül. A kloroformos fázis bepárlását követően a maradék ecetsav-anhidrides melegítés és tömény kénsav hatására narancsszínű lesz. A vegyület szterán vázában dehidrogéneződés következtében kialakuló kettős kötések okozzák a színeződést és esetleges fluoreszcenciát.

Benzooesav és szalicilsav: A porkeverék vízzel történő rázogatása, majd szűrése után a szüredékhez vas(III)-klorid oldatot adva hússzínű csapadék és lila oldat keletkezik. Az előbbi a benzooesav vas(III)-ionokkal képezett reakciója során képződik, a lila színeződés pedig a szalicilsav vas(III)-ionokkal képződő komplexének színéből adódik. A vegyületek azonosítása leegyszerűsítendő, vékonyréteg-kromatográfiás módszert is alkalmazhatunk, ugyanis egy jól kiválasztott kromatográfiás rendszerben minden komponens elkülöníthető egymástól, és standard anyagok R_f értékei alapján azonosítható.

Tartalmi meghatározás:

Fenolftalein: A fenolftalein tartalom spektrofotometriás meghatározása során azt a vegyületnek azt a jól ismert tulajdonságát használhatjuk fel, hogy pH-változás hatására szerkezetváltoztatással, és annak következtében színváltoztatással reagál. A porkészítmény metanolos oldatából kiindulva nátrium-hidroxid-oldattal egy pH = 8-10 oldatot készítünk, ami rózsaszínű. Az oldat fényelnyelését 550 nm-en mérjük, a fenolftalein mennyiségét kalibrációs egyenes segítségével számolhatjuk ki.

A meghatározás során azonban ügyelni kell arra, hogy ha a pH 10 fölé emelkedik, akkor az oldat elszíntelenedik. Ha tehát nem végzünk optimális lúgosítást, több különböző szerkezetű és színű részecske egyszerre lesz jelen az oldatban, és a meghatározás nem lesz kvantitatív.

Papaverin-klorid: A porkészítmény lúgos oldatából kloroformos extrakciót követően a papaverin bázis nemvizes közegű titrálás során, tropeolin indikátor mellett, perklórsavval meghatározható.

Dehidrokólsav: A porkészítmény alkoholos oldatából a dehidrokólsav egyértékű savként, nátrium-hidroxid-mérőoldattal titrálható. A mérés során a papaverin-klorid sósav komponense is mérődik, ezért a papaverin mennyiségével ekvivalens lúg mennyiségét le kell vonni a mérőoldat fogyásból.

Suppositorium haemorrhoidale

Összetétel:

| | |
|------------------------------|--------|
| Ephedrini hydrochloridum | 0,30 g |
| Lidocainum | 0,80 g |
| Bismuthi subgallas | 1,00 g |
| Zinci oxydum | 1,00 g |
| Silica colloidalis anhydrica | 0,50 g |
| Adeps solidus 50 | 4,00 g |
| Balsamum peruvianum | 1,00 g |
| Ricini oleum hydrogenatum | 0,40 g |
| Adeps solidus 50 | qu.s. |

10 db végbélkúp

Kémiai azonosítás:

Az azonosítási reakciók megkezdése előtt a hatóanyagokat el kell választani a vivőanyagoktól. Ennek érdekében a kúpokat pH = 8-as tompítóoldatban vízfürdőn megolvasztunk, majd néhány perces rázogatás után kifagyasztjuk, és szűrjük.

Efedrin-klorid: A szüredékhez ninhidrin-oldatot adunk, színe lila lesz.

Lidokain: A lidokai kémiai reakcióval történő azonosítása bizonytalan, ezért célszerű vékonyréteg-kromatográfiás módszert alkalmazni.

Tartalmi meghatározás:

Lidokain: A kúp hatóanyagait kifagyasztásos módszerrel el kell választani a segéd- illetve vivőanyagoktól. Ezt követően a lidokain szelektív módon kioldható kloroformba, hiszen az efedrin ionos formában lévén nem oldódik a szerves oldószerben. A lidokain egyértékű bázisként nemvizes közegű titrálás során, perklórsav-mérőoldattal szelektív módon mérhető.

Amennyiben vizes-lúgos közegből végezzük a kloroformos extrakciót, mindkét bázis a szerves fázisba jut. A lidokain szelektív meghatározására azonban így is van lehetőség, hiszen ha ecetsav-anhidridet adunk az oldathoz, akkor az efedrin, mint szekunder amin acileződik, és egyedül a lidokain mérődik perklórsavval.

Efedrin-klorid: Az efedrin bázis ebben az összetételben szelektíven nem mérhető, viszont a lúgos közegből történő extrakciót követően, amikor mindkét bázis a szerves oldószerbe kerül, nemvizes közegű titrálás során az összbázicitás meghatározható. Az efedrin mennyiségét megkapjuk, ha a készítményben előzetesen meghatározott lidokain mennyiségére eső fogyást kivonjuk az összbázicitásra eső fogyás értékéből.

Unguentum lidocaini ad rhagades

Összetétel:

| | |
|---------------------|--------|
| Lidocainum | 2,0 g |
| Unguentum macrogoli | 16,0 g |
| Bismuthi subgallas | 2,0 g |

Kémiai azonosítás:

Bázisos bizmut-gallát: A készítmény izzítólemezen hevítve megszenesedik. A kiizzított, melegen barnásvörös színű maradék, a bizmut vegyületekre jellemző módon, kihülés után sárga lesz.

Lidokain: A lidokai kémiai reakcióval történő azonosítása ebben az összetételben alkalmazható. A készítmény salétromsavban történő oldását követően a lidokain higany-nitrát oldattal sárgászöld színeződést ad.

Tartalmi meghatározás:

Lidokain: A lidokain szelektív módon kioldható kloroformba, hiszen az bizmut ionos formában lévén nem oldódik a szerves oldószerben. A lidokain egyértékű bázisként nemvizes közegű titrálás során, perklórsav-mérőoldattal szelektív módon mérhető.

