



Министерство здравоохранения Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

Утверждено решением ученого совета
Протокол № 1 от 01.09.2023 г.

Фонд оценочных средств по дисциплине	«Хроматографические методы в фармацевтическом анализе»
Образовательная программа	Основная профессиональная образовательная программа высшего образования - программа специалитета по специальности 33.05.01 Фармация
Квалификация	Провизор
Форма обучения	Очная

Разработчик (и): кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии

ИОФ	Ученая степень, ученое звание	Место работы (организация)	Должность
И.В. Черных	д.б.н. доцент	ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России	Заведующий кафедрой

Рецензент (ы):

ИОФ	Ученая степень, ученое звание	Место работы (организация)	Должность
А.Н. Николашкин	к.ф.н. доцент	ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России	Заведующий кафедрой фармацевтической технологии
Д.А. Кузнецов	д.ф.н., доцент	ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России	Доцент кафедры управления и экономики фармации

Одобрено учебно-методической комиссией по специальности Фармация и Промышленная фармация

Протокол № 11 от 26.06.2023г.

Одобрено учебно-методическим советом.

Протокол № 10 от 27.06.2023г.

**Фонды оценочных средств
для проверки уровня сформированности компетенций (части компетенций)
по итогам освоения дисциплины**

1. Оценочные средства для текущего контроля успеваемости.

- Для текущего контроля успеваемости используются следующие оценочные средства:
- контрольные вопросы для собеседования
 - контрольные работы

Примеры контрольных вопросов для собеседования

Вопрос 1.

Приведите классификацию хроматографических методов анализа, используемых в фармацевтическом анализе.

Ответ 1.

На основе различий в механизмах разделения смеси веществ, хроматографические методы можно разделить на:

1. Эксклюзионную
 - а) по размеру частиц веществ смеси
 - б) по заряду частиц веществ смеси
2. Адсорбционную. разделение
 - а) обращенно фазное (RP) (разделение по гидрофобности): ПФ (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др. обычно с добавлением буферных растворов, все категории "Для ВЭЖХ") полярнее, чем НПФ (силикагели или синтетические вещества с привитыми группами C4, C8, C18 и др.)
 - Ион-парная хроматография – разновидность RP; добавление в ПФ высокогидрофобных органических веществ с гидрофильными ионогенными частями, которые адсорбируются на НПФ, а полярную часть оставляют наружу, удерживая т.о. ионизированные кислоты или основания: для разделения оснований – алкилсульфаты натрия, для разделения кислот соли тетраалкиламмония (тетрабутиламмония фосфат, цетилтриметиламмония бромид и др.
 - б) нормально фазное (NP) (разделение по полярности, т.е. по величине дипольного момента): НПФ (силикагель или силикагель с привитыми NH₂- или CN-группами и др.) полярнее, чем ПФ (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.)
 - в) ионная (НПФ – катионит или анионит обычно сополимеры стирола и дивинилбензола с привитыми ионообменными группами, либо силикагели с привитыми ионообменными группами; вещества разделяются по заряду). Сорбенты с группами: —NH₃⁺, —R₃N⁺, —R₂NH⁺, —RH₂N⁺ и др. используются для разделения анионов (аниониты), а сорбенты с группами: —SO₃⁻, —RSO₃⁻, —COOH, —PO₃⁻ и др. для разделения катионов (катиониты).
 - г) с переносом заряда
 - д) лигандообменная
 - е) хиральная

Вопрос 2.

Приведите основные типы детекторов в ВЭЖХ.

Ответ 2.

1. Спектрофотометрические

В процессе элюирования веществ в специально сконструированной микрокювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны.

2. Флуориметрические (чувствительность на 3 порядка выше)

Применяется для определения флуоресцирующих соединений или не флуоресцирующих соединений в виде их флуоресцирующих производных.

3. Рефрактометрические (рефрактометры)

Минусы: термочувствительность анализа, низкая чувствительность, только изократический режим; можно анализировать, например, углеводы.

4. Электрохимические (кондуктометрические, амперометрические, кулонометрические и др.)

Амперометрический детектор применяют для определения электроактивных соединений, которые могут быть окислены или восстановлены на поверхности твердого электрода. Аналитическим сигналом является величина тока окисления или восстановления. В ячейке детектора имеется два электрода – рабочий (стеклоуглеродный или графитовый, платиновый) и электрод сравнения (хлорсеребряный или стальной). К электродам прикладывается рабочий потенциал, величина которого зависит от природы определяемых соединений.

Кондуктометрический детектор используют для детектирования анионов и катионов в ионной хроматографии. Принцип его работы основан на измерении электропроводности подвижной фазы в процессе элюирования вещества.

5. Масс-спектрометрический

Измерение отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации представляющих интерес компонентов пробы в вакууме.

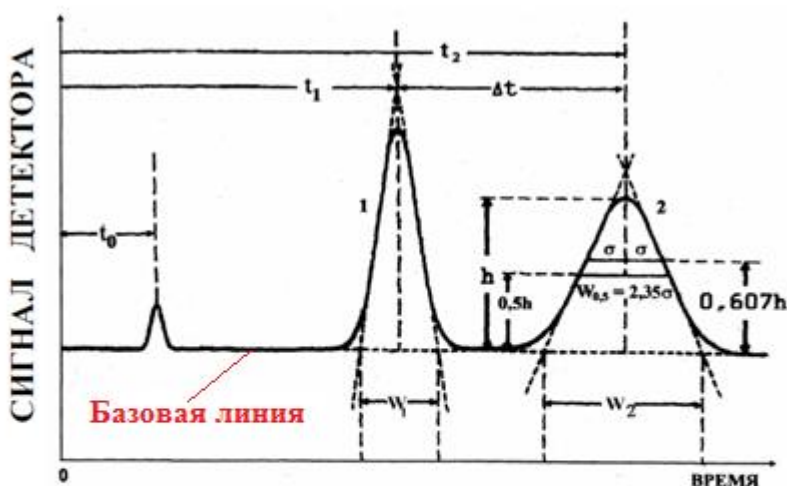
Вопрос 3.

