

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Иркутский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра фармацевтической и токсикологической химии

Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ
ХРОМАТОГРАФИЯ.
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ. ПРАКТИЧЕСКОЕ
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА**

Учебное пособие

Иркутск
ИГМУ
2024

УДК 615-075.524(075.8)

ББК 53.64.1я73

И 44

Рекомендовано ЦКМС ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России в качестве учебного пособия по дисциплине «Фармацевтическая химия» для студентов, обучающихся по образовательной программе высшего образования – программе специалитета по специальности 33.05.01

Фармация

(протокол №3 от 29.02.2024)

Авторы:

Е. А. Илларионова – д-р хим. наук, профессор, зав. каф. фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

И. П. Сыроватский – канд. фарм. наук, доцент, доцент каф. фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

Рецензенты:

А. А. Скрипко – канд. фарм. наук, доцент, зав. каф. управления и экономики фармации ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

И. А. Мурашкина – канд. фарм. наук, доцент, доцент каф. фармакогнозии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

Илларионова, Е. А.

И 44 Высокоэффективная жидкостная хроматография. Теоретические основы. Практическое применение метода : учебное пособие / Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский ; Иркутский государственный медицинский университет, Кафедра фармацевтической и токсикологической химии. – Иркутск : ИГМУ, 2024. – 59 с. – Текст : непосредственный.

Учебное пособие охватывает раздел фармацевтической химии, касающийся хроматографических методов и их использования в фармацевтическом анализе. Рассмотрены основы жидкостной хроматографии, представлен материал по использованию высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных средств. Даны сравнительные характеристики хроматографических методов анализа, их преимущества и недостатки. В конце учебного пособия приведены тестовые задания для самоконтроля знаний студентов, полученных при изучении материала.

Пособие предназначено для студентов, обучающихся по программе специалитета по специальности Фармации при изучении дисциплины «Фармацевтической химии».

УДК 616-073.524(075.8)

ББК 53.64.1я73

© Илларионова Е. А., Сыроватский И. П., 2024

© ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОСНОВЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	6
2. ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	9
3. АДсорбЦИОННАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	11
3.1. Полярные адсорбенты и их свойства	11
3.2. Выбор элюента для адсорбционной жидкостной хроматографии	14
3.3. Влияние структуры вещества пробы на выбор условий хроматографирования	16
4. РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	17
4.1. Материалы, используемые как носители в распределительной жидкостной хроматографии	18
4.2. Подвижные фазы для распределительной жидкостной хроматографии	20
4.3. Нанесение неподвижной фазы на носитель в распределительной жидкостной хроматографии	22
4.4. Свойства разделительной колонки в распределительной жидкостной хроматографии	23
4.5. Применение распределительной ВЭЖХ	24
5. ОБРАЩЕНО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	25
6. ИОНООБМЕННАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	26
7. АППАРАТУРА ДЛЯ ВЭЖХ	30
7.1. Емкость для элюента	33
7.2. Насосы	34
7.3. Демпфирование пульсаций	34
7.4. Ввод пробы	34
7.5. Разделительная колонка	34
7.6. Термостатирование	35
7.7. Сорбенты	35
7.8. Подвижная фаза	38
7.9. Детекторы	39
7.10. Регистрирующее устройство	42
8. ОЦЕНКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КРИВЫХ	43
9. ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ	48
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ	52
ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ	57
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	58

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

ОФХ – обращено-фазовая хроматография

НФ – неподвижная фаза

ПФ – подвижная фаза

ППМ – поверхностно-пористые материалы

ПЖФ – поверхностно-жидкая фаза

УФ – ультрафиолетовая область

ХТА – химико-токсикологический анализ

ВВЕДЕНИЕ

Выделение индивидуальных химических соединений из смесей различного происхождения всегда было и остается одной из основных задач химии. Прежде чем начать подробное химическое исследование какого-либо вещества, необходимо выделить его в возможно более чистом виде и в достаточном количестве. В природных условиях вещества находятся главным образом в смесях. Исходные смеси веществ могут быть чрезвычайно сложными по составу. Поэтому разделение смесей на отдельные компоненты является одной из наиболее привычных работ в химии.

Поэтому постоянно велись и ведутся поиски новых, более совершенных методов разделения. В частности, различная адсорбционная способность даже очень близких по структуре соединений используется в адсорбционной хроматографии. Различная растворимость газов в соответствующей жидкости и различная адсорбция их твердыми носителями использованы при разработке методов газовой хроматографии. Наконец, самое новое направление, в котором используются специфические биохимические воздействия, позволит проводить избирательное выделение веществ посредством аффинной хроматографии.

Без методов разделения немыслима работа в обширных отраслях химии. Методы противоточного распределения очень облегчили изучение антибиотиков, полипептидов, позволили разделить многочисленные синтетические смеси. Без адсорбционной хроматографии нельзя представить современную химию природных соединений (витаминов, стероидных гормонов). Современные методы разделения используются не только в препаративных, но и в аналитических целях. Жидкостная хроматография – один из методов контроля, применяемый в фармацевтическом анализе. В настоящее время точность и скорость разделения методом жидкостной хроматографии достигла высокого уровня. Значение этого метода очень велико. Жидкостную хроматографию широко используется в исследовании и производстве лекарственных препаратов, в изучении метаболизма веществ в

организме человека, она позволяет решить вопросы фармацевтического анализа.

Принято считать, что высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) сформировалась в конце 60-х годов в процессе совершенствования традиционной жидкостной колоночной хроматографии низкого давления: уменьшение размера частиц сорбента (до 10 мкм и меньше) и увеличение плотности набивки колонок, с целью достижения большей эффективности привело к значительному усложнению аппаратного оформления, что и определило ВЭЖХ как самостоятельный аналитический метод.

1. ОСНОВЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Основы метода, получившего впоследствии название высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), были заложены в начале 60-х годов. Именно в это время были:

1) разработаны представления о кинетике и термодинамике процессов разделения колонок, характеризующихся высокой селективностью и эффективностью;

2) создано оборудование, позволившее осуществить непрерывный и автоматизированный процесс хроматографии.

ВЭЖХ является достаточно гибким методом, т. е. разнообразным по масштабам разделения: микроколоночный, аналитический, полупрепаративный, препаративный, крупномасштабно-препаративный. Это делает данный метод универсальным. Что касается препаративных возможностей ВЭЖХ, то они значительно превосходят возможности всех остальных методов.

В течение последних десятилетий наиболее важные для аналитического применения показатели ВЭЖХ – эффективность и скорость разделения, предел обнаружения были улучшены, и в настоящее время ВЭЖХ можно использовать как метод для работы с очень малыми пробами.

По механизму взаимодействия анализируемого вещества с хроматографической системой современную ВЭЖХ подразделяют на ряд вариантов:

- адсорбционную;
- распределительную;
- ионообменную;
- эксклюзионную;
- аффинную и др.

Каждый из этих вариантов в зависимости от особенностей неподвижной фазы имеет ряд градаций, при этом частота их практического применения крайне неравномерна.

В адсорбционной хроматографии разделение веществ происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться с поверхности сорбента с развитой поверхностью, например, силикагеля. В распределительной высокоэффективной жидкостной хроматографии разделение происходит за счет различия коэффициентов распределения разделяемых веществ между неподвижной (как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя) и подвижной фазами.

В зависимости от типа подвижной и неподвижной фазы различают нормально-фазовую и обращенно-фазовую хроматографию. В нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии неподвижная фаза – полярная (чаще всего силикагель или силикагель с привитыми NH_2 - или CN -группами и др.), а подвижная фаза – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т. д.). Удерживание веществ растёт с увеличением их полярности. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность подвижной фазы увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C_8 , и C_{18} .); подвижная фаза – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола,

тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.

В ионообменной хроматографии молекулы веществ смеси, диссоциированные в растворе на катионы и анионы, разделяются при движении через сорбент (катионит или анионит) за счет различной силы взаимодействия определяемых ионов с ионными группами сорбента.

В эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной) хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми из колонки выходят наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор неподвижной фазы, а последними выходят вещества с малыми размерами молекул.

В хиральной хроматографии происходит разделение оптически активных соединений на отдельные энантиомеры. Разделение может осуществляться на хиральных неподвижных фазах или на ахиральных неподвижных фазах с использованием хиральных подвижных фаз.

Существуют и другие варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Часто разделение протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно, в зависимости от типа подвижной и неподвижной фаз, а также природы определяемого соединения.

Благодаря высокому уровню развития экспериментальной техники и инструментального оснащения современная ВЭЖХ позволяет с большой степенью надежности и воспроизводимости решать сложные аналитические задачи. Число лабораторий, использующих ВЭЖХ, постоянно увеличивается, и есть основания считать, что такая тенденция сохранится и в будущем, т. к. ВЭЖХ используется для анализа и разделения различных классов и групп соединений.

Таким образом, достоинствами ВЭЖХ являются:

1) высокая разделительная способность, дающая хорошее разделение многокомпонентной смеси;

2) высокая скорость движения хроматографической зоны, позволяющая проводить анализ в небольшой промежуток времени;

3) проведение хроматографического процесса в мягких условиях, обычно при комнатной температуре.

Последнее достоинство ВЭЖХ выгодно отличает этот метод от газовой хроматографии (ГХ), в которой хроматографический процесс проводится при нагревании. Следовательно, методом ВЭЖХ можно разделять и анализировать и термолабильные вещества.

В настоящее время метод ВЭЖХ широко используется в анализе и разделении лекарственных средств, и поэтому этот метод внесен в Государственную фармакопею и определяется как вариант колоночной жидкостной хроматографии, в которой подвижная фаза – элюент проходит через заполненную сорбентом колонку с большой скоростью за счет значительного давления на входе в хроматографическую колонку. Кроме того, ВЭЖХ является способом разделения, препаративного выделения и проведения количественного и качественного анализа нелетучих термолабильных соединений с малой и большой молекулярной массой.

2. ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Преимущества ВЭЖХ перед ГЖХ:

1. В методе ВЭЖХ отпадают характерные для ГЖХ ограничения по термоустойчивости анализируемых препаратов.

2. Для ВЭЖХ не существенны проблемы летучести анализируемого препарата.

3. В наиболее распространенном методе ВЭЖХ – в варианте распределительной хроматографии с обращенными фазами – появляется

возможность работать с водными растворами. Это позволяет существенно сократить общее время анализа и упростить обработку биологических проб.

4. В большинстве случаев отпадает необходимость в получении производных, удобных для хроматографирования.

5. Практически все методы детектирования в ВЭЖХ являются неразрушающими (вещество при его количественном определении не разрушается). Это позволяет в случае необходимости сочетать аналитическую и препаративную хроматографию, а также собирать разделенные фракции анализируемых веществ для их последующей идентификации с помощью физико-химических методов, в частности, спектральных методов; в некоторых случаях возможно проведение спектрального анализа прямо в ячейке детектора.

6. Методы детектирования в ВЭЖХ обычно более специфические, чем в ГЖХ, что повышает избирательность метода.

Недостатки и особенности метода ВЭЖХ:

1. Существующие методы детектирования не всегда обладают достаточной чувствительностью для определения малых уровней концентрации, особенно в клиническом фармакокинетическом анализе.

2. Некоторые вещества не могут быть детектированы обычно применяемыми в ВЭЖХ фотометрическими методами, если они не поглощают свет в интервале от 190 нм до 380 нм.

3. Методы ВЭЖХ требуют применения органических растворителей, которые, как правило, высоко токсичны и пожароопасны. Кроме того, очистка этих растворителей является трудоемким процессом, а очищенные для целей хроматографии высокого давления спектрально чистые растворители дороги и не всегда доступны.

4. Аппаратура для ВЭЖХ в среднем более дорогая, чем, например, для ГЖХ и более сложная в обслуживании.