Bizmut: A bizmutsó ebben az összetételben, a készítmény sósavas oldását követően, metiltimolkék indikátor jelenlétében, nátrium-edetát-mérőoldatot használva, komplexometriás titrálás révén szelektíven mérhető.

IX Felhaszánt irodalom

II. A Gyógyszerkönyvben használatos nemzetközi mértékegységrendszer (SI) egységek és egyéb mértékegységek

Magyar Gyógyszerkönyv VII. kiadás. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 1993.
Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2004.
Szász György, Takács Mihály, Végh Antal: Gyógyszerészi Kémia, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1990.

III. Gyógyszerkönyvi fizikai és fizikai-kémiai vizsgálatok

Magyar Gyógyszerkönyv VII. kiadás. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 1993.
Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2004.
Szász György, Takács Mihály, Végh Antal: Gyógyszerészi Kémia, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1990.
Burger Kálmán: Az analitikai kémia alapjai. Kémiai és műszeres elemzés. Semmelweis kiadó, Budapest, 1999.
Perjési Pál, Fodor Krisztina, Rozmer Zsuzsanna: Gyógyszerészi Kémiai Gyakorlatok I. Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Pécs, 2010.
Douglas A. Skoog, F. James Holler and Timothy A. Nieman: Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1998.
Eugene Hech., Optics, Addison-Wesley, Reading, MA, 1998.

Smeller László: Optikai spektroszkópiai módszerek. Semmelweis Egyetem, Biofizikai és sugárbiológiai Intézet, 2011.

Subodh Kumar: Organic Chemistry: Spectroscopy of Organic Compounds. Department of Chemistry, Guru Nanak Dev University, 2006.

Bánhidi Olivér: Molekula-spektroszkópiai módszerek. Egyetemi jegyzet. Miskolci Egyetem, Műszaki Anyagtudományi Kar, Kémiai Intézet, 2011.

Fábián István: Spektrofotometria (silabusz). Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 2009.

Molnárné Hamvas Lívia: Kémiai alapismeretek és számítások. Egyetemi jegyzet, Sopron, 1996.

Görög Sándor: Spektrofotometriás gyógyszeranalízis, Akadémia kiadó, Budapest, 1993.

J. Michael Hollas: Modern Spectroscopy, Wiley and Sons Ltd, fourth edition, Chichester, 2004.

FreeBookCentre.net: Introduction to Spectroscopic methods

http://www2.fiu.edu/~gardinal/class_syllabi/4130%20FALL%202010/INTRODUCTION%20TO%20SPECTROSCOPY%20CHAPTER%206.pdf

Andrei Sirenko: Principles of Spectroscopy: Interaction with matter (lecture), New Jersey Institute of Technology, Department of Physics, 2007

<http://web.njit.edu/~sirenko/Phys-774/Lecture4-2007.pdf>

Billes Ferenc: Környezetvédelmi Analitika - Rezgési Spektroszkópia (e-könyv), ISBN: 978-615-5044-50-2, Környezetvédelmi Tudástár XXIV, szerk. Dr. Domokos Endre, Pannon Egyetem Környezetmérnöki Intézet, Veszprém, 2013.

Béla Hegedűs, Péter Bod, Kálmán Harsányi, Imre Péter, Alajos Kálman, László Párkányi: Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis 7, (5) 563-569 (1989).

- Mohamad A. Hassan, Mutaz Sheikh Salem, Mohammad S. Sueliman, Naji M. Najib: *International Journal of Pharmaceutics* 149 (1997) 227-232.
- Jie Lu, Xiu-Juan Wang, Xia Yang, Chi-Bun Ching: *Growth & Design* 7, (9) 1590-1598 (2007).
- Vibrational Spectra and Structure* (Ed. J. R: Doring), Elsevier, Amsterdam, Vol. 16, 1985.
- Kökösi József, SOTE, Gyógyszerészi Kémiai Intézet Infravörös spektroszkópia, speciál kollégium
http://gytk.sote.hu/gyki/IIIgradulis_kepzes_elemei/SpecKoll/Instrumental/InfraKJ2010.pdf
- Holly Sándor, Sohár Pál, *Infravörös spektroszkópiák*, Műszaki Könyvkiadó, 1969.
- Koji Nakanishi, Philippa H. Solomon, *Infrared absorption spectroscopy*, 2nd Ed., Holden-Day Inc., San Francisco, Düsseldorf, Johannesburg, London, Panama, Singapore, Sydney, 1977.

IV. Kromatográfia

- Magyar Gyógyszerkönyv VII. kiadás. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 1993.
- Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2004.
- Szász György, Takács Mihály, Végh Antal: *Gyógyszerészi Kémia*, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1990.
- Heinz Engelhardt (Editor): *Practice of high performance liquid chromatography*, Springer, 1986.
- Douglas A. Skoog, F. James Holler and Timothy A. Nieman: *Principles of Instrumental Analysis*, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1998.
- David G. Watson: *Pharmaceutical analysis*, Second Edition. Elsevier, 2005.
- Daniel C. Harris: *Quantitative chemical analysis*, Eighth Edition. Freeman and Company, 2010.

