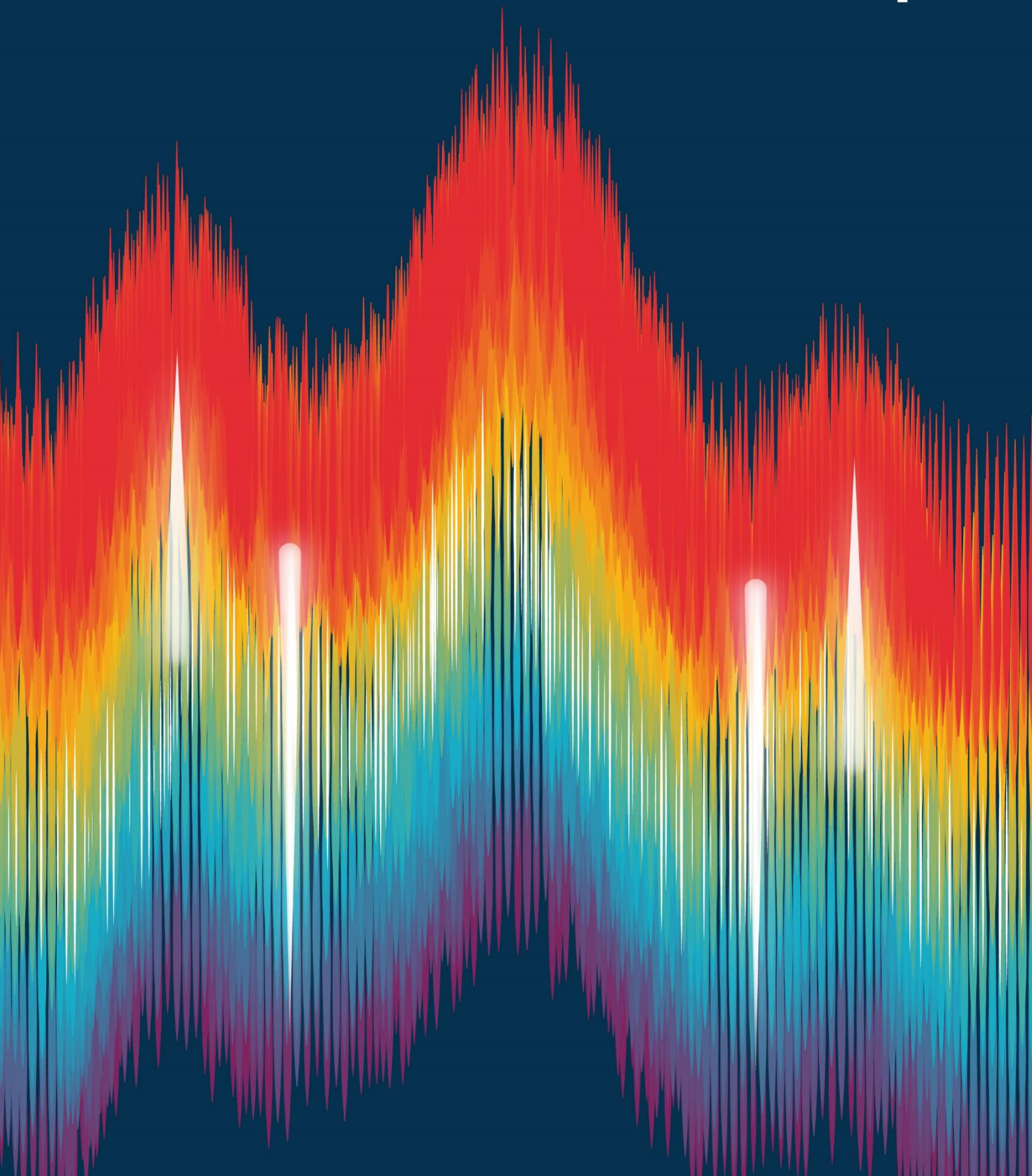
ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ У ФАРМАЦІЇ



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ У ФАРМАЦІЇ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

Самостійне електронне навчальне видання

Харків
НФаУ
2025

УДК 543.544:615.1(075.8)
Х 94

Автори: В. А. Георгіянц, Н. М. Смєлова, Г. В. Григорів, О. А. Євтіфєєва, І. В. Безрук, В. А. Чорний, К. А. Таран, О. В. Грудько, О. С. Головченко

Рецензенти:

Л. С. Логойда, доктор фармацевтичних наук, професор, завідувачка кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського;

Р. Б. Лесик, доктор фармацевтичних наук, професор, завідувач кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

Рекомендовано
вченою радою Національного фармацевтичного університету
(протокол № 6 від 26.06.2024 р.)