Как производится обработка хроматограмм?

Ответ 3.

Графическим представлением результата разделения является хроматограмма – графическая зависимость сигнала детектора от времени элюирования.

Пик – кривая, в идеале приближающаяся к кривой гауссова распределения, которая описывает постепенное нарастание концентрации вещества и последующее ее уменьшение.



Хроматограмма и основные хроматографические параметры
1 и 2 – пики соединений 1 и 2; t_1 и t_2 – соответствующие времена удерживания; t_0 – время удерживания несорбирующегося компонента; W_1 и W_2 – ширина пиков у основания; $W_{0,5}$ – ширина пика на половине его высоты (предполагается гауссова форма пиков)

1. Время удерживания пика и объем удерживания
- время выхода целевого вещества от момента инъекции; объем ПФ, прошедший через колонку до выхода целевого вещества

2. Исправленное время удерживания
- разница между временем выхода целевого вещества и временем выхода совершенно не удерживаемого вещества.

3. Фактор удерживания
- отношение времени удерживания целевого вещества к нулевому времени. Самая важная характеристика удерживания аналита, зависящая только от ПФ и НПФ.

5. Площадь/высота пика – параметры, прямо пропорциональные концентрации вещества в пробе

6. Степень разделения пиков (коэффициент разделения) аналита и соэкстрактивных веществ (разрешение, resolution), как:

$$R=2*(t_{R(1)}-t_{R(2)})/(w_1+w_2), \text{ где}$$

$t_{R(1)}$ и $t_{R(2)}$ - времена удерживания разделяемых пиков

w_1 и w_2 - их ширина на уровне базовой линии.

Значение $R \geq 1,5$ в Американской и Британской фармакопеях приведено как достаточное для пиков, не сильно различающихся по высоте и по форме, близких к гауссовой. В других случаях значение R должно превышать 2. Значение $R < 1,2$ считается неоправданным.



7. Симметричность пика

$$A_s = W_{0,05} / 2d$$

$W_{0,05}$ – ширина пика на 1/20 его высоты;

d – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика, и передней границей пика на 1/20 его высоты:

Значение A_s , равное 1,0, означает полную симметрию. Если $A_s > 1,0$, пик имеет растянутый задний фронт («хвост»); если $A_s < 1,0$, пик имеет растянутый передний фронт (допустимые значения 0,8–1,5).

8. Эффективность процесса (число теоретических тарелок – platenumber) норма 80–230 тыс. ТТ/метр:

характеризует качество колонки (размер частиц адсорбента, качество его изготовления, качество упаковки колонки). Зависит также от скорости потока ПФ.

$$N = 5,545 * (t_R / W_{1/2})^2$$

$W_{1/2}$ – ширина пика на половине его высоты, мин

t_R – время удерживания пика

Высота, эквивалентная теоретической тарелке (HETP – height equivalent to theoretical plate):

$$H = L / N$$

L-длина колонки, мм

9. Отношение пик/впадина (p/v) приведено в ФС

- характеристика, используемая в качестве критерия пригодности хроматографической системы в испытании на родственные примеси, когда разделение двух пиков до базовой линии не достигнуто:

$$p/v = H_p/H_v$$

где: H_p высота меньшего пика относительно экстраполированной базовой линии; H_v высота над экстраполированной базовой линией наиболее низкой точки кривой, разделяющей меньший и больший пики.

Критерии оценки при собеседовании

Оценка «отлично» выставляется студенту, если он глубоко и прочно усвоил программный материал, исчерпывающе, последовательно, четко и логически стройно его излагает, умеет тесно увязывать теорию с практикой, свободно справляется с задачами, вопросами и другими видами применения знаний, причем не затрудняется с ответом при видоизменении заданий, использует в ответе материал монографической литературы, правильно обосновывает принятое решение, владеет разносторонними навыками и приемами выполнения практических задач.

Оценка "хорошо" выставляется студенту, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, не допуская существенных неточностей в ответе на вопрос, правильно применяет теоретические положения при решении практических вопросов и задач, владеет необходимыми навыками и приемами их выполнения.

Оценка "удовлетворительно" выставляется студенту, если он имеет знания только основного материала, но не усвоил его деталей, допускает неточности, недостаточно правильные формулировки, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, испытывает затруднения при выполнении практических работ.

Оценка "неудовлетворительно" выставляется студенту, который не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, неуверенно, с большими затруднениями выполняет практические работы. Как правило, оценка "неудовлетворительно" ставится студентам, которые не могут продолжить обучение без дополнительных занятий по соответствующей дисциплине.

Примеры заданий текущего контроля

Контрольная работа по теме Теоретические основы ВЭЖХ

Билет №1

1. Метод внешнего стандарта в количественном хроматографическом анализе.
2. Прецизионность хроматографической методики.

Критерии оценки текущего контроля

Оценка «отлично» выставляется студенту, если он глубоко и прочно усвоил программный материал, исчерпывающе, последовательно, четко и логически стройно его излагает, умеет тесно увязывать теорию с практикой, свободно справляется с задачами, вопросами и другими видами применения знаний, причем не затрудняется с ответом при видоизменении заданий, использует в ответе материал монографической литературы, правильно обосновывает принятое решение, владеет разносторонними навыками и приемами выполнения практических задач.