V. Analitikai eljárások validálása

- International Conference of Harmonisation, Q2B: *Validation of analytical procedures: methodology*. US FDA Federal Register, V. 62, May, pp 27463-27495, 1997
- International Conference of Harmonisation, Q2(R1): *Validation of analytical procedures: Text and methodology*. US FDA Federal Register, 2005
- Chung Chow Chan: *Analytical Method Validation: Principles and Practices*. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Regulations and Quality*, Chapter 8.1. 2008.
- Kapil Karla: *Method development and validation of analytical procedures*. *Quality control of herbal medicines and related areas*. www.intechopen.com
- Daniel C. Harris: *Quantitative chemical analysis*. Eighth Edition. Freeman and Company, 2010.
- Erdey-Mázor: *Analitikai kézikönyv*. Műszaki Könyvkiadó, 1974.
- Gáspár Attila: *Elválasztási módszerek validálása*. *Oktatási segédanyag műszeres analitika gyakorlathoz*. <http://www.muszeroldal.hu/measurenotes/validalas.pdf>
- Dinya Elek: *Biometria az orvosi gyakorlatban*. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2001.
- Douglas G. Altman: *Practical statistics for medical research*. Chapman & Hall, 1991.
- Belágyi József: *Orvosi biometria*. PTE ÁOK egyetemi jegyzet, 2011.
- Juvancz Iréneusz, Paksy András: *Orvosi biometria*. Medicina Kiadó, 1982.

VI. Nem-gyógyszerkönyvi fizikai és fizikai-kémiai vizsgálatok

- Takácsné Novák Krisztina: A megoszlási hányados GLP szerinti meghatározásának praktikus szempontjai. *Acta Pharm. Hung.* 67. 179-191. 1997.
- Takácsné Novák Krisztina, Völgyi Gergely: A fizikai-kémiai jellemzés helye és módszerei a gyógyszerkutatásban. *Magyar Kémiai Folyóirat.* 111. 169-176. 2005.
- Krisztina Takács-Novák, Alex Avdeef: Interlaboratory study of logP determination by shake-flask and potentiometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14. 1405-1413. 1996.
- Albert Leo, Corwin Hansch, David Elkins: Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews* 71. 525-616. 1971.
- Alex Avdeef: pH-metric logP. II: Refinement of partition coefficients and ionization constants of multiprotic substances. *J. Pharm. Sci.* 82. 183-190. 1993.
- William J. Lambert: Modeling oil-water partitioning and membrane permeation using reversed-phase chromatography. *J. Chrom. A* 656. 469-484. 1993.
- Liping Zhou, Jianling Wang: Physico-chemical characterization in drug discovery. *Trends in bio/pharmaceutical industry. Preclinical formulation.* 12-18. 2009.
- Bernard Testa, Patrizia Crivori, Marianne Reist, Pierre-Alain Carrupt: The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: concepts and examples. *Perspectives in Drug Discovery and Design.* 19. 179-211. 2000.
- Gergely Pál, Erdődi Ferenc, Vereb György: Általános és bioszervetlen kémia. *Semmelweis Kiadó, Budapest, 2003.*
- Ebbing, Darrell D.: *General chemistry.* 2. ed. Boson [etc.] : Houghton Mifflin, cop. 1987.
- Póta György: Fizikai-kémiai gyógyszerészhallgatók számára. 4. jav. kiad., Kossuth Egyetemi K., Debrecen, 2005.
- Takácsné Novák Krisztina, Józán Miklós, Mazák Károly: Gyógyszerészi kémia gyakorlatok, Gyógyszervegyületek vizsgálata. *Semmelweis kiadó, Budapest, 2005.*
- David T. Manallack: The pKa distribution of drugs: Application to drug discovery. *Perspectives in Medicinal Chemistry,* 1, 25-38. 2007.
- Physicochemical properties of drugs. *Essentials of Pharmaceutical Chemistry.* Chapter 3. 57-79.

VII. Gyógyszer hatóanyagok azonosításának módszerei

- Magyar Gyógyszerkönyv VII. kiadás. *Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 1993.*
- Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás. *Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2004.*
- Szász György, Takács Mihály, Végh Antal: *Gyógyszerészi Kémia, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1990.*
- Perjési Pál, Fodor Krisztina, Rozmer Zsuzsanna: *Gyógyszerészi Kémiai Gyakorlatok I. Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Pécs, 2010.*

VIII. Összetett gyógyszerkészítmények vizsgálata

- Magyar Gyógyszerkönyv VII. kiadás. *Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 1993.*
- Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás. *Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2004.*
- Formulae Normales VI. Szabványos vényminták. *Budapest, 1987.*
- Formulae normales VII. Szabványos vényminták. *Melania Könyvkiadó, Budapest, 2003.*
- Szász György, Takács Mihály, Végh Antal: *Gyógyszerészi Kémia, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1990.*