5. Наполнители для ВЭЖХ дороже, чем для ГЖХ, а наполнение колонок намного сложнее и может быть выполнено с применением специального дорогостоящего оборудования, имеющегося далеко не во всех лабораториях.

3. АДсорбЦИОННАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Большинство разделений в жидкостной хроматографии основано на адсорбционных эффектах. При этом на разделение влияет взаимодействие адсорбента, пробы и элюента. В основе сорбции на окисных сорбентах лежит специфическое взаимодействие между полярной поверхностью адсорбента и полярными группами адсорбирующихся молекул.

3.1. Полярные адсорбенты и их свойства

Из числа многих разработанных для классической колоночной хроматографии адсорбентов в ВЭЖХ используют практически только силикагель и окись алюминия. На их основе изготавливают либо пористые носители, либо поверхностно-пористые материалы (ППМ). Все эти носители представляют собой типичные окисные полярные адсорбенты чаще всего с одинаковым рядом элюирования. Однако селективность их несколько различается. Так, окись алюминия более чем силикагель пригодна для разделения многоядерных ароматических углеводородов.

Наряду с полярными адсорбентами в настоящее время все большее и большее распространение получают химически модифицированные сорбенты, в частности, для систем с обращенной фазой используют сорбенты, поверхность которых неполярна. Область их применения примерно такая же, как область применения активированного угля в классической колоночной хроматографии. Активированные угли из-за их плохих механических свойств (а также из-за плохой воспроизводимости этих свойств при получении) для ВЭЖХ не пригодны.

Неподвижные неполярные фазы называют «обращенными фазами» (ОФ), поскольку в отличие от обычно хроматографии в этом виде хроматографии неподвижная фаза неполярна и наиболее сильная адсорбция (наибольшее удерживание) происходит из воды. Снижая полярность элюента, например, в результате добавления метанола, можно уменьшить удерживание. Хроматография с «обращенными фазами» впервые была описана Говардом и

Мартином, которые нанесли на силикагель парафиновое масло и н-октан, и, используя водные элюенты, разделили с помощью этой распределительной системы жирные кислоты.

Силикагель – один из наиболее распространенных адсорбентов. Его часто используют в качестве носителя для жидких неподвижных фаз в распределительной хроматографии. Силикагели, в том числе и некоторые пористые стекла, аморфны; их можно получить в очень чистом виде с различными физическими свойствами (удельная поверхность, объем и диаметр пор). В ВЭЖХ применяют главным образом силикагели с относительно большой удельной поверхностью ($> 200 \text{ м}^2/\text{г}$), большим удельным объемом пор ($> 0,7 \text{ мл/г}$) и средним диаметром пор ($80\text{--}150 \text{ \AA}$).

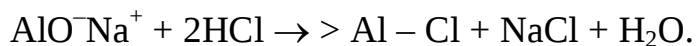
Оксид алюминия, пригодную для хроматографии, получают, удаляя воду из байерита и активируя его затем при температуре $200\text{--}500 \text{ }^\circ\text{C}$. Полученная кристаллическая окись алюминия ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) в процессе нагревания ($900\text{--}1000^\circ\text{C}$) переходит в высокотемпературные формы, которые при температуре $1100 \text{ }^\circ\text{C}$ все переходят в α -окись алюминия. Последняя не обладает уже никакой хроматографической активностью.

Удельная поверхность окиси алюминия составляет $100\text{--}200 \text{ м}^2/\text{г}$ при удельном объеме пор $0,2\text{--}0,3 \text{ мл/г}$, а средний диаметр пор равен $100\text{--}200 \text{ \AA}$.

Оксид алюминия относят к полярным адсорбентам. По хроматографическим свойствам она очень напоминает силикагель, но молекулы насыщенных веществ удерживаются на ней, как правило, сильнее. Многоядерные ароматические соединения на окиси алюминия разделить легче, чем на силикагеле. Осложнения, обусловленные необратимой адсорбцией (хемосорбцией) при разделении на окиси алюминия наблюдаются чаще, чем на силикагеле.

В окиси алюминия, полученной из байерита, сохраняется остаточное количество байерита в форме алюмината натрия. рН водных соединений такой окиси алюминия равен 9, и поэтому ее называют «основной». В полярных средах, особенно в воде, поверхностные центры алюмината натрия могут

действовать как катионообменные центры, что может приводить к необратимой адсорбции катионных соединений, например, к размножению чувствительных к щелочам соединений. При обработке основной окиси алюминия сильными кислотами, например, соляной, протекает следующая реакция:



Обработанная окись алюминия дает водную суспензию с pH 3,0, и поэтому ее называют «кислой» солью алюминия; она является анионным обменником. При осторожной нейтрализации получают «нейтральную» окись алюминия, не проявляющую ни катионо-, ни анионообменных свойств.

Полиамиды пригодны для разделения соединений, способных образовывать водородные связи (фенолов, хинонов, сахаров и т. д.). Величина сорбции зависит от числа пептидных группировок в полимере (например, нейлон-4, нейлон-6 и нейлон-11). Иногда, чтобы уменьшить необратимую сорбцию, приходится ацетилировать свободные конечные аминокгруппы полиамида.

Чистый полиамид для ВЭЖХ непригоден. Однако его можно очень легко нанести на непористый или пористый носитель.

Наиболее сильная адсорбция на полиамиде происходит из растворителей, неспособных к образованию водородных связей. Элюирование проводят с помощью таких растворителей, как спирты, вода или диметилформамид. Полное вытеснение сорбированного вещества возможно только при промывании колонки раствором едкого натра.

В ВЭЖХ находит применение адсорбенты, обладающие групповой селективностью. Силикагель, покрытый нитратом серебра, используют в жидкостной хроматографии для селективного отделения насыщенных органических соединений от ненасыщенных.

3.2. Выбор элюента для адсорбционной жидкостной хроматографии

Правильный выбор растворителя при разделении часто имеет более важное значение, чем выбор неподвижной фазы. К применяемым в жидкостной хроматографии элюентам предъявляются следующие требования:

1. Элюент должен позволять опознать пробу. Так, например, при УФ-детектировании пробы элюент не должен поглощать в заданном диапазоне длин волн.
2. Элюент должен растворять пробу.
3. Элюент должен быть таким, чтобы его можно было легко и количественно удалить.
4. При выборе элюента необходимо учитывать его вязкость. Чем меньше вязкость элюента, тем меньше при данной скорости элюента необходимое давление. Предпочтение отдают элюенту с более низкой вязкостью.
5. Недопустимы необратимые взаимодействия элюента ни с пробой, ни с адсорбентом. Так, например, ацетон и другие алифатические кетоны на таких активных адсорбентах, как окись алюминия, могут претерпевать реакции конденсации. При этом изменится элюотропное поведение элюента.

Элюотропным рядом называют экспериментально установленную последовательность растворителей, расположенных в соответствии с увеличивающейся элюирующей силой. Такие ряды получают для одного и того же адсорбента и материала пробы, определяя зависимость времени удерживания от растворителя. Чем меньше время удерживания пробы, тем больше полярность растворителя. Последовательность растворителей в ряду всегда такова, что адсорбция, из стоящих в начале ряда, для данной пробы является наибольшей (больше всего время удерживания). Чем ниже стоит элюент в ряду, тем меньше время удерживания и тем больше его элюирующая сила, которая в конце концов становится такой большой, что проба больше вообще не удерживается. В таблице 1 приведены важнейшие органические растворители.

Таблица 1

Элюотропный ряд и свойства важнейших растворителей
для адсорбционной хроматографии

Элюент	Элюирующая сила, E_0^a	Вязкость сП (20°)	Длина волны УФ-детектора, нм
н-Пентан	0,00	0,235	200
н-Гексан	0,01	0,33	200
н-Гептан	0,01	0,42	200
Изооктан	0,01	0,50	200
Циклогексан	0,04	0,98	210
Толуол	0,29	0,59	290
Бензол	0,32	0,65	290
Этиловый эфир	0,38	0,23	220
Хлороформ	0,40	0,57	250
Ацетон	0,56	0,32	220
Диоксан	0,56	1,54	220
Этилацетат	0,58	0,45	260
Метилацетат	0,60	0,37	260
Пиридин	0,71	0,94	310
н-Пропанол	0,82	2,3	200
Этанол	0,88	1,2	200
Метанол	0,95	0,6	200
Гликоль	1,11	19,9	200

^a Получены для окиси алюминия

Элюент для неизвестной смеси пока еще выбирают методом проб и ошибок. Если речь идет о совершенно неизвестной смеси, с которой никаких предварительных опытов не проводили и разделить которую методом тонкослойной хроматографии не пытались, то лучше всего начать с элюента со средней полярностью. Если полученная величина K' (отношение времен удерживания в неподвижной и подвижной фазах) окажется слишком маленькой или составные части пробы будут выходить из колонки вместе с пиком инертного вещества, то это означает, что полярность элюента слишком велика. В этом случае переходят к тем элюентам, которые в элюотропном ряду стоят выше, т. е. элюентам с меньшей полярностью.

Если вещества удерживаются сильнее, чем это желательно, то следует несколько увеличить элюирующую силу элюента, т. е. повысить его полярность. В этом случае используют элюенты, которые в элюотропном ряду стоят ниже использованного элюента.

Элюирующая сила элюентов должна быть такой, чтобы значения K' были меньше 10. Только при этом условии разделение можно провести достаточно быстро. Однако получить такое значение K' на чистых элюентах удастся очень редко, и, как правило, приходится использовать смеси нескольких полярных растворителей.

3.3. Влияние структуры вещества пробы на выбор условий хроматографирования

Молекулярная структура вещества влияет на выбор пробы твердой неподвижной фазы и элюента. Знание состава пробы и структуры ее составных частей упрощает выбор системы и позволяет прогнозировать последовательность элюирования.

Сила удерживания зависит почти исключительно от вида и числа функциональных групп в молекуле. Поскольку концентрация пробы обычно низкая ($< 0,1\%$), растворимость практически не оказывает влияния на результаты анализа. В простейшем случае в специфическое взаимодействие с поверхностью при адсорбции вносит вклад каждый отдельный атом и каждая группа в молекуле пробы. Так, среди членов гомологического ряда удерживание усиливается с увеличением молекулярной массы. При этом взаимодействие функциональной группы с поверхностью адсорбента должно быть беспрепятственным, в частности, оно не должно быть затруднено стерически.

Если функциональные группы в подобных молекулах вступают во взаимодействие друг с другом, например, образование водородной связи, то в результате этого меняются сила и вид взаимодействия с поверхностью адсорбента. В качестве стандартного примера можно привести орто- и паранитрофенолы: время удерживания орто-нитрофенола (внутримолекулярная водородная связь) значительно меньше, чем время удерживания паранитрофенола.

Кроме того, сила адсорбции зависит от величины молекулы (молярного объема), особенно в неполярных системах. В классических адсорбционных системах влияние дисперсионной силы уменьшается с увеличением полярности элюента.

Для зависимости последовательности вымывания от вида функциональных групп можно построить следующий эмпирический ряд. Удерживание некоторого соединения $R - X$, где R – органический радикал, X – функциональная группа, увеличивается в ряду: алкил < галоген ($F < Cl < Br < I$) < простой эфир < третичный амин < нитрил < нитросоединение < эфир карбоновой кислоты < кетон < альдегид < первичный амин < амид карбоновой кислоты < спирт < фенол < карбоновая кислота < сульфокислота.

Сила удерживания зависит также от стерических факторов. Цис-изомеры всегда удерживаются сильнее, чем транс-изомеры.

4. РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Этот хроматографический метод основан на различном распределении вещества между жидкими фазами. На пористый мелко раздробленный порошок (носитель) наносят жидкую фазу. Такой кажущийся внешне сухим порошок (неподвижную фазу) помещают в разделительную колонку и пропускают через нее вторую жидкость (подвижную фазу).