Оценка «хорошо» выставляется студенту, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, не допуская существенных неточностей в ответе на вопрос,

правильно применяет теоретические положения при решении практических вопросов и задач, владеет необходимыми навыками и приемами их выполнения.

Оценка «удовлетворительно» выставляется студенту, если он имеет знания только основного материала, но не усвоил его деталей, допускает неточности, недостаточно правильные формулировки, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, испытывает затруднения при выполнении практических работ.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется студенту, который не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, неуверенно, с большими затруднениями выполняет практические работы. Как правило, оценка "неудовлетворительно" ставится студентам, которые не могут продолжить обучение без дополнительных занятий по соответствующей дисциплине.

2. Оценочные средства для промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины

Форма промежуточной аттестации в 7 семестре – зачет Порядок проведения промежуточной аттестации

Процедура проведения и оценивания зачета

Зачет проводится по билетам в форме устного собеседования. Студенту достается билет путем собственного случайного выбора и предоставляется 45 минут на подготовку. Защита готового решения происходит в виде собеседования, на что отводится 20 минут.

Зачетный билет содержит 2 вопроса (1 теоретический и 1 практический).

Критерии выставления оценок:

«Зачтено» - выставляется при условии, если студент показывает хорошие знания изученного учебного материала; самостоятельно, логично и последовательно излагает и интерпретирует материалы учебного курса; полностью раскрывает смысл предлагаемого вопроса; владеет основными терминами и понятиями изученного курса; показывает умение переложить теоретические знания на предполагаемый практический опыт.

«Не зачтено» - выставляется при наличии серьезных упущений в процессе изложения учебного материала; в случае отсутствия знаний основных понятий и определений курса или присутствии большого количества ошибок при интерпретации основных определений; если студент показывает значительные затруднения при ответе на предложенные основные и дополнительные вопросы; при условии отсутствия ответа на основной и дополнительный вопросы.

Фонды оценочных средств для проверки уровня сформированности компетенций для промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины Хроматографические методы в фармацевтическом анализе

ОПК-1 – Способен использовать основные биологические, физико-химические, химические, математические методы для разработки, исследований и экспертизы лекарственных средств, изготовления лекарственных препаратов

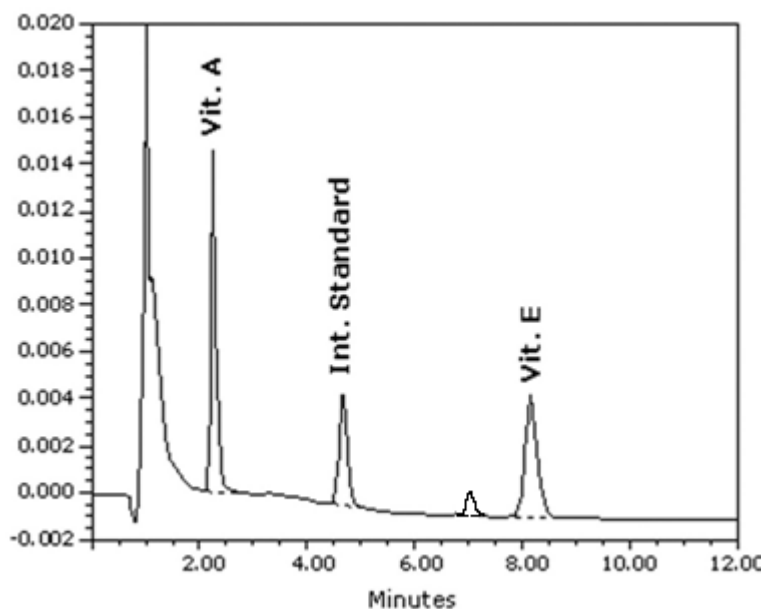
1) Типовые задания для оценивания результатов сформированности компетенции на уровне «Знать» (воспроизводить и объяснять учебный материал с требуемой степенью научной точности и полноты):

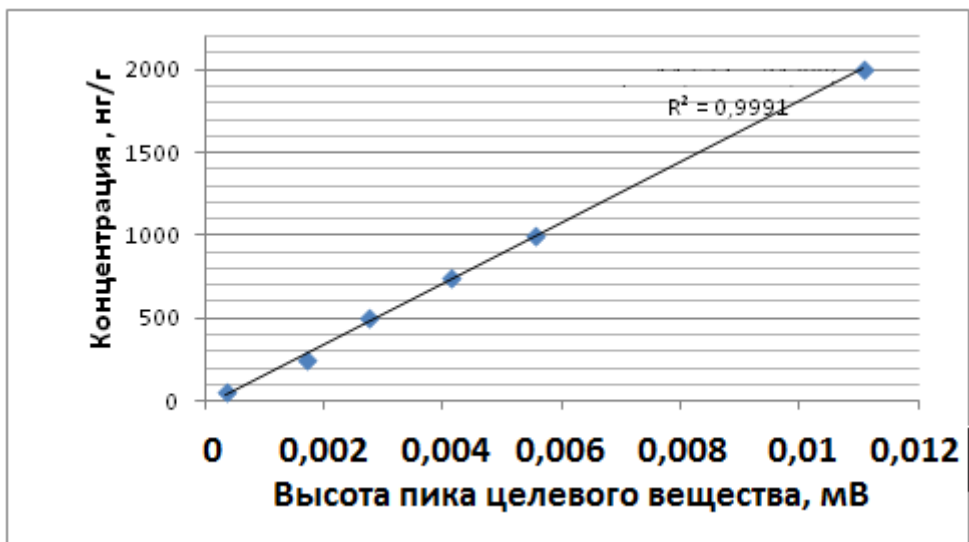
1. Хроматография, определение, типы.
2. ВЭЖХ, основные типы.
3. Основные виды разделения смеси в ВЭЖХ.
4. Обращенно-фазная и нормально-фазная ВЭЖХ, различия, особенности.