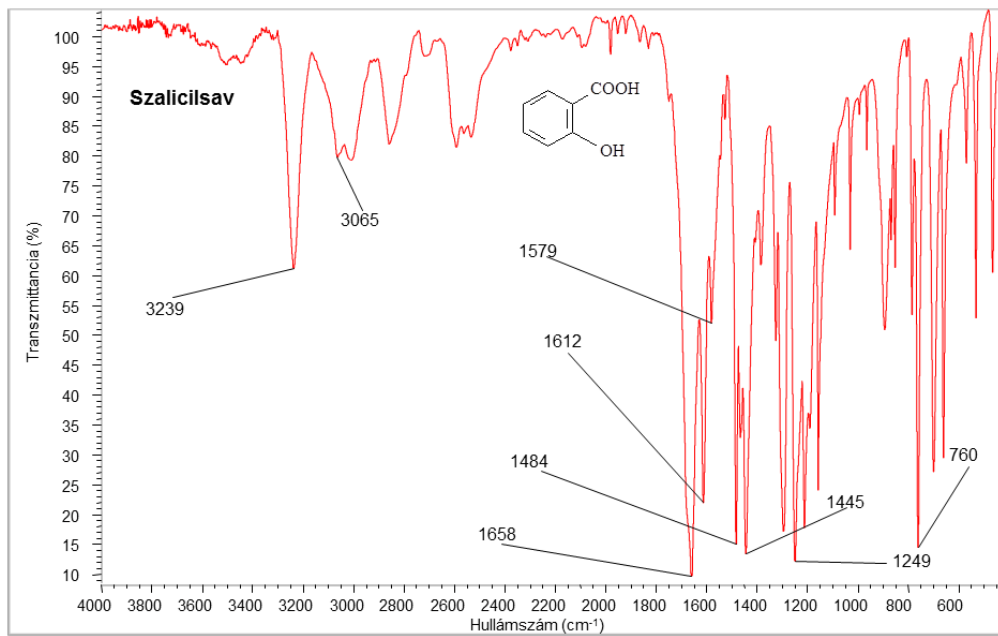
- Fülöp Ferenc, Noszál Béla, Szász György, Takácsné Novák Krisztina: Gyógyszerészi Kémia. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010.
- Takácsné Novák Krisztina, Józán Miklós, Mazák Károly: Gyógyszerészi kémia gyakorlatok - Gyógyszervegyületek vizsgálata. Előiratgyűjtemény és kommentár. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2005.
- Papp Ottó, Gergelyné Zobin Ágnes, Józán Miklós: Gyógyszerészi Kémia - Többkomponensű készítmények vizsgálata, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Budapest, 1997.
- Horváth Péter: Gyógyszerészi kémia gyakorlatok - Többkomponensű gyógyszerkészítmények vizsgálata. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006.
- Perjési Pál, Fodor Krisztina, Rozmer Zsuzsanna: Gyógyszerészi Kémiai Gyakorlatok I. Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Pécs, 2010.
- Horváth Péter, Elekné Vörös Zsuzsanna, Sinkó Bálint, Vámos József és Takácsné Novák Krisztina: Magisztrális gyógyszerkészítmények minőségellenőrzésének aktuális kérdései I. Azonossági vizsgálatok, Acta Pharmaceutica Hungarica, 76, 86-94, 2006.
- Sinkó Bálint, Völgyi Gergely, Horváth Péter és Takácsné Novák Krisztina: Magisztrális gyógyszerkészítmények minőségellenőrzésének aktuális kérdései II. Paracetamol tartalmú készítmények tartalmi meghatározási lehetőségei. Acta Pharmaceutica Hungarica, 76, 173-180, 2006.
- Takácsné Novák Krisztina, Sinkó Bálint, Hang Ildikó, Kiss Gézőné, Dávid Ádám Zoltán és Horváth Péter: Magisztrális gyógyszerkészítmények minőségellenőrzésének aktuális kérdései III. Teofillin tartalmú kúpok vizsgálata. Acta Pharmaceutica Hungarica, 77, 82-89, 2007.
- Somuti Tamásné: A FoNo VI. gyógyszerkészítményeinek vizsgálati előiratai - Gyűjtemény az OGYI közleményekből. Budapest, 1997.