Вещества, входящие в состав пробы, по-разному распределяются между НФ и ПФ, благодаря чему становится возможным разделение. Носитель не должен обеспечивать равномерное распределение неподвижной жидкой фазы по всей поверхности, чтобы равновесное распределение компонентов пробы между обеими фазами устанавливалось достаточно быстро.

Использование процессов распределения в жидкостной хроматографии осложняется в связи с тем, что жидкие фазы – подвижная и неподвижная – не должны смешиваться друг с другом. Подобрать такие фазы очень сложно, поэтому обе жидкости перед приготовлением НФ приводят в равновесие друг с другом. Даже при хорошем насыщении ПФ разделяющей жидкостью в

хроматографической установке должна быть предусмотрена форколонка, заполненная носителем, содержащим избыточное количество разделяющей жидкости. Это необходимо для того, чтобы элюент в условиях хроматографирования был полностью насыщен. Поскольку жидкие фазы не должны смешиваться, растворимость компонентов пробы в НФ и ПФ сильно различается. Поэтому время удерживания очень возрастает, а это ведет к снижению детектирования (широкие полосы), если же растворимость пробы в ПФ выше, время удерживания лишь незначительно отличается от мертвого времени колонки.

Чтобы преодолеть это затруднение, используют тройные смеси из неполярного (гексан) и сильнополярного (вода) растворителей, к которым добавляют третий компонент (низший спирт), усредняющий растворимость. Применяя такие смеси и меняя их состав, подбирают подходящие условия разделения. При этом необходимо следить за постоянством температуры сосуда для элюента, форколонки, разделительной колонки и детектора.

4.1. Материалы, используемые как носители в распределительной жидкостной хроматографии

Носителями в распределительной жидкостной хроматографии могут быть любые пористые материалы, которые поддаются пропитыванию независимо от величины их удельной поверхности, природы и толщины пористого слоя.

Первоначально из-за лучшей разделяющей способности в качестве носителей выбирали главным образом поверхностно-пористые материалы (ППМ). Толщина пористого слоя у ППМ невелика, и на них можно нанести только незначительное количество НФ. Разделительные колонки, заполненные ППМ с нанесенной НФ, обладают всеми преимуществами, присущими таким частицам: хорошая разделительная способность, высокая скорость анализа. Однако такие колонки недостаточно стабильны. Даже небольшая потеря неподвижной фазы значительно меняет объем удерживания.

Оптимальный носитель для распределительной хроматографии должен характеризоваться следующими свойствами:

1. Объем пор. Чем больше объем пор, тем больше количество НФ, которое можно нанести на носитель, прежде чем его частицы начнут склеиваться друг с другом. При удельном объеме пор 1–1,3 мл/г нагрузку можно легко довести до 1 г разделяющей жидкости на 1 г носителя, т.е. покрытие может быть 100 %-ным. Чем больше НФ на носителе и вместе с тем в хроматографической колонке, тем менее заметны потери НФ в результате эрозии и тем слабее их влияние на объем удерживания.

2. Диаметр пор. Средний диаметр пор носителя влияет на размывание полосы удерживаемой пробы. Большие молекулы и молекулы с большой сольватной оболочкой при малых диаметрах пор могут уже исключаться. Кроме того, диаметр пор определяет стабильность колонки и ее устойчивость к эрозии.

3. Удельная поверхность. Влияние удельной поверхности носителя можно выяснить, сравнивая коэффициенты распределения, определенные из хроматографических данных и классическим методом при исследовании распределения между двумя фазами. Если носитель влияет на удерживание, то коэффициент распределения, определенный хроматографически, всегда больше, чем найденный в классическом опыте в 5–10 раз. Влиянием силикагеля на удерживание можно пренебречь только в том случае, если его удельная поверхность меньше 20 м²/г. В качестве НФ в этих опытах использовался 3,3'-оксидипропинонитрил (ОДПН). Хроматографически установленный коэффициент распределения такого силикагеля одинаков для силанизованного хромосорба Р (инертного адсорбента). Влияние на удерживание разделяемых веществ зависит и от структуры носителя. Установлено, что в системах SiO₂/ОДПН разделение спиртов в большой степени зависит от величины удельной поверхности, в то время как при разделении нитрилов удерживание обусловлено только механизмом распределения.

4.2. Подвижные фазы для распределительной жидкостной хроматографии

Первоначально разделение методом ВЭЖХ проводилось с 3,3'-оксидипропинонитрилом (ОДПН), 1,2,3-трис-(2-цианэтокси)-пропаном, триметиленгликолем, полиэтиленгликолями различной степени полимеризации, карбоваксом и др. Однако ПФ при этом могут быть только неполярные алифатические углеводороды, содержащие небольшое количество (до 10 %) хлороформа или тетрагидрофурана, все другие элюенты хорошо растворяют эти неподвижные фазы. Поскольку растворимость веществ пробы в подходящих элюентах слишком мала, такие системы находят лишь ограниченное применение. Более того, различие в селективности НФ (носитель + разделяющая жидкость) данного типа незначительны. Разделительные жидкости с высокой вязкостью характеризуются низкими коэффициентами диффузии, поэтому разделительная способность систем с ПФ этого типа хуже, чем у систем с разделительной жидкостью малой вязкости. При работе с УФ-детектором нельзя использовать разделительные жидкости, поглощающие в УФ-области, т.к. обычно даже при незначительной растворимости их в элюенте он перестает быть прозрачным для УФ-излучения.

Выбирая системы для разделения методом распределительной хроматографии, можно ориентироваться на уже известные системы распределения, применяемые при экстракционном разделении. Более полярный компонент системы обычно наносят на носитель, а менее полярный служит элюентом. Кроме того, в ВЭЖХ можно использовать системы, разработанные для хроматографии на бумаге. Так, например, на бумаге, пропитанной формамидом, очень легко разделить стероиды. Если нанести формамид на силикагель, то разделить стероиды можно и методом ВЭЖХ.

До сих пор говорилось только о бинарных смесях, хотя область применения тройных смесей намного более широкая. У жидкостей, составляющие простую бинарную смесь полярность должна значительно различаться. Если к такой бинарной смеси теперь добавить третий компонент,

полностью смешивающийся с первыми двумя, то он будет действовать как агент растворения, и различие в полярности двух фаз уменьшиться.

Количество добавляемого третьего компонента надо дозировать таким образом, чтобы система оставалась двухфазной. Если, меняя состав, приближаясь к точке, в которой наступает полная смешиваемость, то разделительная система теряет селективность. Когда обе фазы становятся похожими друг на друга, стабильность разделительной колонки уменьшается, т.к. подвижная фаза вымывает неподвижную.

Состав фаз следует всегда выбирать таким образом, чтобы на него не влияли незначительные изменения температуры. С использованием тройных смесей углеводород (изооктан) – этанол – вода, взятых в различном соотношении, проведено разделение стероидов, пестицидов и хелатов металлов. Углеводород можно заменить, например, на хлористый метилен. Процесс разделения проб, которые в водной среде способны диссоциировать, можно оптимизировать, меняя значения pH водной НФ и ПФ. При этом диссоциация разделяемых кислот или оснований подавляется, и они элюируются в виде более острых зон. При хроматографии кислот в элюент добавляют уксусную или разбавленную соляную кислоту.

Если же анализируются основания, то к растворителю добавляют аммиак или слабые органические основания. Кроме того, к разделяемым кислотам или основаниям в НФ или ПФ можно добавить подходящие противоионы и вызвать образование соли между кислотой или основанием и соответствующим противоионом.

Образующиеся «ионные пары» значительно меняют удерживающую способность ионогенных веществ, в то время как удерживание неионогенных веществ остается прежним. Таким образом, в этом случае возможна дополнительная оптимизация разделения.

4.3. Нанесение неподвижной фазы на носитель в распределительной жидкостной хроматографии

В классическом варианте распределительной жидкостной хроматографии колонку заполняют сухим способом. Разделяющую жидкость обычно наносят из раствора, после чего растворитель медленно удаляют испарением. Если хроматографическую колонку заполняют суспензией, то чаще всего разделительные жидкости удаляют из колонки или тем же растворителем, который использовался для приготовления суспензии, или ПФ при кондиционировании колонки. Поэтому после заполнения таких колонок носителем на него необходимо нанести разделяющую жидкость.

Если носитель – активный твердый материал с большой удельной поверхностью, а ПФ – полярная жидкость, то наносить жидкую фазу на носитель излишне. В этих случаях между разделяющей жидкостью, растворенной в элюенте и адсорбированной на активном носителе, устанавливается равновесие. Чем больше различие в полярности НФ и ПФ и чем больше удельная поверхность носителя, тем большее количество разделяющей жидкости удерживает твердый носитель. Целесообразно в сосуд для элюента добавить избыток НФ и в процессе нанесения жидкой фазы заставлять элюент циркулировать. В качестве сосуда для предварительного кондиционирования элюента можно использовать форколону, заполненную хромосорбом с нанесенной на него выбранной разделяющей жидкости. Время, необходимое для нанесения НФ, можно значительно сократить, повысив температуру в форколоне на 1–2 °С по сравнению с разделительной колонкой.

Приготовленные таким образом колонки с равномерно распределенной разделяющей жидкостью отличаются большой продолжительностью жизни, поскольку потери в результате вымывания разделяющей жидкости, растворенной в элюенте, можно изменить равновесное распределение на носителе.

4.4. Свойства разделительной колонки в распределительной жидкостной хроматографии

1. Стабильность и продолжительность работы колонки зависит от следующих факторов:

– Насыщение элюента НФ, достигаемое с помощью форколони, в которой степень покрытия НФ больше, чем в разделительной колонке. Форколони можно заполнить другим носителем, например, силикагелем, имеющим другой размер частиц. При этом компенсируется случайное изменение растворимости разделяющей жидкости в элюенте при повышении давления.

– Равенство и постоянство температур форколони, разделительной колонки и сборника. Состав смеси часто зависит от температуры, и изменение температуры может повлиять на количество разделяющей жидкости в насадке. Если колонка заполнена частицами малого диаметра, внутри нее может возникнуть градиент температуры, обусловленный нагреванием элюента за счет работы сжатия. В этом случае внизу колонки, где температура выше, на носителе меньше разделительной жидкости, чем в начале колонки.

– Разделяющая жидкость может выноситься из колонок в результате механической эрозии.

– Вещества пробы всегда следует растворять в элюенте, пропущенном через разделительную колонку, а не в чистом ненасыщенном растворе, так как иначе вымывается НФ.

2. Предельная допустимая нагрузка (линейная емкость) в распределительной хроматографии на порядок выше, чем в чисто адсорбционных системах. Без заметного увеличения размывания полос можно ввести в колонку $10^{-3} - 10^{-2}$ г пробы на 1 г разделяющей жидкости.

3. Препаративное применение. Распределительная хроматография допускает большие нагрузки, и поэтому она пригодна для препаративных разделений. В разделительную колонку с внутренним диаметром 2 мм длиной 50 см, заполненную силикагелем с максимальной степенью покрытия, можно

вводить до 10 мг вещества в расчете на компонент. Этого достаточно для многих аналитических исследований и реакций. Если разделение хорошее, в колонку можно ввести еще большую пробу. Однако выделенные составные части пробы после удаления элюента загрязнены разделяющей жидкостью, поэтому для препаративных работ разделяющую жидкость следует выбирать таким образом, чтобы ее можно было отделить.

4. Разделяющая способность колонок для распределительной хроматографии зависит от размера частиц носителя. Кроме того, на размывание полосы влияет вязкость разделяющей жидкости. Для колонок с максимальной степенью покрытия наблюдается предсказанная теорией зависимость числа теоретических тарелок от отношения времен удерживания вещества в ПФ и НФ (K'). Максимальное значение ВЭТТ достигается при $K' \approx 1$.