5. Основное оборудование, используемое в ВЭЖХ.
6. Типы подвижных фаз, используемых в ВЭЖХ.
7. Типы неподвижных фаз, используемых в ВЭЖХ.
8. Пробоподготовка в ВЭЖХ.
9. Основные типы детекторов, применяемых в ВЭЖХ.
10. Принцип работы УФ-спектрофотометрического детектора.
11. Принцип работы флуориметрического детектора.
12. Области применения ВЭЖХ в фармацевтическом анализе.
13. Хроматограмма и основные хроматографические параметры.
14. Степень разделения пиков.
15. Эффективность хроматографической колонки.
16. Метод нормирования в количественном ВЭЖХ анализе.
17. Метод внешнего стандарта в количественном ВЭЖХ анализе.
18. Метод внутреннего стандарта в количественном ВЭЖХ анализе.
19. Метод стандартных добавок в количественном ВЭЖХ анализе.
20. Основные валидационные характеристики ВЭЖХ.
21. Чувствительность ВЭЖХ методики.
22. Линейность ВЭЖХ методики.
23. Специфичность и устойчивость ВЭЖХ методики.
24. Точность и прецизионность ВЭЖХ методики.
25. Повторяемость, производительность и степень экстракции в ВЭЖХ.

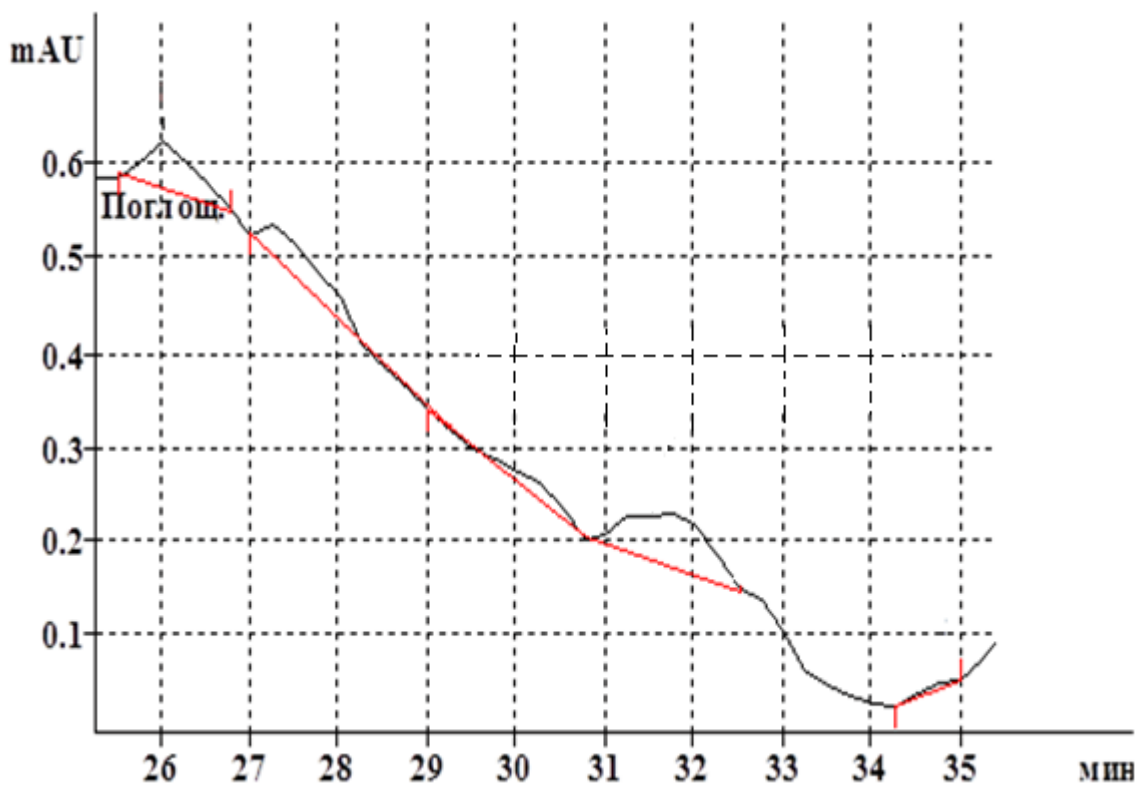
2) Типовые задания для оценивания результатов сформированности компетенции на уровне «Уметь» (решать типичные задачи на основе воспроизведения стандартных алгоритмов решения):

1. Рассчитайте основные параметры хроматограммы (скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин): время удерживания и объем удерживания витамина Е, исправленное время удерживания, объем удерживания, коэффициент разделения с ближайшим пиком соэкстрактивного вещества, концентрацию аналита:





2. Рассчитайте чувствительность хроматографической методики (предел детектирования и предел количественного определения). При каком условии рассчитанное значение предела количественного определения будет верным?