Хроматографічні методи у фармації : навчальний посібник / Х 94 В. А. Георгіянц, Н. М. Смєлова, Г. В. Григорів та ін. — Самост. електрон. навч. вид. — Харків : НФаУ, 2025. — 334 с. (10,5 авт. арк.)

ISBN 978–966–615–632–0 (PDF)

У навчальному посібнику охарактеризовано сучасні хроматографічні методи, що застосовуються для аналізу лікарських засобів, їх матеріально-технічне забезпечення. Наведено теоретичні основи та продемострировано приклади застосування хроматографічних методів у наукових дослідженнях відповідно до сучасних вимог.

Навчальний посібник призначений для здобувачів другого (магістерського) і третього (наукового) рівнів освіти за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація».

УДК 543.544:615.1(075.8)

© Георгіянц В. А., Смєлова Н. М., Григорів Г. В., Євтіфєєва О. А., Безрук І. В., Чорний В. А., Таран К. А., Грудько О. В., Головченко О. С., 2025
© НФаУ, 2025

ISBN 978–966–615–632–0 (PDF)

ПЕРЕДМОВА

Сучасні хроматографічні методи у фармації мають непересічне значення. Їх використання в лабораторіях з контролю якості лікарських засобів дозволяє зробити фармацевтичний аналіз швидким та ефективним із можливістю застосування для широкого кола сполук різної хімічної природи та одержання достовірних результатів. Використання цих методів стало буденним, зокрема й у наукових дослідженнях, що стосуються фармацевтичних розробок та аналізу.

Варто зазначити, що Державна фармакопея України першого видання містить монографії, присвячені цим методам аналізу, а монографії на конкретні активні фармацевтичні інгредієнти також часто посилаються на ці методи.

Навчальний посібник системно та докладно розкриває усі базові теоретичні знання, необхідні для практичного опанування та застосування хроматографічних методів у фармації, зокрема у наукових дослідженнях.

У першому розділі розглянуто теоретичні основи методів, наведена історична довідка, класифікація та основні різновиди хроматографічних технік.

Наступні розділи послідовно розглядають хроматографічні методи, які на сучасному етапі найбільш часто використовуються у фармацевтичному аналізі та наукових дослідженнях, а саме: планарна (площинна) хроматографія (паперова, тонкошарова та високоефективна тонкошарова хроматографія), високоефективна рідинна хроматографія, методи іонної, іоннообмінної та ексклюзійної хроматографії, а також газова хроматографія. Кожен розділ містить перелік контрольних питань для самоконтролю здобувачів освіти, глосарій з основними термінами, що стосуються методу, і тестові питання для підготовки до практичних занять.

Викладення теоретичного матеріалу супроводжується довідковим матеріалом (монографії ДФУ) та прикладами застосування хроматографічних методів у наукових дослідженнях і послідовністю валідації методик.

Отже, навчальний посібник є виданням, що містить вичерпну інформацію для здобувачів освіти та науковців, дозволяє у доступній формі опанувати базові теоретичні знання та отримати необхідне підґрунтя для подальшого практичного застосування на заняттях й у наукових дослідженнях.

РОЗДІЛ 1

ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ РОЗДІЛЕННЯ ТА АНАЛІЗУ

Тема 1. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ РОЗДІЛЕННЯ ТА АНАЛІЗУ (ХРОМАТОГРАФІЯ)

ГЛОСАРІЙ

Рухома фаза — це фаза у хроматографії, яка рухається через нерухому фазу, переносячи аналізовані компоненти.

Нерухома фаза — це фаза у хроматографії, яка залишається нерухомою під час проходження рухомої фази і взаємодії з аналізованими компонентами.

Аналізована суміш — це зразок або зразки, що піддаються хроматографічному аналізу.

Селективність у хроматографії — це здатність методу розділити аналітичні компоненти у зразку на основі їхніх хімічних властивостей і взаємодії зі стаціонарною фазою.

Чутливість у хроматографії — це можливість методу виявити й кількісно визначити аналізовані компоненти за низьких концентрацій у зразку.

Сорбція — це процес поглинання або затримання молекул або іонів зразка на поверхні або в порах стаціонарної фази.

Десорбція — це процес звільнення раніше поглинутих або затриманих молекул або іонів з поверхні або пор стаціонарної фази.

Адсорбція — це процес акумуляції молекул або іонів на поверхні стаціонарної фази.

Абсорбція — це процес проникнення молекул або іонів усередину стаціонарної фази.