5. Техника программирования позволяет сократить длительность анализа. В распределительной хроматографии приемлемо программировать давление и скорость потока.

4.5. Применение распределительной ВЭЖХ

Методом распределительной хроматографии целесообразнее всего проводить разделение соединений, полярность которых слишком велика, чтобы их можно было разделить с помощью адсорбционной хроматографии. Тем не менее методом распределительной хроматографии можно разделить и неполярные вещества, например, многоядерные ароматические углеводороды. Распределительной хроматографией анализируют пластификаторы, стероиды, фенолы, фенолкарбоновые кислоты, неионогенные ПАВ, хелаты металлов.

Описано разделение производных аминокислот, образующихся при эдмановском расщеплении пептидов фенилтиогидантоина и денсиаминокислот. Разделяющая жидкость была адсорбирована носителем (силикагель) из ПФ. В качестве элюента для разделения производных монофункциональных аминокислот более всего пригодна смесь насыщенного

водой хлористого метилена с 1 % ледяной уксусной кислоты и 1 % 2-хлорэтанола.

5. ОБРАЩЕНО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В основе разделения в обращено-фазовой хроматографии (ОФХ) лежит принцип, характерный для всего распределительного типа, и заключающийся в различии коэффициентов распределения компонентов смеси между двумя несмешивающимися жидкостями – элюентом и фазой на сорбенте. Термин «ОФХ» отражает перемену полярности НФ и ПФ в данном варианте ВЭЖХ по сравнению с исторически первым адсорбционным «прямо-фазным» вариантом, в котором сорбент полярнее элюента. В отличие от первых обращено-фазных сорбентов, в которых жидкая фаза наносилась на пористый носитель (по аналогии с газовой хроматографией), в современной ВЭЖХ фаза химически прививается к носителю, что делает ее значительно более устойчивой. Чаще всего привитая фаза представляет собой углеводородный радикал с различной длиной цепи (C_2 – C_{22}). На сегодняшний день ОФХ является абсолютным лидером среди других типов ВЭЖХ по частоте применения: по общим оценкам от 70 до 90 % всех выполняемых в области ВЭЖХ работ проводится этим методом.

Основные достоинства обращено-фазовой ВЭЖХ, позволившие этому варианту снискать такую популярность в аналитической практике, по сравнению перед адсорбционной хроматографией:

1. В обращено-фазовой хроматографической системе значительно быстрее устанавливается равновесие после изменения условий, чем в адсорбционной.

2. ОФХ позволяет избежать тех трудностей, которые возникают в адсорбционной хроматографии в связи с присутствием в элюентах (органических растворителях) микроколичеств воды. Остаточная вода, содержание которой крайне сложно контролировать, является активным компонентом адсорбционной хроматографической системы, вследствие чего

часто наблюдается нестабильность времен удерживания на силикагельных колонках.

3. Растворители, традиционно используемые в ОФХ (ацетонитрил, метанол, вода и др.) позволяют работать в широком обращено-фазовом диапазоне, и, что наиболее существенно, легко растворяют все важнейшие группы биологически активных веществ.

4. В ОФХ значительно реже наблюдается эффект необратимой сорбции.

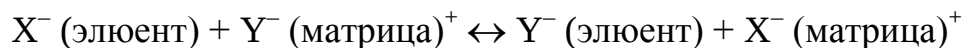
6. ИОНООБМЕННАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В данном виде хроматографии по нерастворимой матрице ионообменника определенным образом распределены ковалентносвязанные функциональные группы, способные к диссоциации. Чаще всего это сульфогруппы и карбоксильные группы (катионообменники) либо третичные аминогруппы или четвертичные аммониевые группы (анионообменники). Методом ионообменной хроматографии можно разделять такие соединения, которые в сильнополярных элюентах хотя бы частично диссоциируют. Разделение основано на различии сродства ионов к противоположным матрицы ионообменника к ионам, содержащимся в растворителе. Упрощенно ионный обмен можно описать обменным равновесием:

Катионный обмен:



Анионный обмен:



Разделение смесей катионов или анионов основано на различии в селективности при сорбции подлежащих разделению ионов по отношению к ионам того же знака, удерживаемым обменником в результате образования ионной пары.

Ионообменные материалы

Чтобы ионообменные материалы можно было использовать в жидкостной хроматографии при высоких давлениях, они должны отвечать всем

требованиям, которые предъявляются к ионообменникам в классической жидкостной хроматографии (нерастворимость, химическая стабильность и др.), но самое главное – эти материалы должны быть устойчивы к действию давления.

Хороших хроматографических свойств можно достичь уменьшением пути диффузии. С этой целью либо уменьшают диаметр частиц насадки, либо заполняют колонку поверхностно-пористыми материалами.

В жидкостной хроматографии при высоких давлениях апробированы следующие типы ионообменников.

1. Ионообменник с органической полимерной матрицей. Колонки для ВЭЖХ можно заполнять частицами мелких фракций смол (5–20 мкм), используемых в обычной ионообменной хроматографии. Предпочтение отдают сильносшитым ионообменникам, например, полистирольным смолам с 6–8 % дивинилбензола, т.к. они слабо набухают и устойчивы к действию давления. Кроме того, специально для ВЭЖХ изготавливают ионообменники в виде шариков диаметром 5–10 мкм.

При разделении методом ВЭЖХ обращают внимание на следующую зависимость: когда давление превысит некоторое определенное значение, линейная скорость элюента перестает расти с увеличением перепада давления на колонке. В таких случаях давление превышает прочность матрицы. При этом ухудшается разделительная способность колонки. Уменьшение давления не обязательно приведет к восстановлению первоначальных свойств разделительной колонки (разделительная способность, проницаемость и др.).

Прежде чем заполнять колонку, смолы дают предварительно набухнуть. При изменении ионной силы или pH объем набухших ионообменников меняется. Это может повлиять на проницаемость и разделительную способность колонки.

На таких ионообменниках выполнены многочисленные разделения для определения органических компонентов в биологических жидкостях, растворах, например, моче, сыворотке. Методов ВЭЖХ на органических

ионообменниках разделены также кето- и оксикарбоновые кислоты, идентифицированы ароматические соединения.

2. Полимерные ионообменники на поверхностно-пористых материалах (ППМ). В английском языке для определения двух групп таких ионообменников применяют два термина – pellicular от pellicula – кожа и superficial – поверхностный. Обозначаем их пелликулярными и поверхностно-пористыми ионообменниками.

а) Пелликулярные ионообменники получают следующим образом: на непроницаемые стеклянные шарики (~ 30 мкм) наносят пленку из органического полимерного ионообменника. Степень сшивки полимера может быть небольшой, поскольку он не должен быть устойчивым к действию давления. Малая степень сшивки и очень тонкий слой полимера обуславливают хорошие хроматографические свойства колонок, заполненных такими насадками, что позволяет уменьшить время анализа. Другим достоинством этих носителей является независимость объема насадки от ионной силы элюента. Благодаря этому колонки можно заполнять сухим способом.

б) Поверхностно-пористые ионообменники незначительно отличаются от описанных выше. Полимерный органический ионообменник наносят на стеклянный шарик, на котором имеется тонкий слой пористого силикагеля. Материалы этого типа отличаются малой обменной емкостью. На таких колонках можно разделять только небольшие количества веществ, поэтому детекторы должны быть очень чувствительными. Важнейшими ионообменниками являются нерисорб AN, зипакс ААХ, лихросорб AN и др.

На ППМ с нанесенным катионо- и анионообменным слоем начали проводить разделение нуклеиновых кислот и оснований. Продолжительность анализа составляет примерно 30 минут. На силикагеле, покрытом пленкой полимера, например зипаксе, разделены нуклеиновые кислоты, компоненты фармацевтических препаратов. Ионообменники пригодны для определения и разделения составных частей лекарственного растительного сырья (морфин, кодеин). Изготовлены ионообменники, у которых органические радикалы,

содержащие ионообменные функциональные группы, «привиты» к поверхностному слою силикагеля. Такие ионообменники с успехом используют в анализе нуклеотидов.

3. Ионообменники типа «щеток». На частицы ППМ можно «привить» алкильные или арильные группы, образующие ковалентные связи с атомами поверхности носителя. В эти группы затем можно ввести ионообменные группы и получить ионообменники типа щеток. Такие ионообменники можно использовать в системах с органическими элюентами. Они сочетают хорошие хроматографические свойства с высокой обменной емкостью. На подобных ионообменниках проведены анализы аминокислот и нуклеиновых кислот и разделение водорастворимых витаминов.

4. Жидкие ионообменники делятся на:

а) жидкие ионообменники, например, нерастворимые в воде длинноцепочечные третичные амины или соединения с четвертичными аммониевыми основаниями;

б) жидкие катионообменники, например, диалкиловые эфиры фосфорной кислоты.

Стабильность такой системы небольшая, т. к. прочность сцепления «жидких ионообменников», имеющих неполярные органические остатки, с поверхностью силикагеля относительно небольшая.

Свойства ионообменника определяются типов входящих в него функциональных групп. Различают сильно- и слабокислотные ионообменники, первые содержат сульфогруппы, вторые – карбоксильные группы. В сильноосновных ионообменниках имеются группы третичных аминов и четвертичных аммониевых оснований, в слабоосновных – первичные аминогруппы.

Поскольку матрица заметно влияет на селективность и хроматографические свойства ионообменника, необходимо точно знать характеристики носителя функциональных групп. Для ионообменников с чисто органической матрицей наряду с составом матрицы, например, полистирол,

полиметилакрилат и т. д., всегда указывают степень сшивки матрицы, например, процент добавки дивинилбензола в полистирольные смолы, поскольку от этой характеристики зависит устойчивость к давлению и доступность функциональных групп. Чисто органические смолы делят на микропористые и макропористые, в которых подход к микропорам облегчен из-за того, что зерна пронизаны микропорами. Свойства ионообменников на основе ППМ зависят от того, каким образом нанесен слой, адсорбированы ли органические функциональные группы физически или связаны химически, а также от типа этой группы.

Важна также обменная емкость. Чем больше обменная емкость, тем больше максимально допускаемая нагрузка. Если обменная емкость мала, приходится работать с низкими концентрациями ионов, воспроизводимость результатов при этом ухудшается. Объемную емкость ионообменников определяют прямым титрованием основанием или кислотой соответственно кислотных или основных функциональных групп ионообменников.

7. АППАРАТУРА ДЛЯ ВЭЖХ

Конструкция приборов для ВЭЖХ не зависит от принципа разделения. Жидкостный хроматограф (рис.1) состоит из емкости для элюента, насоса, пробы, хроматографической колонки, термостата, детектора и самописец (компьютер). Это – основные узлы хроматографа. Насос обеспечивает постоянную подачу растворителя из резервуара. Подвижная фаза после демпфирования подается в разделительную колонку через устройство для ввода пробы. Давление на входе в разделительную колонку измеряют манометром. Выходящие из разделительной колонки составные части пробы определяют с помощью детектора. Хроматограмма регистрируется компенсационным самописцем (система обработки). К детектору можно присоединить другие регистрирующие приборы (компьютер). Элюат собирают с помощью коллектора фракций. Для работы при постоянной температуре устанавливают термостат.