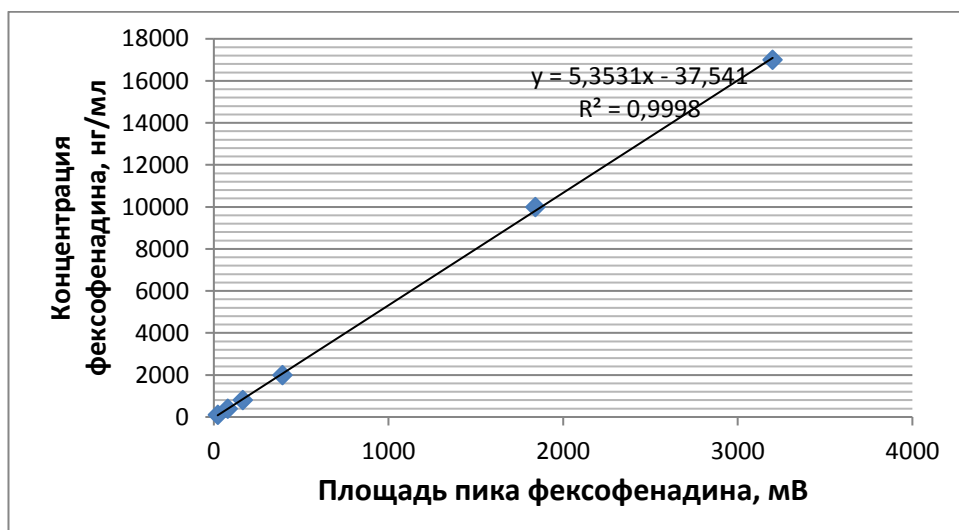
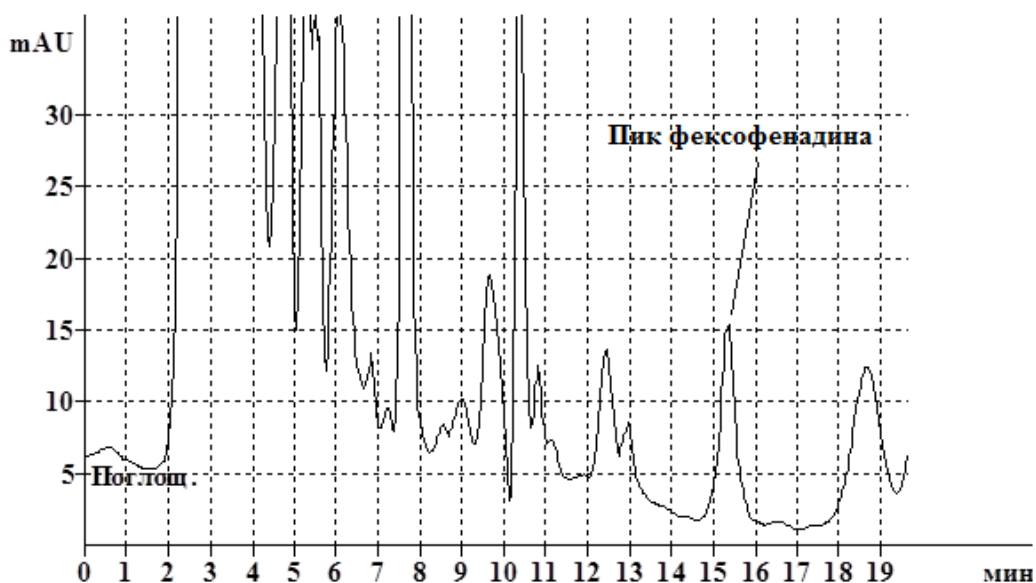


$$C = 64,8 \cdot h + 37,6$$

C – концентрация аналита, нг/мл

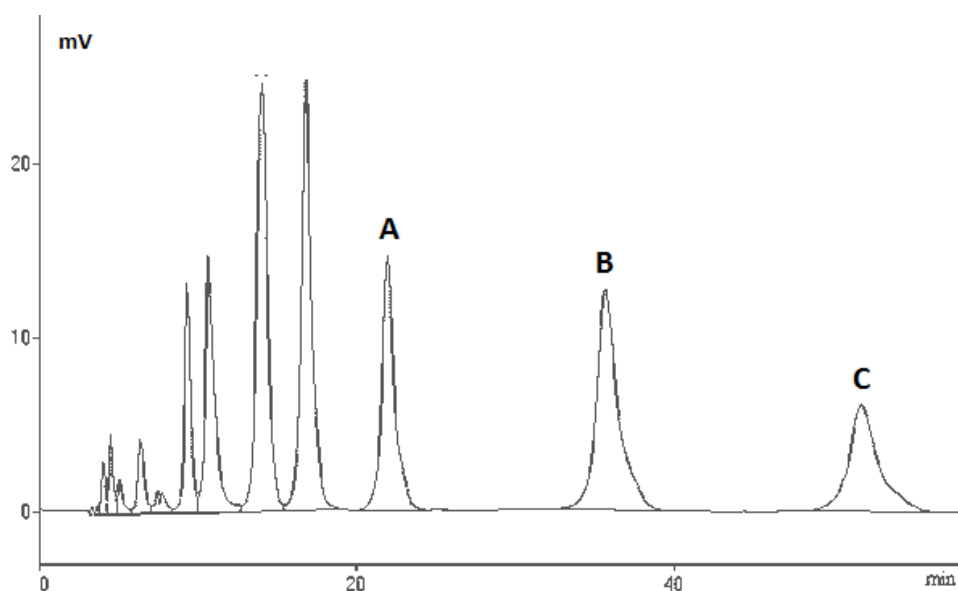
h – высота максимального пика

3. Рассчитайте основные параметры хроматограммы (скорость потока подвижной фазы 0,8 мл/мин): время удерживания и объем удерживания фексофенадина, исправленное время удерживания, коэффициент разделения с ближайшим пиком соэкстрактивного вещества, концентрацию аналита:

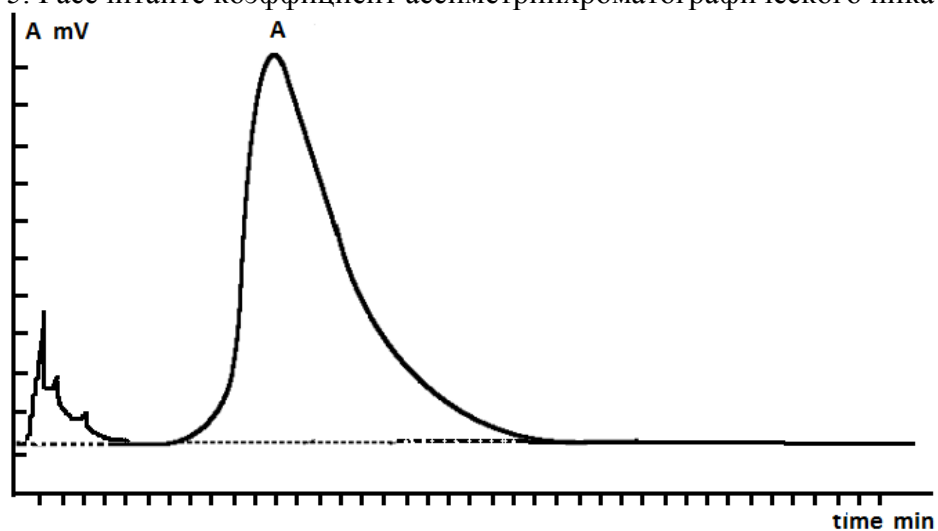


При решении данных заданий студент показывает умения решать типовые задачи по стандартным алгоритмам решения, объяснять факты, правила, принципы, выдвигает предположение о дальнейшем ходе химических превращений, уверенно, грамотно и самостоятельно излагать основные закономерности протекания химических реакций с участием органических веществ, решать нестандартные задачи, прогнозировать химическое поведение различных органических соединений.

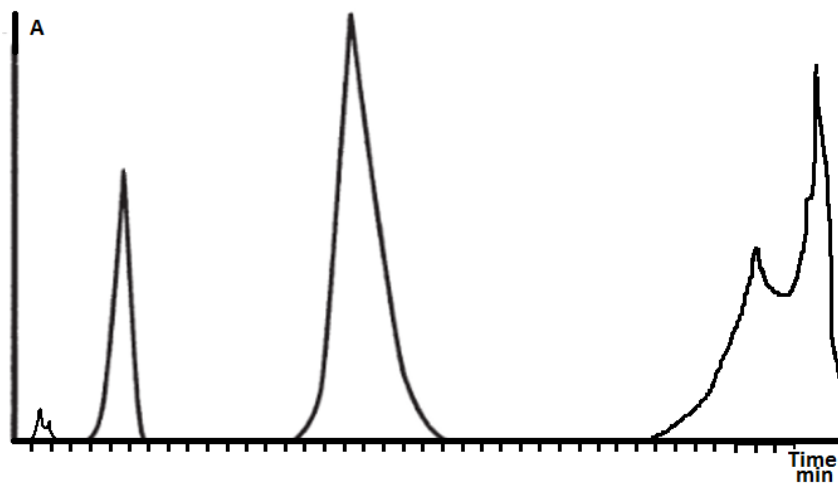
4. Вычислите эффективность хроматографической системы и ВЭТТ для пиков А, В и С (хроматографическая колонка длиной 250 мм), сделайте вывод о влиянии времени удерживания на эффективность разделения смеси:



5. Рассчитайте коэффициент асимметрии хроматографического пика А:



6. Найдите пик вещества с наибольшей молекулярной массой (наибольшим размером молекулы) при его эксклюзионном хроматографировании определите его основные характеристики: время удерживания, коэффициент разделения с ближайшим пиком и селективность:



3) Типовые задания для оценивания результатов сформированности компетенции на

уровне «Владеть» (решать усложненные задачи на основе приобретенных знаний, умений и навыков, с их применением в нетипичных ситуациях, формируется в процессе практической деятельности).

1. Рассчитайте среднюю внутрицикловую точность и прецизионность хроматографической методики:



Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
100	85,06					
	86,24					
	86,39					
	87,00					
	82,35					
400	376,92					
	396,13					
	397,61					
	400,16					
	386,58					
2000	1980,92					
	1982,71					
	1891,99					
	1951,61					
	1817,32					
10000	9379,83					
	10323,44					
	10257,86					
	10764,45					
	10469,37					

2. Рассчитайте межцикловую точность и прецизионность хроматографической методики:

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
50						
500						
750						
1000						