Хроматографія — це сукупність фізико-хімічних методів аналізу, яка поєднує у собі як методи концентрування і розділення, так і методи ідентифікації та кількісного визначення різноманітних речовин. Хроматографічні методи посідають особливе місце з-поміж ефективних методів аналізу та широко використовуються, оскільки дозволяють провести аналіз складних неорганічних та органічних сполук. Новітніми хроматографічними методами можна провести дослідження речовин, що перебувають у газоподібному, твердому та рідкому агрегатному станах.

Хроматографія може використовуватися для отримання чистих сполук (препаративна хроматографія), кількісного та якісного визначення розділених компонентів (хроматографічний аналіз), а також для визначення їх фізико-хімічних характеристик.

Хроматографія — це гібридний аналітичний метод, у якому поєднуються метод розділення і метод визначення. Розділення може ґрунтуватися на адсорбції, розподілі, іонному обміні, їх комбінації тощо або на відмінностях у фізико-хімічних властивостях молекул (розмір, маса, об'єм тощо).

1.1. СКЛАДОВІ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ПРОЦЕСУ: РУХОМА ТА НЕРУХОМА ФАЗИ

Розділення сумішей речовин у хроматографічних методах ґрунтується на різному розподілі компонентів між двома фазами, що не змішуються, одна з яких — рухома фаза, а інша — нерухома.

Примітка! В будь-якому з варіантів хроматографії наявність двофазної системи (рухома фаза + нерухома фаза) є обов'язковою!

Нерухома фаза за агрегатним станом може бути твердою або рідкою, нанесеною на твердий носій або гель. Вона може бути поміщена в колонку, нанесена як шар або як плівка. Функція нерухомої фази — сорбувати, утримувати речовини.

Рухома фаза може бути представлена газом чи рідиною або флюїдом (газом у надкритичному стані). Рухома фаза проходить (фільтрується) крізь шар сорбенту. Функція рухомої фази — розчиняти в собі аналізовані речовини і переміщувати їх. Рухому фазу, що проходить вздовж шару нерухомої фази, називають *елюентом*, а рухому фазу, що виходить із сорбенту і містить розділені компоненти, — *елюатом*.



Рис. 1.1. Обов'язкові складові компоненти хроматографічного процесу

Залежно від хроматографічного методу тип рухомої та нерухомої фаз відрізняється. Так, наприклад, у методах колонкової хроматографії нерухома фаза поміщена у колонку (скляну чи металічну трубку), а рухомою фазою є рідина (один або суміш кількох розчинників) або газ, що переміщується за рахунок різниці тиску на кінцях цієї трубки.

Розділення компонентів у хроматографічній колонці зумовлене тим, що речовини *по-різному утримуються у нерухомій фазі.* Залежно від сили взаємодії з поверхнею нерухомої фази компоненти суміші переміщаються уздовж колонки з різною швидкістю, яка зумовлює їх *селективне сповільнення.* Одні компоненти сильніше утримуються нерухомою фазою, інші мають менший ступінь взаємодії. Таким чином *компоненти розділяються.*

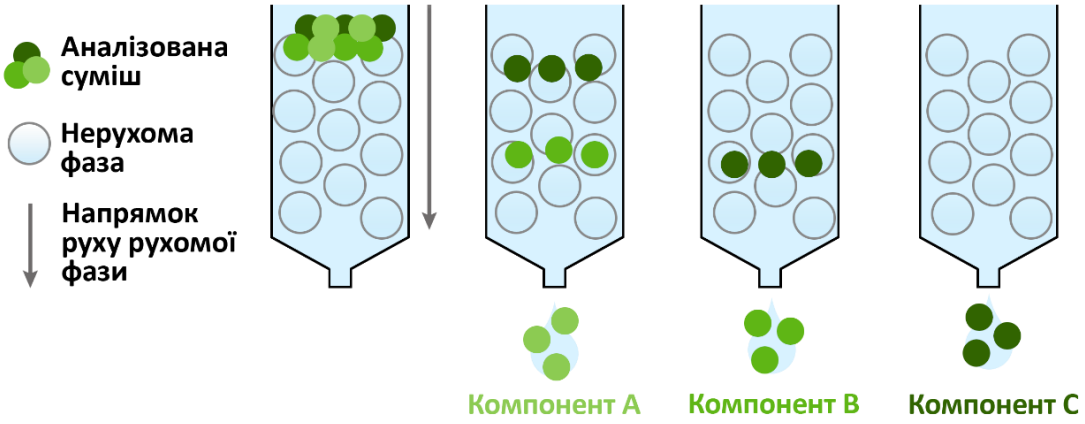


Рис. 1.2. Схематичне зображення процесу розділення речовин у хроматографічних методах

1.2. ЗАГАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДІВ

Усі сучасні хроматографічні методи мають низку загальних характеристик. ***Характерними особливостями*** будь-яких хроматографічних методів є:

✓ *Селективність.* Різні типи хроматографії можуть бути використані для розділення речовин залежно від їх хімічних властивостей, таких, як полярність, розмір, заряд тощо. Це дає можливість обрати метод, що найкраще підходить для конкретних досліджень.