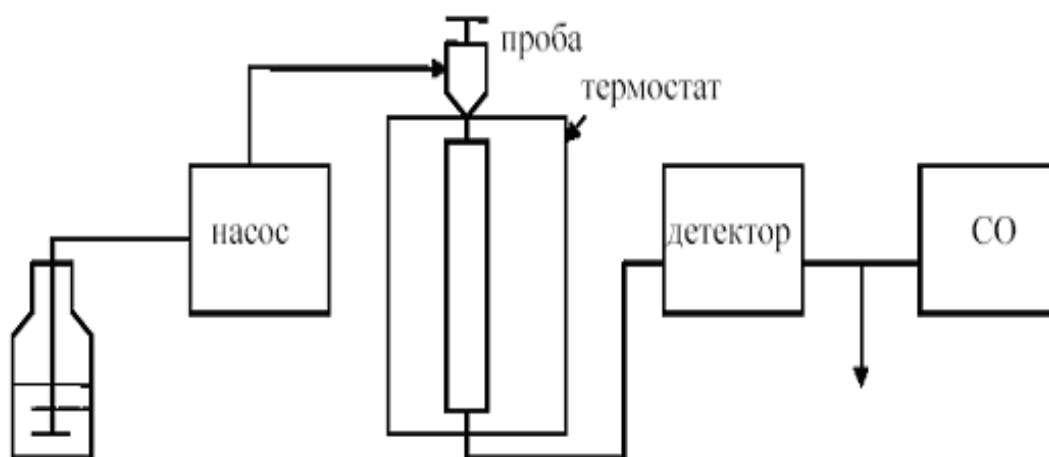


Рисунок 1. Схема жидкостного хроматографа

Наиболее востребованной в нашей стране является отечественный жидкостной хроматограф Милихром А-02. Схема этого прибора представлена на рисунке 2.

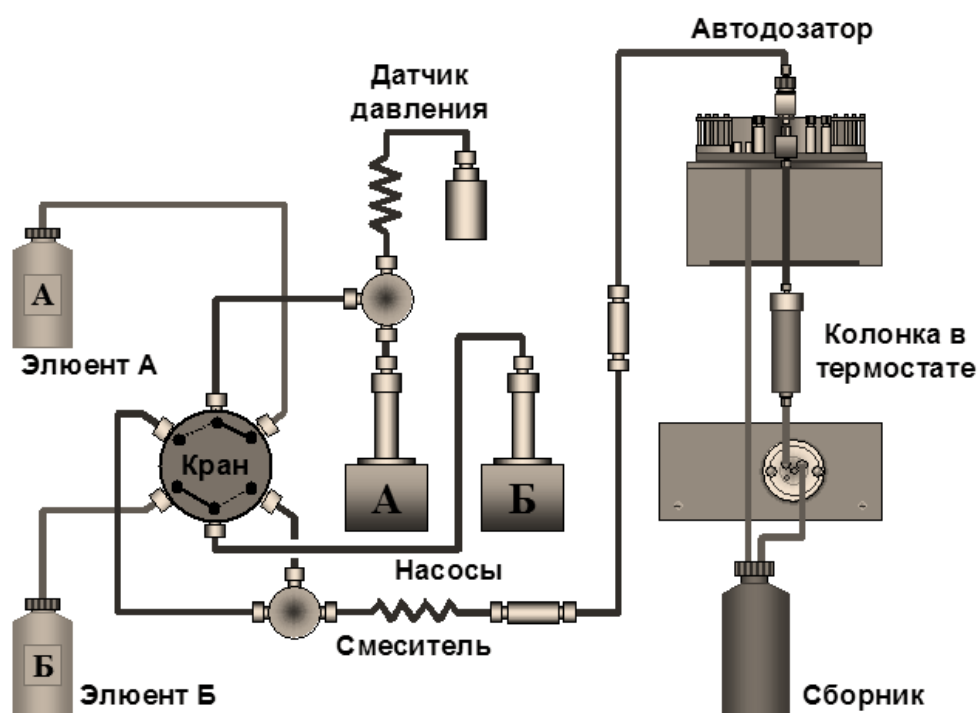


Рисунок 2. Схема прибора Милихром А-02
(приведена в инструкции по эксплуатации прибора)

Внешний вид жидкостного хроматографа Милихром А-02 представлен на рисунке 3.



Рисунок 3. Жидкостной хроматограф «Милихром А-02»

- **Время анализа:** 3-40 мин в зависимости от образца
- **Габариты:** 535 x 210 x 320 мм
- **Вес (без компьютера):** 17 кг
- **Потребляемая мощность:** 130 мкл
- **Управление хроматографом:** компьютерное
- **Производитель:** Эконова, ЗАО Институт хроматографии, г. Новосибирск

Основные технические характеристики жидкостного хроматографа «Милихром А-02» производства Россия приведены в таблице 2.

Таблица 2

Технические характеристики жидкостного хроматографа Милихром А-02
(приведена в инструкции по эксплуатации прибора)

Детектор:	двухлучевой многоволновый спектрофотометр.
Диапазон длин волн:	190–360 нм
Длин волн при многоволновом детектировании:	До 8
Предельное давление:	8 МПа
Элюирование:	Градиентное
Колонки:	Ø2x75 мм из нержавеющей стали Эффективность колонки до 6000 теорет. тарелок ; ProntoSIL 120-5 C18; Nucleosil 120-5C18; Nucleosil 300-5C4
Термостат:	Твердотельный электрический Устанавливаемая температура от 35 до 90°C Дискретность установки температуры 1°C Погрешность термостатирования 0.1°C

Программное обеспечение:	Windows® 2000/XP МилиХром А-02™, МультиХром™
Насос:	Двухшприцевой, градиентный Скорость подачи от 2 до 999 мкл/мин Максимальное давление – 70 атм Градиент формируется из 1÷20 линейных участков
Автодозатор:	автоматический, программируемый, на 46 образцов
Объем пробирки для образца:	100 мкл

7.1. Емкость для элюента

Объем сосуда для элюента должен составлять примерно 1000 мл. В целях безопасности емкость снабжают устройством для обезгаживания. Емкость для элюента имеет нагреватель, регулятор температуры и магнитную мешалку. Пары элюента конденсируются в холодильнике. Ускорить обезгаживание можно, подключив вакуумную систему.

Пузырьки воздуха, появляющиеся при расширении растворенного в элюенте газа, в детекторе могут препятствовать обнаружению пробы. Незначительное избыточное давление (1–2 атм) в ячейке детектора препятствует образованию там пузырьков воздуха. Воздух может появиться в системе из-за плохого уплотнения резьбовых соединений.

Расположение и конструкция сосуда для элюента должны позволять легкую смену элюента.

Элюент может подаваться на колонку в двух вариантах: изократический режим (состав элюента остается постоянным все время проведения процесса хроматографирования), режим градиентного элюирования (состав элюента программно изменяется в процессе хроматографирования, что расширяет возможности метода). В ХТА режим градиентного элюирования применяется наиболее часто т. к. объектами исследования являются достаточно сложные смеси.

7.2. Насосы

Насосы обеспечивают подачу подвижной фазы в колонку с заданной скоростью. Состав подвижной фазы и скорость потока могут быть постоянными или меняющимся во время анализа. В случае постоянного состава подвижной фазы процесс называют изократическим, а во втором – градиентным. Современная насосная система жидкостного хроматографа состоит из одного или нескольких насосов, управляемых компьютером. Это позволяет менять состав подвижной фазы по определенной программе при градиентном элюировании. Насосы для аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяют поддерживать скорость подачи подвижной фазы в колонку в интервале от 0,1 до 10 мл/мин при давлении на входе в колонку до 40 МПа.

7.3. Демпфирование пульсаций

Пульсации в потоке элюента необходимо демпфировать перед разделительной колонкой. В простейшем случае цепь демпфирования состоит из соединенных друг с другом емкости и сопротивления. Гидравлическим сопротивлением служат капилляры. В качестве пневматических емкостей используют заполненные газом пространства.

7.4. Ввод пробы

Пробу вещества вводят в поток элюента с помощью шприца (инжектора) через перегородку в блок для ввода пробы (дозатор) или, используя петлю ввода, из которой пробу выливают в систему элюента. Инжекторы могут быть автоматическими («автосэмплеры»). Инжектор для ввода пробы (раствора) располагается непосредственно перед хроматографической колонкой.

7.5. Разделительная колонка

В качестве хроматографических колонок используют трубки из нержавеющей стали, стеклянные и танталовые трубки. Основное преимущество

стеклянных колонок – визуальный контроль за качеством заполнения; гладкая внутренняя поверхность; недостаток – неустойчивость к высокому давлению.

Внутренний диаметр аналитических разделительных колонок – 2–4 мм. Форма колонок определяется величиной используемых термостатов и их формой. Как правило форма колонки представляет собой цилиндр длиной от 15 до 50 см.

7.6. Термостатирование

При многих анализах температуру разделительной колонки необходимо контролировать и поддерживать постоянной. Для этого используют воздушные термостаты с сильным перемешиванием воздуха. Перед колонкой устанавливают дополнительный теплообменник, чтобы подвижная фаза до разделительной колонки приняла температуру термостата. Воздушные термостаты малоинерционны и быстро выходят на заданный режим. Однако при использовании таких термостатов с открытыми нагревательными элементами может произойти взрыв, поэтому такие термостаты должны быть снабжены устройством для промывания термостатируемого пространства азотом.

7.7. Сорбенты

В анализе лекарственных средств и сопутствующих продуктов приходится использовать ВЭЖХ для определения самых разнообразных объектов (катионы, анионы, кислоты, основания, нейтральные вещества гидрофильной и гидрофобной природы). Столь широкий круг объектов требует большого числа колонок с сорбентами разнообразной природы. Однако, как показывает практика, это не всегда целесообразно, во-первых, по чисто экономической причине, т. к. создание большого арсенала разнообразных колонок достаточно дорогое мероприятие, причем часть колонок будет использоваться редко (один, два раза в течение всего срока годности). Во-вторых, специальные сорбенты типа сильных анионитов и катионитов нельзя

использовать для решения задач одновременного определения. Альтернативой созданию большого арсенала хроматографических колонок является использование известного приема – динамической модификации сорбентов различными модификаторами, входящими в состав подвижной фазы. При этом адсорбционные места нового типа составляют относительно небольшую часть от исходных адсорбционных мест, поэтому такой сорбент может выполнять смешанную функцию. Например, при модификации поверхности обращено-фазового сорбента (например, Сепарон C_{18}) алкилсульфонатом или дигидрофосфатом образуются катионообменные центры. При этом возможны следующие 4 типа хроматографирования:

1) хроматография ионных пар, когда катион, взаимодействия с адсорбированным анионом алкилсульфоната, образует ионную пару, которая в дальнейшем вытесняется гидрофобным компонентом подвижной фазы – спиртом или ацетонитрилом;

2) обычная ионообменная хроматография, когда вытеснителем является катион – компонент подвижной фазы;

3) обычная обращено-фазовая хроматография нейтральных веществ;

4) хроматография ионного подавления кислот при достаточно низком значении pH подвижной фазы.

Все перечисленные типы хроматографирования могут проявляться по отдельности, в различных сочетаниях и вместе.

Кроме динамической модификации сорбента, приводящей к образованию «смешанной функции», можно использовать сорбенты с такими привитыми группами, которые могут в определенных условиях приводить к появлению «смешанной функции» без внешнего модификатора. Такими привитыми группами являются алкилнитрильные, алкилдиольные и т. д. Такие сорбенты позволяют работать как в режиме прямофазной ВЭЖХ, так и в режиме обращено-фазной ВЭЖХ. Причем возможны промежуточные варианты, в которых фазность хроматографии неопределима. В режиме прямофазной хроматографии такие сорбенты имеют преимущество перед непривитым

силикагелем в том, что гораздо быстрее, чем он приходит в равновесие с подвижной фазой, что позволяет использовать градиент в режиме прямофазной хроматографии. В режиме обращено-фазной хроматографии такие сорбенты позволяют получать симметрические пики для веществ, содержащих в молекуле гидрофобные и гидрофильные фрагменты, то приводит к размытию и асимметрии пика на чисто гидрофобных (алкильных) колонках.

Приведенные выше положения проиллюстрированы рядом конкретных примеров хроматографического разделения сложных смесей лекарственных средств, компоненты которых являются органическими и неорганическими кислотами и основаниями, солями, веществами гидрофобной, гидрофильной и смешанной природы.