X Mellékletek

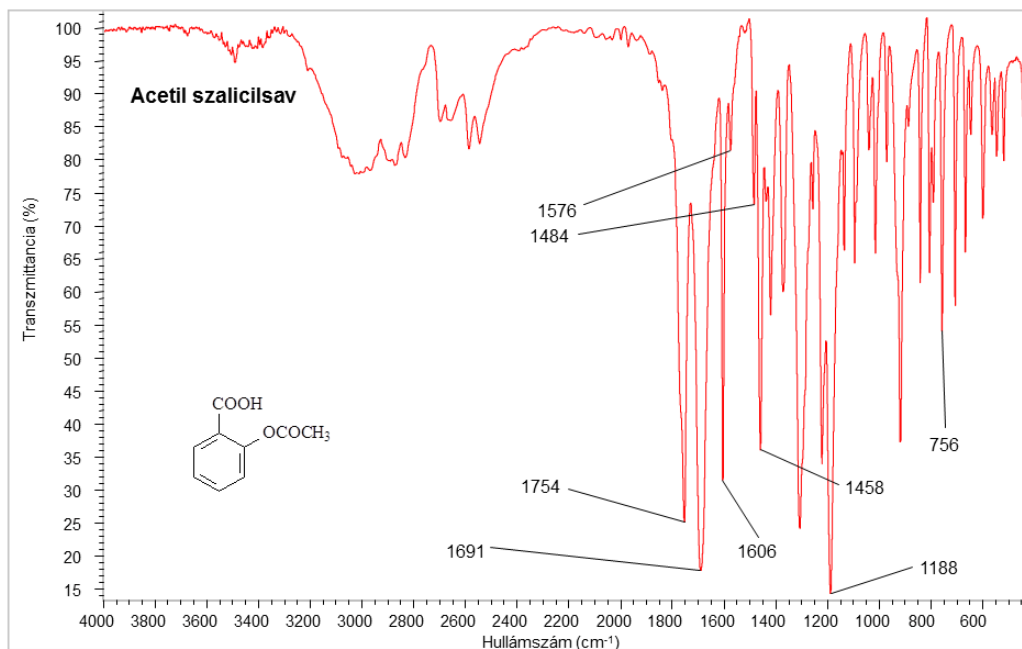
X.1 IR spektrofotometria

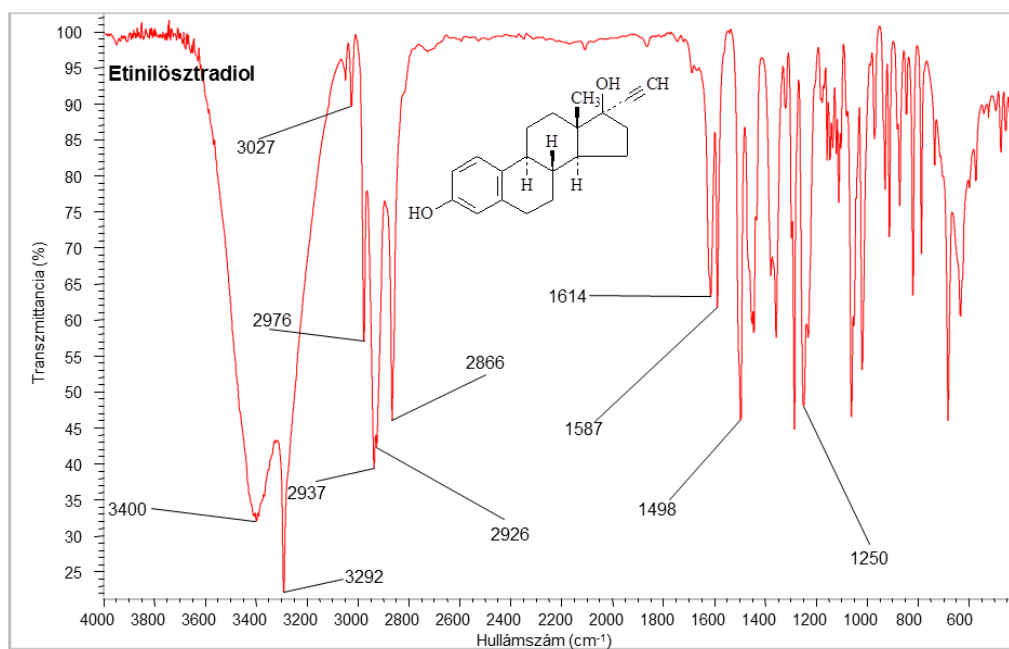
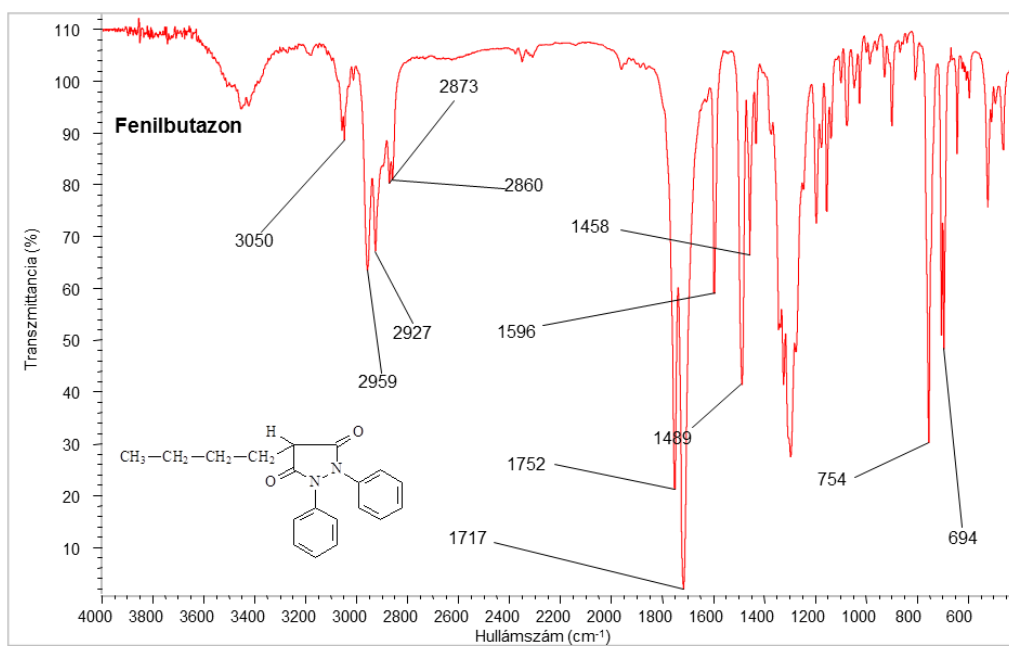
X.1.1 Spektrumgyűjtemény (hallgatói verzió)