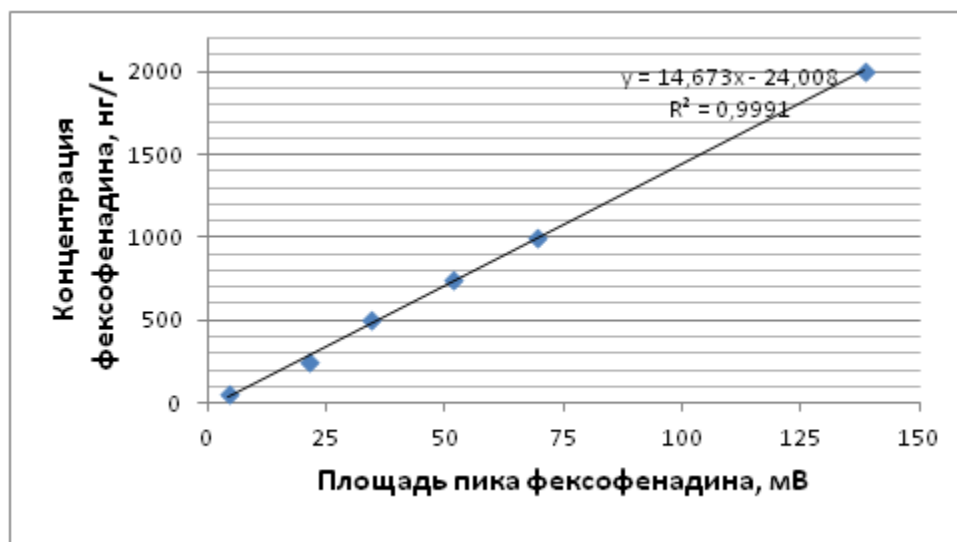


Рисунок 1. Калибровочный график №1 зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс от площади его хроматографического пика

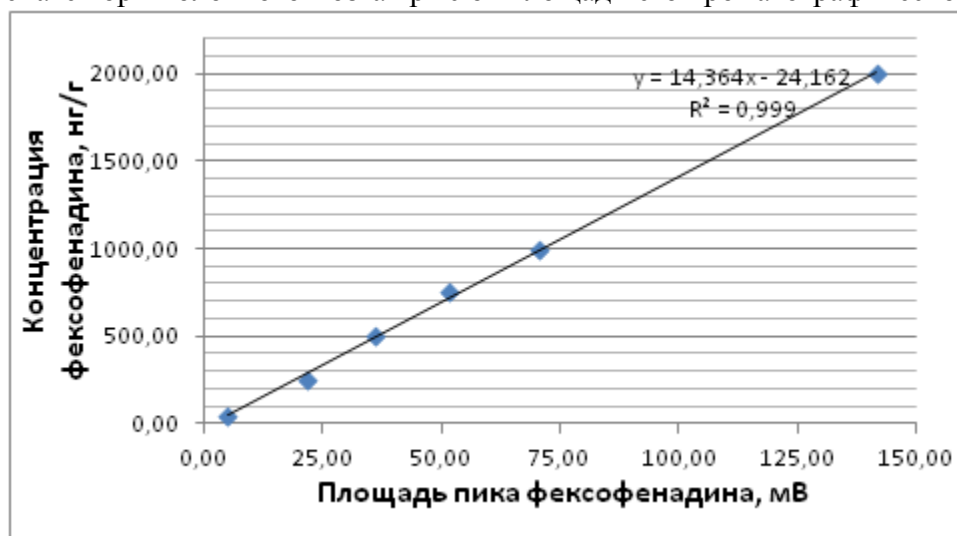


Рисунок 2. Калибровочный график №2 зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс от площади его хроматографического пика

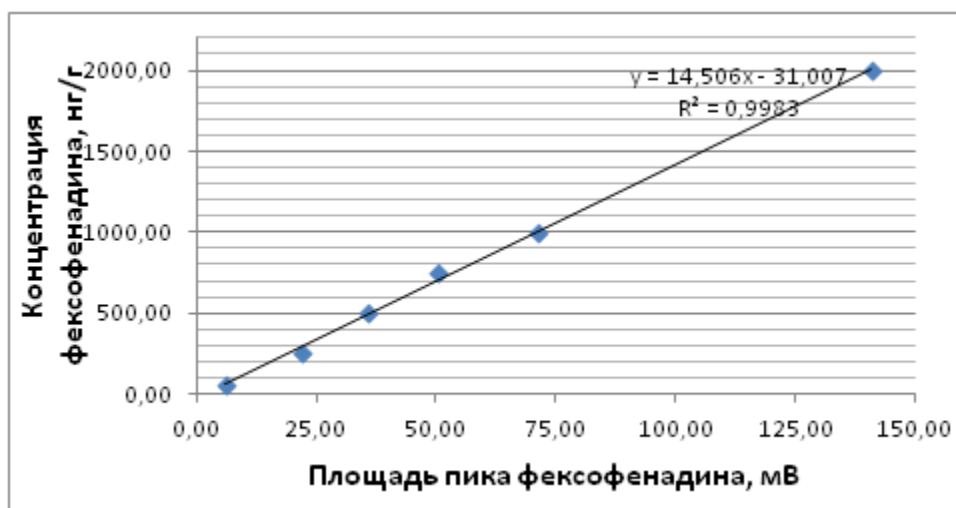


Рисунок 3. Калибровочный график №3 зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс от площади его хроматографического пика

Значения площадей пиков:

- 50 нг/г – 5,0
- 500 нг/г – 36,0
- 750 нг/г – 51,8
- 1000 нг/г – 70,7

3. Рассчитайте отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений

Концентрация номинальная, нг/г	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %
50						
250						
500						
750						
1000						
2000						

Площади пиков, мВ	Номинальная концентрация, нг/г
4,5	50
21,26	250
34,38	500
51,93	750
69,49	1000
138,35	2000
5,00	50,00
21,66	250,00
35,96	500,00
51,80	750,00
70,72	1000,00
141,73	2000,00
6,10	50,00
21,86	250,00
35,98	500,00
50,31	750,00
71,36	1000,00
140,88	2000,00