Материалы для заполнения колонок в ВЭЖХ должны быть устойчивы к давлению. Проницаемость заполненной разделительной колонки ни в коем случае не должна зависеть от периода давления на колонке. Большинство неорганических материалов, используемых в качестве носителей, стабильны примерно до 600 атм., однако каркас пор высокопористых материалов (объем пор > 2 мл/г) уже при этом давлении может разрушаться.

В ВЭЖХ в качестве носителей используют два класса материалов:

1. *Полностью пористые материалы* (силикагель, окись алюминия) с большой удельной поверхностью ($50\text{--}500\text{ м}^2/\text{г}$) и большим удельным объемом пор ($0,2\text{--}2\text{ мл/г}$), т.е. такие же, как используемые в обычной классической колоночной хроматографии, но с диаметром частиц в пределах $5\text{--}50\text{ мкм}$. преимущественно применяют ситовую фракцию от 10 до 50 мкм. С помощью таких материалов получают очень эффективные разделительные колонки.

2. *Поверхностно-пористые материалы (ППМ)*. В этом случае на непроницаемое ядро (например, стекло) наносят тонкий пористый активный слой. Обычно толщина пористого слоя составляет $1\text{--}3\text{ мкм}$ ($1/30\text{--}1/40$ диаметра частицы). Наряду с силикагелем и окисью алюминия на стеклянные шарики наносят ионообменную смолу, полиамиды и др. материалы.

Подобные материалы устойчивы к давлению, но количество активной неподвижной фазы в них незначительно.

Перед применением носители необходимо освободить от очень мелких частиц, образовавшихся при истирании, проводя седиментацию в воде (метаноле или ацетоне для очень маленьких частиц). Это улучшит проницаемость разделительной колонки и, кроме того, предотвратит засорение капилляров, ведущих к детекторам.

7.8. Подвижная фаза

Подвижная фаза в высокоэффективной жидкостной хроматографии выполняет двоякую функцию: обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке и регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. Таким образом, изменяя состав подвижной фазы в высокоэффективной жидкостной хроматографии можно влиять на времена удерживания соединений, селективность и эффективность их разделения.

Подвижная фаза может состоять из одного растворителя, часто из двух, редко – из трех и более. Состав подвижной фазы указывают как объемное соотношение входящих в нее растворителей. В отдельных случаях может указываться массовое соотношение, что должно быть специально оговорено. В качестве компонентов подвижной фазы могут быть использованы буферные растворы с определенным значением pH, различные соли, кислоты и основания и другие модификаторы.

В нормально-фазовой хроматографии обычно применяются жидкие углеводороды (гексан, циклогексан, гептан) и другие относительно неполярные растворители с небольшими добавками полярных органических соединений, которые регулируют элюирующую силу подвижной фазы.

В обращено-фазовой хроматографии в качестве подвижной фазы используется вода или водно-органические смеси. Органическими добавками

обычно служат полярные органические растворители (ацетонитрил и метанол). Для оптимизации разделения могут использоваться водные растворы с определенным значением pH, в частности буферные растворы, а также различные добавки в подвижную фазу: фосфорная и уксусная кислоты при разделении соединений кислотного характера; аммиак и алифатические амины при разделении соединений основного характера, и другие модификаторы.

На хроматографический анализ большое влияние оказывает степень чистоты подвижной фазы, поэтому предпочтительно применять растворители, выпущенные специально для жидкостной хроматографии (включая воду).

При использовании УФ-спектрофотометрического детектора подвижная фаза не должна иметь выраженного поглощения при выбранной для детектирования длине волны. Предел прозрачности или оптическая плотность при определенной длине волны растворителя конкретного изготовителя часто указывается на упаковке.

Подвижная фаза и анализируемые растворы не должны содержать не растворившиеся частиц и пузырьки газа. Воду, полученную в лабораторных условиях, водные растворы, предварительно смешанные с водой органические растворители, а также анализируемые растворы необходимо подвергать тонкой фильтрации и дегазации. Для этих целей обычно применяют фильтрование под вакуумом через инертный по отношению к данному растворителю или раствору мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

7.9. Детекторы

Состав элюента, вытекающего из колонки, непрерывно контролируют детектором. К сожалению, для жидкостной хроматографии пока не разработано специального универсального детектора. Для каждой системы проба – элюент следует выбирать подходящий детектор. По этой причине в каждом хроматографе должно быть по крайней мере два различных детектора – универсальный и специфический.

Универсальные детекторы измеряют какое-либо различие в общих свойствах элюента. К универсальным детекторам относится рефрактометрический.

Специфические детекторы «распознают» отдельные вещества. Специфическими детекторами являются УФ-детектор, флюорометрический детектор.

Чувствительность специфических детекторов в 10–100 раз выше чувствительности универсальных детекторов. Минимально определяемая с помощью универсальных детекторов концентрация вещества в элюенте 10^{-6} – 10^{-7} г/см³, а с помощью специфических – 10^{-9} г/см³.

Кроме того, различают три типа детекторов.

1. Реагирующие на изменение определенного свойства подвижной фазы.

а) *рефрактометрический* – измеряет изменение показателя преломления чистого элюента и элюата (ПЖФ + хроматографическое вещество). Используется рефрактометр Френеля, принцип действия которого основан на законе отражения Френеля, который гласит, что часть светового потока, который отражается от фазовой границы раздела, зависит от угла падения и от показателя преломления обеих сред, образующих фазовую границу раздела.

Отклоняющий рефрактометр – луч света проходит через ячейку, заполненную двумя жидкостями с различными показателями преломления, и отклонение луча света пропорционально разности показателей преломления.

б) *детектор по диэлектрической проницаемости* – если диэлектрические проницаемости элюента и вещества сильно различаются, даже небольшим концентрациям соответствует значительное изменение диэлектрической проницаемости, т. е. этот детектор определяет количество вещества по изменению емкости системы (иначе его называют «емкостный детектор»). Детектор отличается высокой чувствительностью.

в) *детектор по электропроводности* является очень специфичным, т. к. дает сигнал только от ионов, и применять его можно только для водных и

полярных элюентов. Детектор реагирует на появление ионов, вызывающих изменение электропроводности подвижной жидкой фазы.

2. Детекторы, реагирующие на свойства растворенных веществ в подвижной фазе.

Эти детекторы чувствительны к свойствам веществ, которыми не обладает элюент (специфические детекторы).

1) *ультрафиолетовый детектор* выбирают из-за относительной нечувствительности к изменению температуры и скорости потока. Обнаруживает вещества, поглощаемые в УФ-области спектра. Чаще всего этот прибор работает только на одной длине волны – длине волны наиболее интенсивной линии ртутной лампы низкого давления, т. е. при 253 нм. В некоторых приборах устанавливают флуоресцентную приставку с тем, чтобы можно было возбудить еще излучение с длиной волны 280 нм.

Для повышения селективности метода хроматограммы снимаются в режиме многоволнового детектирования (при одновременной регистрации сигнала на пяти длинах волн) на жидкостном хроматографе «Миллихром А02».

В последнее время в качестве детектора используют диодноматричный детектор. При использовании этого детектора свет проходит через образец, а затем диспергируется посредством решетки, прежде чем попадает на диодную матрицу. Свет всех длин волн попадает на матрицу одновременно и, соответственно, одновременно измеряется. Таким образом, данные собираются параллельно. В результате электронного сканирования матрицы получается спектр. Диодная матрица предполагает сбор спектра по всем длинам волн, поэтому можно быстро проверить, влияют ли примеси на результат.

Недостатком УФ-детектора являются ограничения, возникающие при подборе подвижной жидкой фазы, т.к. многие растворители, входящие в состав этой фазы, поглощают в УФ-области спектра.

2) *флуорометрический детектор* – в элюенте может обнаружить вещества, у которых при облучении в ближней УФ-области возбуждается флуоресценция, и они излучают в видимой области (светятся). Детектор очень

специфичен и его чувствительность часто выше, чем чувствительность УФ-детекторов.

3) *полярографический детектор* (или *электрохимический*) определяет вещества в пробе с помощью электрохимического окисления или восстановления (полярографический и амперометрический методы). На практике осуществить метод окисления проще, т. к. элюент при этом не нужно обрабатывать. Если же используется метод восстановления, то из элюата следует удалить растворенный кислород. Чувствительность детекторов данного типа сильно зависит от окислительной или восстановительной способности веществ пробы, однако, они являются очень перспективными.

3. Детекторы, работающие после удаления элюэнта из покинувшего колонку элюата.

Транспортный детектор (пламенно-ионизационный). При использовании детектора такого типа перед определением пробы летучий элюент удаляется. Для этой цели пробу наносят на транспортное устройство (цепочки, спирали), испаряют элюент, а нелетучую пробу переводят в пламенно-ионизационный детектор. Преимущество заключается в том, что в идеальном случае можно получить сигнал только от собственной пробы. Химические свойства, температура, пульсация подвижной фазы не влияют на результаты. Есть одно условие – летучести элюента и пробы должны сильно различаться, чтобы на транспортной системе после испарения остаток пробы был достаточным.

7.10. Регистрирующее устройство

Ранее хроматограммы записывались с помощью компенсационного самописца, который должен быть связан с детектором. Времена элюирования могут различаться очень сильно, поэтому скорость движения ленты самописца должна легко регулироваться. Современная система обработки данных представляет собой сопряженный с хроматографом персональный компьютер с установленным программным обеспечением, позволяющим регистрировать и обрабатывать хроматограмму, а также управлять работой хроматографа и

следить за основными параметрами хроматографической системы. Результаты хроматографирования фиксируются на электронных носителях информации и там могут храниться и при необходимости использоваться, что очень удобно т. к. могут создаваться базы данных. Это позволяет проводить анализы, не имея стандартных образцы определяемых веществ.

8. ОЦЕНКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КРИВЫХ

Хроматограмма (рис. 4.), представляющая собой зафиксированную последовательность сигналов детектора, вырабатываемых при выходе из колонки отдельных компонентов анализируемой пробы (при её полном разделении), используется для проведения качественного и количественного анализа хроматографируемой смеси.

Качественная интерпретация хроматограммы в ВЭЖХ осуществляется по параметрам удерживания, к которым относятся: время удерживания $\tau(A)$, приведенное время удерживание ($\tau_{\text{пр}}$), относительное время удерживание ($\tau_{\text{отн}}$).

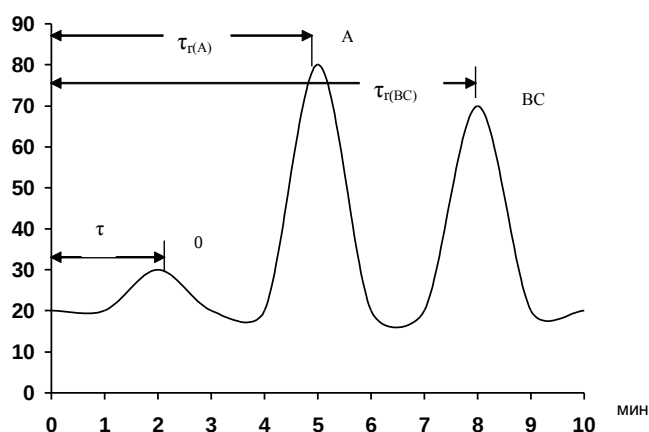


Рисунок 4. Примерная ВЭЖХ-хроматограмма и параметры удерживания компонентов смеси на хроматограмме:

O – несорбирующийся компонент;

A – анализируемый компонент пробы;

BC – внутренний стандарт (первоначально отсутствующее в анализируемой пробе вещество) или один из компонентов пробы;

τ – «мертвое время» колонки, в течение которого несорбирующийся компонент (газ-носитель) проходит колонку;

$\tau(A)$ – время удерживания компонента анализируемой смеси с момента ввода в колонку;

$\tau(BC)$ – время удерживания внутреннего стандарта.