X-1. ábra: Szalicilsav FT IR spektruma

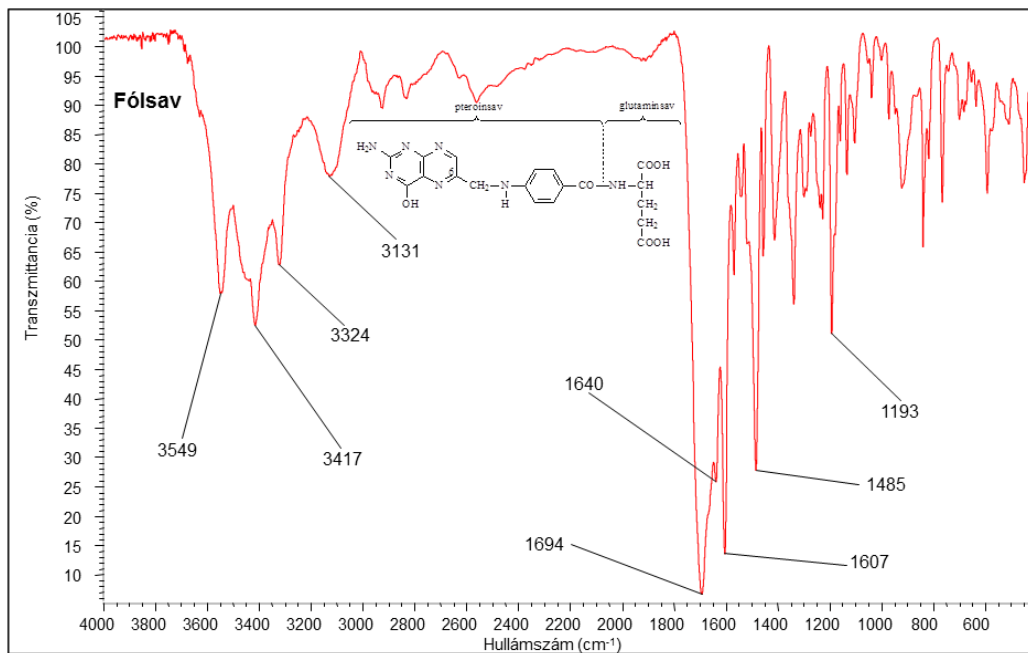


X-2. ábra: Acetilszalicilsav FT IR spektruma

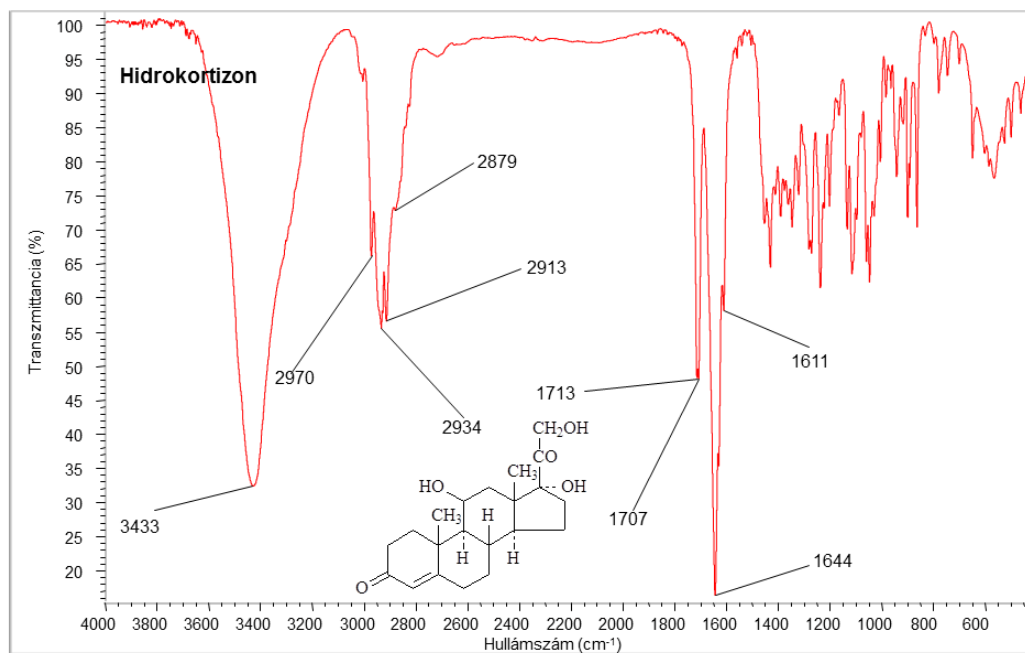


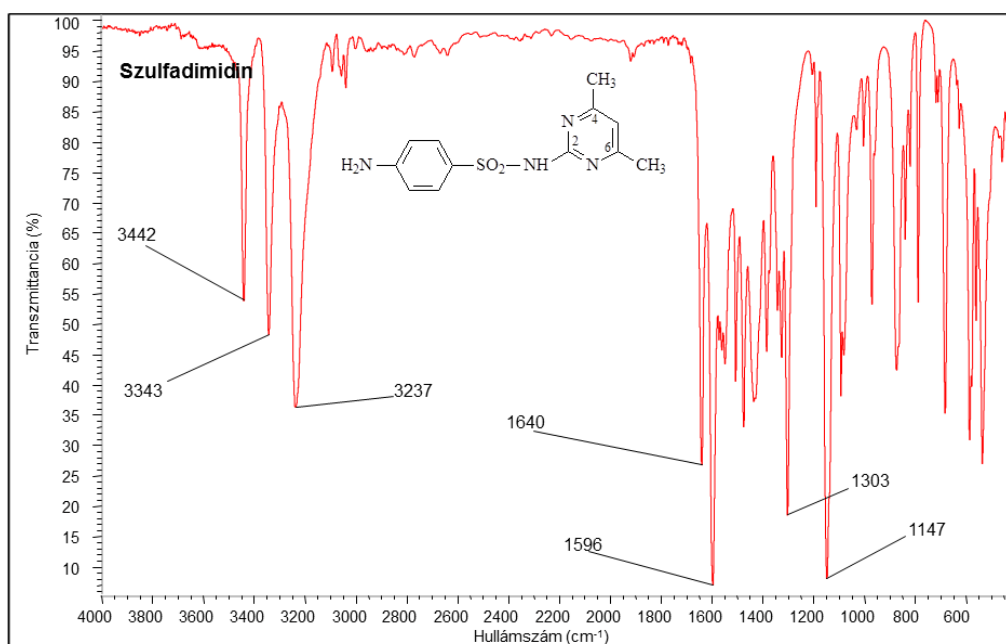
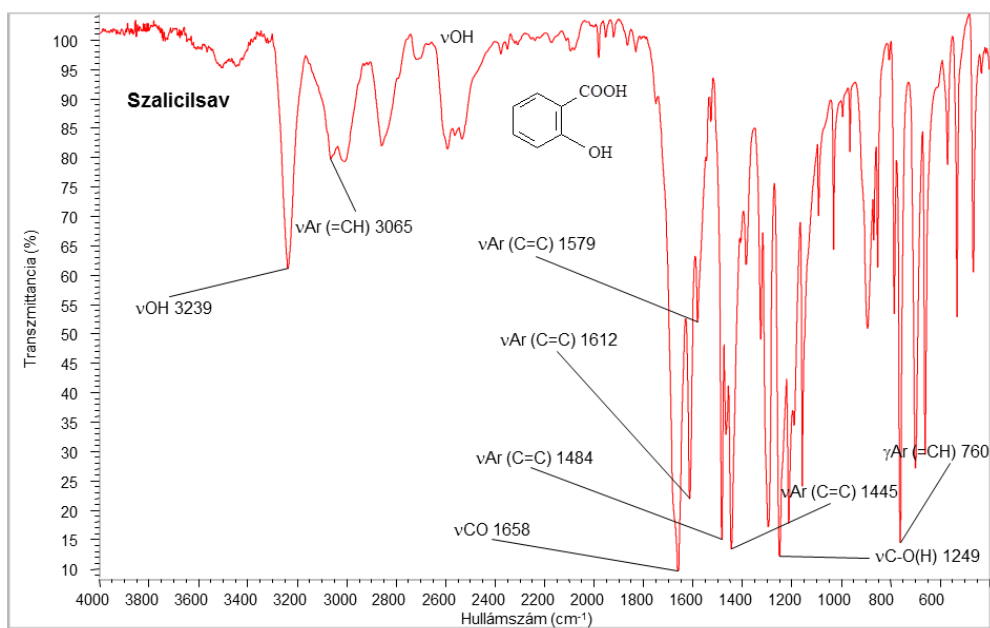
X-3. ábra: Etinilösztadiol FT IR spektruma**X-4. ábra:** Fenilbutazon FT IR spektruma