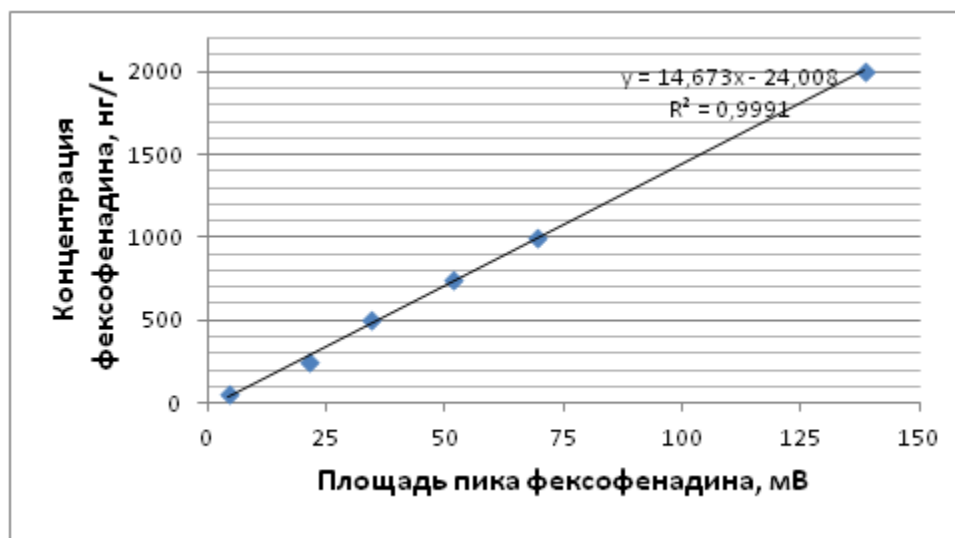


Рисунок 1. Калибровочный график №1 зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс от площади его хроматографического пика

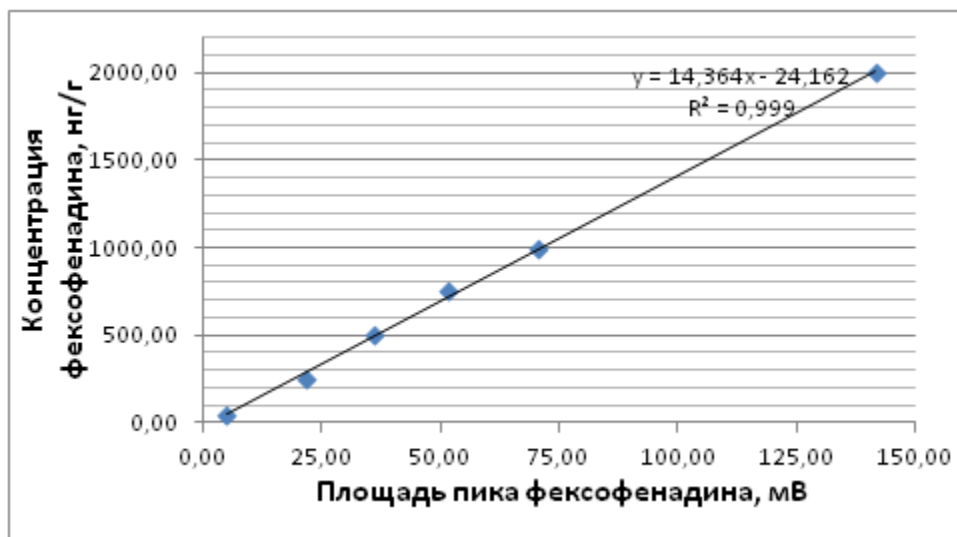


Рисунок 2. Калибровочный график №2 зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс от площади его хроматографического пика

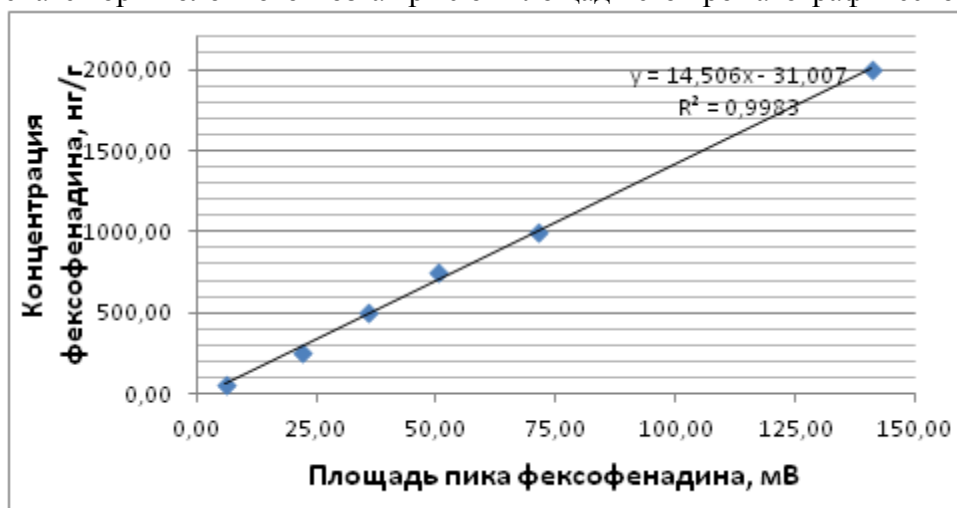


Рисунок 3. Калибровочный график №3 зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс от площади его хроматографического пика

При решении данных заданий студент должен владеть методами оценки и навыками обоснования методики органического синтеза и методов очистки и идентификации целевого продукта.