Для оценки хроматограмм с целью качественного анализа составляющих ее пиков чаще пользуются методом эталонных веществ (свидетелей). Один вариантов этого метода состоит в последовательном хроматографировании анализируемой смеси и эталонного вещества (свидетеля) в одинаковых условиях. Совпадение времени удерживания пика соответствующего компонента и свидетеля служить основанием для установления подлинности (идентификации). Недостаток этого способа – необходимость иметь очень чистые эталоны.

При отсутствии стандартных образцов (свидетелей) идентификацию компонентов проводят методом относительных удерживаний. Относительное время удерживание мало зависит от параметров колонки, за исключением температуры, поэтому эта величина более или менее постоянная и лучше воспроизводится в отличие от абсолютной величины времени удерживания. Для определения относительного времени удерживания хроматографируют анализируемый образец, к которому добавлено определенное количество вещества сравнения, называемого внутренним стандартом (рис. 4). В качестве внутреннего стандарта используют постороннее соединение, отсутствующее в анализируемом образце и хорошо отделяющееся от всех других компонентов пробы. После хроматографирования смеси анализируемого образца и вещества сравнения вычисляют относительное время удерживание ($\tau_{отн}$) по формуле:

$$\tau_{отн} = \frac{\tau_{r(A)}}{\tau_{r(BC)}}$$

где $\tau_{(A)}$ и $\tau_{(BC)}$ – время удерживания анализируемого вещества и вещества сравнения соответственно.

Другой вариант заключается в том, что в исследуемую смесь вводят эталонный компонент, наличие которого в этой смеси предполагают. Увеличение высоты соответствующего пика (без его расширения) по сравнению с высотой этого пика на хроматограмме, полученной до введения эталона, может свидетельствовать о присутствии искомого соединения в

анализируемой смеси. Указанный метод прост, но имеет недостатки: необходимость иметь эталоны и то, что все пики, получаемые при разделении на данной колонке, должны соответствовать индивидуальным веществам.

Для количественной оценки хроматограмм можно использовать либо высоту, либо площадь пиков. Выбор метода оценки зависит от вида и характера кривых и от технических возможностей. Высоту пика измерить намного быстрее, чем его площадь. Высота пика сильно зависит от рабочих условий (температуры, скорости передвижения ПФ, размера введенного образца). Поскольку изменение рабочих условий на площади пика сказывается значительно меньше, их не нужно тщательно поддерживать постоянными. Поэтому в настоящее время для оценки результатов разделения пользуются площадями пиков. Измерение площади пиков ранее проводилось следующими способами.

1. Планиметрия. Преимущество данного способа оценки состоит в том, что характер и форма кривой в этом случае не имеют значения. Из-за низкой чувствительности планиметра и особенностей конструкции им нельзя измерить ни слишком большие, ни слишком малые площади. Метод трудоемок, требует много времени и менее точен, чем другие методы (ошибка 4 %).

2. Вырезание и взвешивание пиков. Этот метод используется относительно редко. Как и при планиметрическом определении, форма кривой не имеет значения. Метод требует много времени, но может быть достаточно точным, особенно в случае асимметричных кривых. Однако в этом случае необходимым условием является гомогенность бумаги, постоянство ее толщины и плотности. Недостаток метода – необходимость разрезания хроматограмм. Ошибка примерно ± 2 %.

3. Определение площади пика как произведение его высоты на полуширину, или квадратурование кривой. При использовании этого способа высоту пика умножают на его ширину, измеренную на полувысоте пика.

Эта методика достаточно проста и требует мало времени, но точность результатов определения зависит от формы пика. Этим способом нельзя

определять площади асимметричных пиков или пиков с малой высотой и большим основанием. Ошибка метода примерно $\pm 2,5$ %.

4. Приближение к площади треугольника, или трангуляция. В этом случае площадь пика измеряют как площадь треугольника.

Высоту измеряют от нулевой линии до точки пересечения касательных к точкам перегиба кривой. Методика проста, и высоту таким способом определить легко, но иногда возникает неопределенность в определении точек перегиба. Таким способом нельзя определить площади узких и высоких и асимметричных пиков.

5. Графическое интегрирование. Пик делят на вертикальные полосы равной ширины, высоты которых затем складывают.

6. Электронное или механическое интегрирование. Данный способ используется в современных ВЭЖХ-анализаторах. Начальные параметры анализа и константы вводятся в компьютерную базу данных, которая затем может использоваться. Компьютерная программа производит качественный количественные расчеты и выдает результаты анализа.

Хроматограммы можно количественно оценить либо непосредственно, либо с помощью некоторых видов калибровок.

1. Прямой метод, или нормализация. Этот метод можно применять в тех случаях, когда все компоненты смеси элюируются из колонки. Детектор дает линейные и воспроизводимые данные с одинаковой чувствительностью для всех компонентов.

2. Метод расчета поправочных коэффициентов для пламенно-ионизационного детектора. Приготавливают калибровочную смесь соединений известной массы, и после разделения измеряют площади, соответствующие отдельным компонентам. Далее рассчитывают отношения площадей и масс каждого компонента, одно из отношений принимают за стандартное и все поправочные коэффициенты приводят к этому значению, т. е. поправочные коэффициенты для других соединений получают путем деления их отношений

на отношения для стандарта. Следовательно, полученные коэффициенты являются относительными.

3. *Метод абсолютной калибровки.* В колонку вводят известное количество вещества и рассчитывают площади полученных хроматографических пиков. По полученным данным строят калибровочную кривую зависимости площади пика от соответствующего количества вещества. Калибровочная кривая должна быть линейной и проходить через начало координат. Собственно анализ проводят следующим образом: вводят известное количество анализируемой смеси, устанавливают площади пиков отдельных компонентов, по калибровочной кривой определяют соответствующее количество каждого компонента и переводят его в массовые проценты в соответствии с уравнением:

$$A = \frac{\text{площадь } A \cdot \text{г/см}^2}{\text{г (введенное количество)}} \cdot 100\%$$

Метод абсолютной калибровки имеет ряд недостатков. В частности, необходимо точно определить массу вводимого в колонку образца, условия разделения должны быть строго постоянными, длительность анализа.

4. *Метод внутреннего стандарта.* Приготавливают смеси, содержащие чистый анализируемый компонент и внутренний стандарт в различных соотношениях, хроматографируют их, определяют площади полученных пиков и строят калибровочную кривую зависимости отношения площадей пиков от отношения масс компонентов и стандарта. Анализ проводят следующим образом: известное количество внутреннего стандарта добавляют к известному количеству образца и смесь хроматографируют, измеряют площади пиков, рассчитывают их отношение и по калибровочной кривой определяют соотношение масс стандарта и анализируемого компонента. Поскольку количество добавленного стандарта известно, содержание компонента можно рассчитать из отношения. Метод внутреннего стандарта имеет следующие преимущества: не нужно измерять точно количество вводимого образца, не нужно определять величину отклика детектора или поддерживать ее строго

постоянной, поскольку определяются не абсолютные величины, а их отношения. Основной недостаток данного метода – трудность подбора подходящего внутреннего стандарта. Пик внутреннего стандарта должен быть полностью отделен от пиков других соединений, но в то же время он должен располагаться достаточно близко от пика определяемого соединения, концентрация стандарта должна быть приблизительно такой же, как и концентрация определяемого компонента, и, наконец, стандарт должен быть структурно похож на анализируемое соединение. В случае сложных смесей можно добавлять два и более внутренних стандартов.

5. *Метод стандартной добавки.* Этот метод аналогичен описанному выше. Он отличается лишь тем, что добавляемый стандарт является одним из компонентов смеси. Этот метод используется главным образом в тех случаях, когда невозможно, например, из-за плохого разрешения, подобрать какое-либо другое соединение.

9. ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

По сравнению с другими классами химических соединений (промышленными химическими продуктами, нефтепродуктами, пестицидами и др.) изучение лекарственных препаратов является той научно-практической областью, в которой внедрение ВЭЖХ происходит наиболее интенсивно. Показательную информацию в этом отношении представляет библиографический раздел ведущего в области хроматографии периодического издания – *Journal of Chromatography*.

В течение последних 25–30 лет ВЭЖХ стала наиболее востребованным методом при проведении фармацевтического анализа, официальным методом, включенным практически во все современные фармакопеи, в том числе в Государственную фармакопею, Фармакопею США, Британскую Фармакопею, Фармакопею Японии, Международную Фармакопею и рекомендуется ими для определения подлинности, количественного содержания, однородности дозирования, чистоты и стабильности различных фармацевтических объектов.

Перечень условий хроматографирования, подлежат указанию в фармакопейной статье. Должны быть приведены: полное коммерческое наименование колонки с указанием производителя и каталожного номера, размеры колонки (длина и внутренний диаметр), типа сорбента с указанием размера частиц, размера пор, температура колонки, объем вводимой пробы, состав подвижной фазы и способ ее приготовления, скорость подачи подвижной фазы, тип детектора и условия детектирования, описание градиентного режима (если используется), время хроматографирования, подробное описание методики и формулы расчета, описания приготовления стандартных и испытуемых растворов.

Количественный анализ и определение подлинности эналаприла малеата.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ НА ПРЕПАРАТ «ЭНАП» ТАБЛЕТКИ 10 мг.

Нормативный документ устанавливает содержание эналаприла малеата в пределах 95,0 % – 105,0 % от заявленного количества.

Метод: Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), с использованием метода внешнего стандарта.

Оборудование: Жидкостной хроматограф с переменным УФ-детектором и колонкой с термостатом.

Стандарты:

1. Эналаприл малеат: основной рабочий стандарт.

Растворители и реагенты:

1. Вода: очищенная, для ВЭЖХ.

2. Ацетонитрил, CH_3CN : ацетонитрил R1 (Европ. фармакопея, для ВЭЖХ)

3. Калия дигидрофосфат, KH_2PO_4 : для ВЭЖХ.

4. Фосфорная кислота H_3PO_4 ; мин. 85%, ч.д.а.

5. Фосфатный буфер pH 2,0: Приготовление. Взвесить 136 мг KH_2PO_4 перенести в мерную колбу объемом 1000 мл, растворить в 800 мл воды, довести pH раствора до 2,0 фосфорной кислотой и разбавить водой до метки. Перемешать и отфильтровать полученный раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

6. Растворитель: фосфатный буфер pH 2,0.

Хроматографические условия:

Колонка: Hypersil BDSC-18, частицы 3 мкм, 100 мм x 4 мм, с предколонкой для обратной фазы.

Примечание: Может использоваться равноценная колонка, наполненная обратной фазой КР С 18 (октадецил силан) с пониженной активностью. При необходимости можно слегка корректировать скорость и/или состав подвижной фазы до достижения пригодности хроматографической системы.

Температура колонки: 70 °С.

Подвижная фаза: фосфатный буфер pH 2,0 : ацетонитрил = 17:8 (V/V).

Перед использованием фильтруют подвижную фазу через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют ее (с помощью ультразвука или гелия).

Скорость: около 1,5 мл/мин.

Обнаружение: УФ-детектор, длина волны 215 нм.

Растворы для ВЭЖХ измерений:

Стандартный раствор 0.2 мг эналаприла малеата/мл.

Приготовление. 10 мг (точная навеска) стандарта эналаприла малеата переносят в мерную колбу на 50 мл, растворяют в растворителе и доводят растворителем до метки:

Испытуемый раствор 0,2 мг эналаприла малеата/мл.

Приготовление. 10 таблеток помещают в мерную колбу объемом 500 мл, прибавляют 400 мл растворителя и воздействуют ультразвуком до полной распадаемости таблеток. Охлаждают до комнатной температуры, доводят растворителем до метки и хорошо перемешивают. Центрифугируют часть суспензии при 3000 об/мин в течение 10 минут. Прозрачный центрифугат является испытуемым раствором. При необходимости фильтруют центрифугат через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм: 0,2 мг эналаприла малеата/мл).