X-5. ábra: Folsav FT IR spektruma

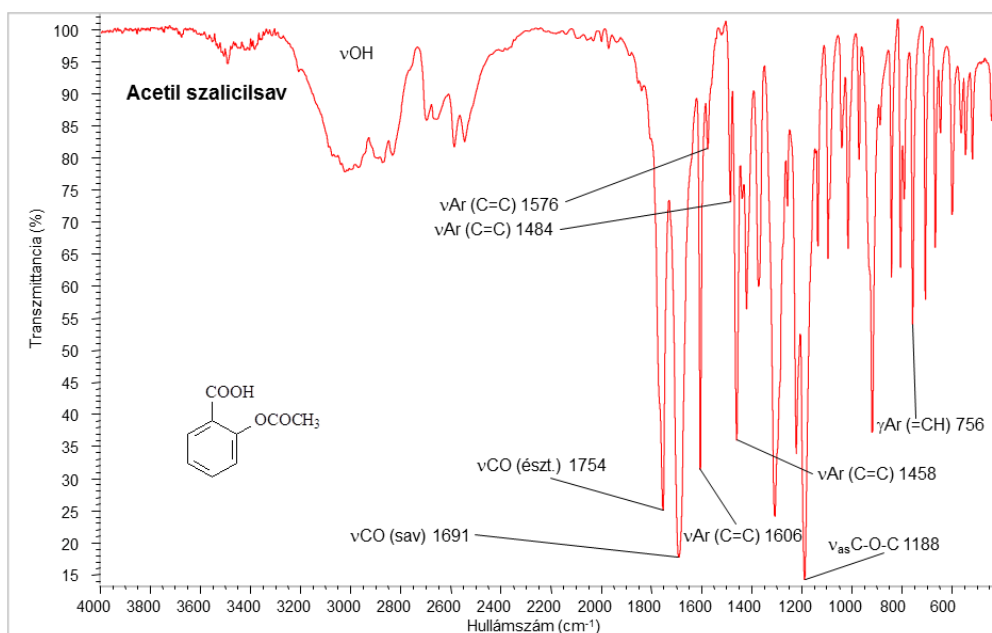


X-6. ábra: Hidrokortizon FT IR spektruma

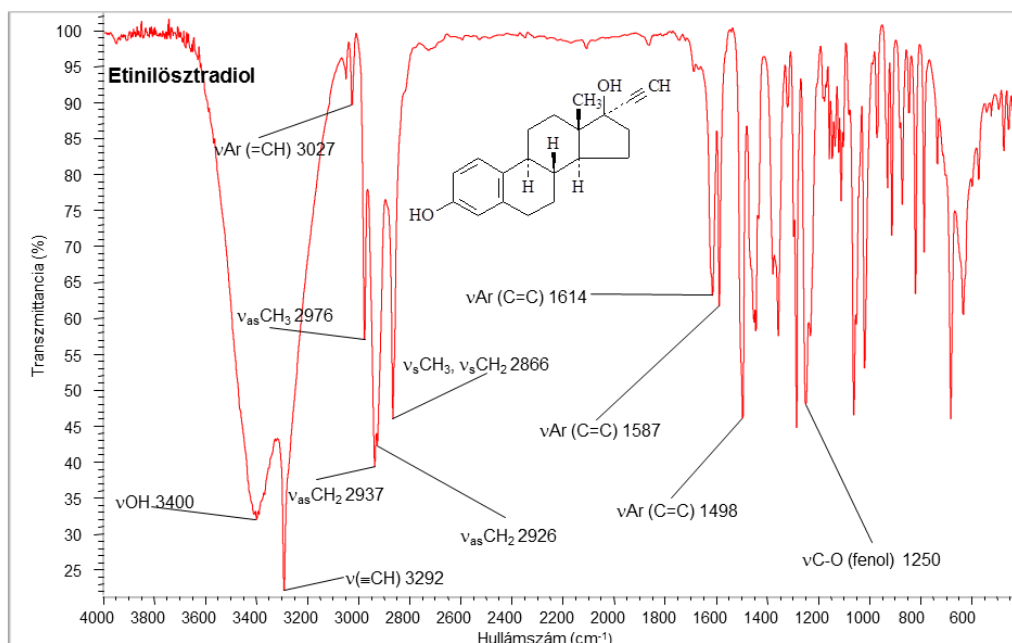


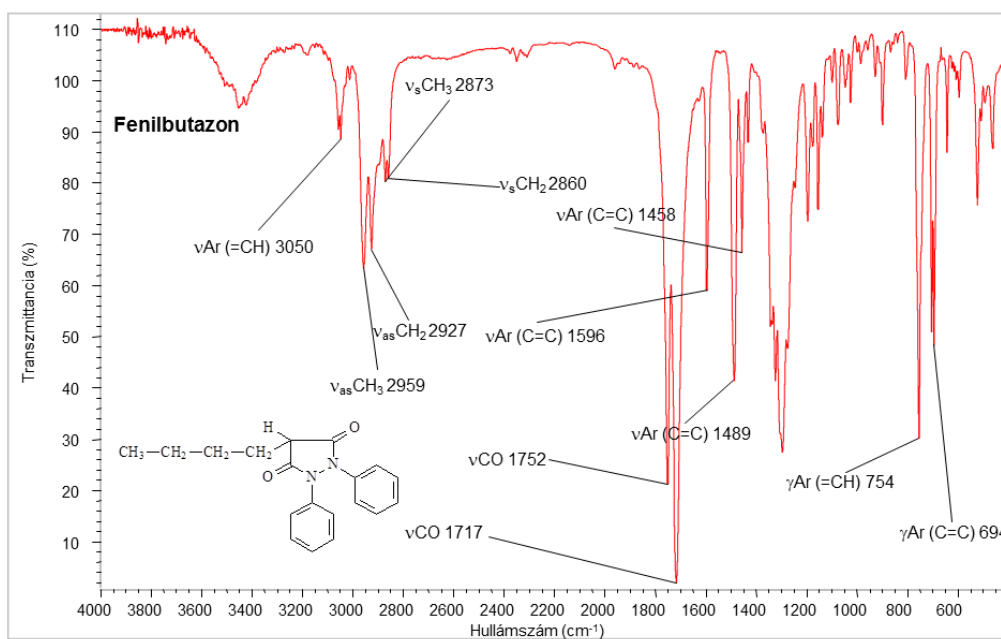
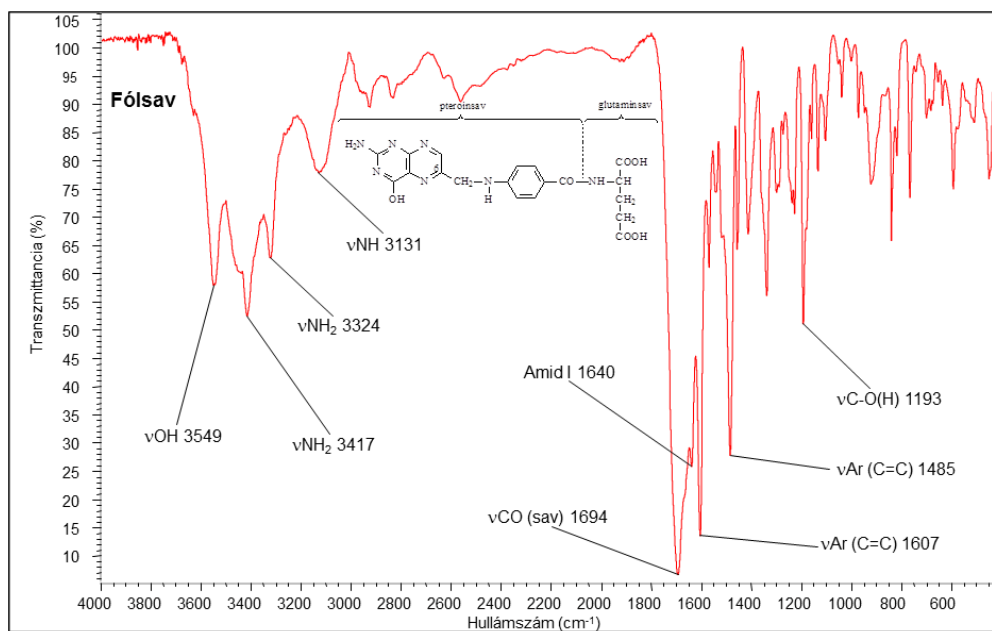
X-7. ábra: Hidrokortizon FT IR spektruma**X.1.2 Spektrumgyűjtemény (oktatói verzió)****X-8. ábra:** Szalicilsav FT IR spektruma

X-9. ábra: Acetilszalicilsav FT IR spektruma

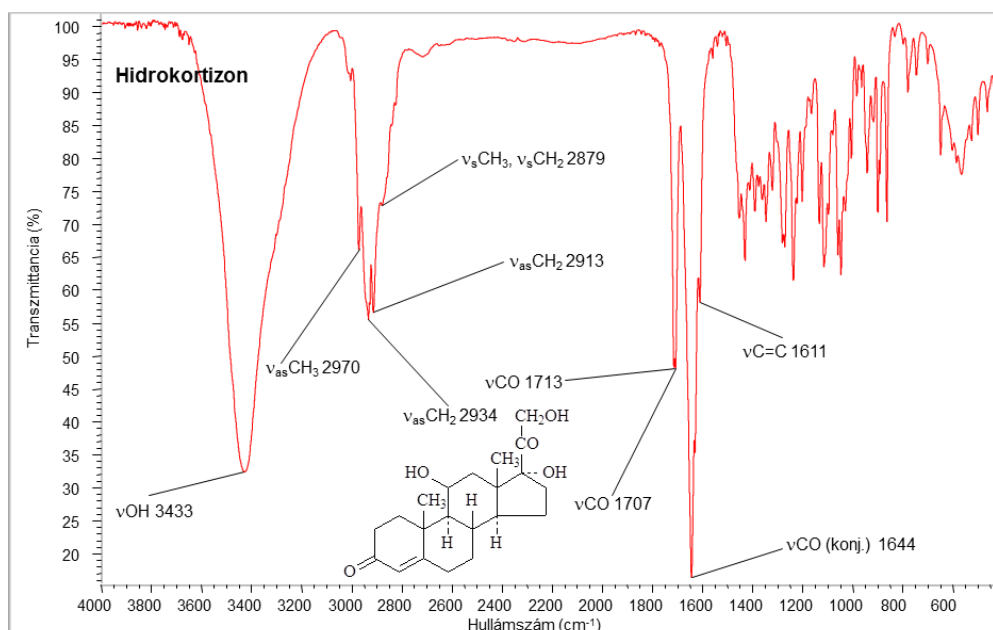


X-10. ábra: Etilösztadiol FT IR spektruma



X-11. ábra: Fenilbutazon FT IR spektruma**X-12. ábra:** Folsav FT IR spektruma

X-13. ábra: Hidrokortizon FT IR spektruma



X-14. ábra: Szulfadimidin FT IR spektruma