Испытание пригодности хроматографической системы.

В уравновешенную хроматографическую систему вводят 5 раз по 10 мкл стандартного раствора. На хроматограмме этого раствора пик эналаприла следует за пиком малеиновой кислоты. На основании полученной хроматограммы вычисляют коэффициент разделения R между пиками малеиновой кислоты и эналаприла и относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика эналаприла для пяти повторных введений стандартного раствора. Хроматографическая система должна удовлетворять следующим критериям:

- 1) Коэффициент разделения R – не менее 5.
- 2) Воспроизводимость, $RSD\%$ ($n=5$) – не более 2,0 %.

Хроматографический анализ.

После проверки пригодности хроматографической системы выполняют калибровку для эналаприла малеата, используя метод внешнего стандарта. Затем вводят 10 мкл испытуемого раствора. Записывают хроматограмму и отмечают характеристики (время удерживания и площадь пика) эналаприла.

Определение подлинности эналаприла малеата проводят по времени удерживания пика эналаприла на хроматограмме испытуемого раствора, полученной при количественном определении методом ВЭЖХ, соответствует времени удерживания пика эналаприла на хроматограмме стандартного раствора, полученной в тех же условиях.

Содержание эналаприла малеата вычисляют содержание эналаприла малеата в % относительно заявленного количества по формуле:

$$\text{Содержание эналаприла малеата в \%} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot S_{\text{ир}} \cdot P \cdot V_{\text{мк}} \cdot 100}{S_{\text{ст}} \cdot A \cdot m}$$

$C_{\text{ст}}$ – концентрация эналаприла малеата в стандартном р-ре, в мг/мл;
 $S_{\text{ст}}$ – площадь пика эналаприла на хроматограмме испытуемого раствора;
 $S_{\text{ир}}$ – площадь пика эналаприла на хроматограмме стандартного раствора;
 $V_{\text{мк}}$ – объем мерной колбы, в мл;
 m – масса 10 целых таблеток, используемых для приготовления испытуемого раствора, в мг;
 A – заявленное количество эналаприла малеата в одной таблетке, в мг;
 P – средняя масса таблетки, в мг;
100 – коэффициент пересчета, в %.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. ОБОЗНАЧЕНИЕ СОРБЕНТА C_{18} УКАЗЫВАЕТ НА ТО, ЧТО

- 1) сорбент имеет массу 18 грамм
- 2) сорбент может быть использован 18 раз
- 3) сорбент состоит из 18 атомов углерода
- 4) на сорбенте привиты углеводородные цепочки длиной 18 атомов углерода

2. В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ КОЛОНКИ ДЛИНОЙ

- 1) до 10 м
- 2) от 10 мм до 20 мм
- 3) от 15 до 30 см
- 4) 1 м

3. В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ КОЛОНКИ ДИАМЕТРОМ

- 1) до 2 мм
- 2) 2–10 мм
- 3) от 0,1 м до 1 м
- 4) от 1 м и более

4. ТЕМПЕРАТУРА КОЛОНКИ В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СОСТАВЛЯЕТ

- 1) от 10°C до 20°C
- 2) от 30°C до 40°C
- 3) порядка $18\text{--}20^{\circ}\text{C}$
- 4) около 0°C

5. ФОРМА КОЛОНКИ В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРЕСТАВЛЯЕТ СОБОЙ

- 1) спираль
- 2) окружность
- 3) квадрат
- 4) прямую

6. ПОДАЧУ РАСТВОРИТЕЛЯ ИЗ РЕЗЕРВУАРА ОСУЩЕСТВЛЯЕТ

- 1) насос
- 2) детектор
- 3) термостат

4) регистрирующее устройство

7. МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ МОЖНО РАЗДЕЛИТЬ

- 1) да
- 2) нет
- 3) смесь, состоящую из различных газов

8. ВЫБЕРИ ВЕРНОЕ

- 1) для ВЭЖХ существует проблемы летучести анализируемого препарата
- 2) для ВЭЖХ не существует проблема летучести анализируемого препарата
- 3) для ВЭЖХ не существует проблема работы с водными растворами
- 4) для ВЭЖХ не существует проблема определения подлинности лекарственных веществ

9. В ВАРИАНТЕ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ОБРАЩЕННЫМИ ФАЗАМИ ПОЯВЛЯЕТСЯ ВОЗМОЖНОСТЬ РАБОТАТЬ

- 1) неполярными растворами
- 2) бензольными растворами
- 3) водными растворами
- 4) газовыми смесями

10. ДЕТЕКТОРЫ В МЕТОДЕ ВЭЖХ ПОДРАЗДЕЛЯЮТСЯ

- 1) общие и частные
- 2) групповые и частные
- 3) универсальные и специфические
- 4) селективные и общие

11. УКАЖИТЕ РАСТВОРИТЕЛЬ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В КАЧЕСТВЕ ЭЛЮЕНТА

- 1) диэтиловый эфир
- 2) бензол
- 3) ацетонитрил
- 4) толуол

12. ЧАЩЕ ВСЕГО В КАЧЕСТВЕ АДсорбента в ВЭЖХ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ

- 1) силикагель
- 2) окись алюминия
- 3) полиамиды

13. ПРОЦЕСС ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ ФИКСИРУЕТСЯ

- 1) детектором
- 2) регистрирующим устройством
- 3) насосом
- 4) хроматографической колонкой

14. ОБРАЩЕННО-ФАЗНЫЙ ВАРИАНТ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРЕДУСМАТРИВАЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

- 1) не полярного сорбента
- 2) полярного сорбента
- 3) как полярного, так и неполярного сорбента
- 4) смеси полярного и неполярного сорбента

15. СОЕДИНЕНИЯ, КОТОРЫЕ В СИЛЬНОПОЛЯРНЫХ ЭЛЮЕНТАХ ХОТЯ БЫ ЧАСТИЧНО ДИССОЦИИРУЮТ, РАЗДЕЛЯЮТ С ПОМОЩЬЮ

- 1) распределительной хроматографии
- 2) ионообменной хроматографии
- 3) абсорбционной хроматографии
- 4) аффинной хроматографии

Выберите несколько правильных ответов.

16. ОБРАЩЕННОФАЗНЫЙ ВАРИАНТ ХРОМАТОГРАФИИ ИМЕЕТ СЛЕДУЮЩИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА

- 1) редко наблюдается эффект необратимой сорбции
- 2) быстро устанавливается равновесие
- 3) легче подобрать подвижную фазу
- 4) вода оказывает меньше влияние на результаты хроматографирования

17. С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ МОЖНО УСТАНОВИТЬ

- 1) подлинность лекарственного средства
- 2) наличие примесей в лекарственном средстве
- 3) количественное содержание вещества в препарате
- 4) наличие примеси воды

18. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНУЮ ЖИДКОСТНУЮ ХРОМАТОГРАФИЮ УДОБНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ

- 1) термолабильных веществ
- 2) газообразных веществ
- 3) полярных веществ
- 4) гидрофильных веществ

19. В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ИСПОЛЬЗУЮТ СЛЕДУЮЩИЕ ВАРИАНТЫ

- 1) обратнофазную
- 2) обращеннофазную
- 3) противофазную
- 4) прямофазную

20. СИЛА УДЕРЖИВАНИЯ ВЕЩЕСТВА НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКЕ ЗАВИСИТ ОТ

- 1) количества веществ в исследуемой пробе
- 2) стерического фактора
- 3) природы вещества
- 4) свойств подвижной фазы

21. ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) абсолютную калибровку
- 2) метод нормализации
- 3) метод внутреннего стандарта
- 4) метод замены

22. В КАЧЕСТВЕ КОЛОНОК В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) трубки из нержавеющей стали
- 2) стеклянные трубки
- 3) танталовые трубки
- 4) фарфоровые трубки

23. ПРИ ВЫБОРЕ ЭЛЮЕНТА СЛЕДУЕТ УЧИТЫВАТЬ ТАКИЕ СВОЙСТВА КАК

- 1) химическая инертность
- 2) вязкость
- 3) поглощение в УФ-области
- 4) окраска

24. СПОСОБЫ ПОДАЧИ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ В МЕТОДЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

- 1) изократический
- 2) градиентного элюирования
- 3) капельный
- 4) струйный

25. ЭЛЮЭНТ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ, ДОЛЖЕН

- 1) растворять исследуемую пробу

- 2) не растворять исследуемую пробу
- 3) отличаться летучестью
- 4) иметь высокую температуру кипения

26. ДОСТОИНСТВАМИ МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) высокая разделяющая способность
- 2) малые затраты времени
- 3) мягкие условия разделения
- 4) высокая стоимость

Установите соответствие.

27. УСТАНОВИТЕ СООТВЕТСТВИЕ МЕЖДУ ДЕТЕКТОРОМ И ПРИНЦИПОМ ЕГО РАБОТЫ.

<i>Детектор</i>	<i>Принцип работы</i>
А) ультрафиолетовый Б) полярографический В) флуориметрический	1) окислительно-восстановительные процессы 2) поглощение в УФ-области 3) излучение при облучении УФ-светом

28. УСТАНОВИТЕ СООТВЕТСТВИЕ МЕЖДУ ВАРИАНТОМ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА МЕТОДОМ ВЭЖХ И ПРИНЦИПОМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ.

<i>Вариант</i>	<i>Принцип</i>
А) нормализация Б) абсолютная калибровка В) внутреннего стандарта	1) вводят известное количество вещества и рассчитывают площадь пика 2) смесь содержит анализируемое вещество и внутренний стандарт 3) все компоненты выходят из колонки

Дополните предложение

29. НЕУСТОЙЧИВОСТЬ К ВЫСОКОМУ ДАВЛЕНИЮ ХАРАКТЕРНА ДЛЯ ... ТРУБОК.

Дополните предложение.

30. ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НЕПОЛЯРНОГО СОРБЕНТА И ПОЛЯРНОГО ЭЛЮЕНТА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ ... ВАРИАНТ.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. – 4	11. – 3	21. – 1, 2, 3
2. – 1	12. – 1	22. – 1, 2, 3
3. – 2	13. – 2	23. – 1, 2, 3
4. – 2	14. – 1	24. – 1, 2
5. – 4	15. – 2	25. – 1, 3
6. – 1	16. – 1, 2, 3, 4	26. – 1, 2, 3
7. – 2	17. – 1, 2, 3	27. – А2, Б1, В3
8. – 2	18. – 1, 3, 4	28. – А3, Б1, В2
9. – 3	19. – 2, 4	29. – стеклянных
10. – 3	20. – 2, 3, 4	30. – обращеннофазный

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Плетенева, Т. В. Фармацевтическая химия : учебник / под ред. Т. В. Плетеневой – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 816 с. – ISBN 978-5-9704-4014-8. – Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. – URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970440148.html> (дата обращения: 20.10.2023). – Режим доступа : по подписке.

2. Сливкин, А. И. Фармацевтическая химия. Сборник задач / А. И. Сливкин [и др.] ; под ред. Г. В. Раменской – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 400 с. – ISBN 978-5-9704-3991-3. – Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. – URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970439913.html> (дата обращения: 20.10.2023). – Режим доступа : по подписке.

Дополнительная

1. Краснов, Е. А. Фармацевтическая химия в вопросах и ответах / Е. А. Краснов, Р. А. Омарова, А. К. Бошкаева – Москва : Литтерра, 2016. – 352 с. – ISBN 978-5-4235-0149-5. – Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. – URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785423501495.html> (дата обращения: 20.10.2023). – Режим доступа : по подписке.

Учебное издание

**Илларионова Елена Анатольевна
Сыроватский Игорь Петрович**

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ
ХРОМАТОГРАФИЯ.
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ. ПРАКТИЧЕСКОЕ
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА**

Учебное пособие