✓ *Чутливість.* Хроматографія може бути використана для виявлення та аналізу навіть дуже малих кількостей речовин у зразку.

✓ *Роздільна здатність.* Умови хроматографічного визначення можуть бути налаштовані так, щоб забезпечити високу роздільну здатність між компонентами суміші. За допомогою хроматографії можна виділити компоненти із суміші та аналізувати їх окремо.

✓ *Висока відтворюваність.* Хроматографічні методи можуть бути відтворені з високим ступенем точності та репродуктивності за правильних умов.

✓ *Можливість виділення для подальшого дослідження та використання.* Деякі хроматографічні методи дозволяють зберігати розділені компоненти для подальших досліджень або використання.

✓ *Широкий спектр застосувань.* Хроматографія використовується у різних галузях, включаючи аналітичні, фармацевтичні, хімічні, біохімічні дослідження, аналіз харчових продуктів тощо.

Загалом хроматографічні методи є потужними й універсальними методами аналізу, розділення та очищення речовин і мають широкий спектр застосування у різноманітних галузях.

1.3. ІСТОРІЯ СТАНОВЛЕННЯ ТА РОЗВИТКУ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДІВ

Хроматографічні явища відомі досить давно. У часи Арістотеля вони не мали такої назви, але саме принципи сучасної хроматографії використовувались для очищення морської води від солей із застосуванням певних різновидів ґрунтів. У Середні віки люди використовували здатність деревного вугілля знебарвлювати розчини, а в XIX столітті той самий принцип застосували для очищення соку цукрового буряка.

Однак лише на початку XX століття ці явища почали вивчати систематично і поступово вони перетворились на незамінний інструмент аналітичної хімії.

Науковцем, який офіційно відкрив хроматографічні методи та запропонував термін «хроматографія», став учений-ботанік Михайло Семенович Цвєт. Цікаво, що він не ставив перед собою глобальних цілей, натомість займався вивченням рослинних пігментів, отриманих з хлоропластів.

У 1903 році він виступив з доповіддю у Варшавському товаристві природодослідників. Виступ мав назву «Про нову категорію адсорбційних явищ і про застосування їх до біохімічного аналізу». Саме в цій праці Михайло Семенович вперше докладно описав метод адсорбційного хроматографічного аналізу.

Річ у тому, що він намагався розділити зелений пігмент рослин – хлорофіл – на компоненти. Задля цього науковець пропускав досліджуваний розчин крізь скляну трубку, заповнену твердим сорбентом. Власне сорбент був доволі простий, а саме крейда (кальцію карбонат). Для екстрагування пігментів з рослинної сировини науковець використав органічний розчинник (бензен). Одержаний екстракт він повільно вводив у скляну трубку, яка містила сорбент. Останній поглинав хлорофіл, а у верхній частині трубки можна було спостерігати зону поглиненої (сорбованої) речовини. На цьому етапі розділення пігментів ще не спостерігалось. Надалі вчений промивав трубку з крейдою бензеном. Компоненти екстракту переміщалися трубкою з різною швидкістю, внаслідок чого утворювались окремі зони, забарвлені в різні кольори. Після того, як компоненти повністю розділялись, вологий адсорбент виштовхували з трубки, розрізали на частини та екстрагували окремі компоненти для подальших досліджень.



Рис. 1.3. Схема хроматографічного розділення
хлорофілу за М. С. Цвєтом

Михайло Цвєт назвав різнобарвну картинку, яку він спостерігав у результаті свого експерименту, *хроматограмою*, а самому методу дав назву «хроматографічний адсорбційний аналіз, або *хроматографія*». Назву він підібрав дуже цікаво. З одного боку, термін «хроматографія» перекладається з грецької мови як «χρώμα, латиніз. хрома» та означає «колір», а термін «графо» має значення «пишу». Тобто мова йде про розділення забарвлених речовин. Водночас термін «колір» є українським перекладом прізвища науковця. Тож досліднику почали закидати, що він назвав метод на власну честь. Все-таки назва закріпилась, хоча варто зазначити, що метод придатний також і для розділення та ідентифікації безбарвних речовин. Про це у наукових працях згадував його винахідник.

Протягом наступних років Михайло Цвєт займався удосконаленням свого методу. Він дав його докладне теоретичне обґрунтування, описував обладнання та техніку дослідження, показував можливості застосування на практиці. Однак за життя дослідника метод не став популярним і фактично був забутий за декілька років.

Новий етап у розвитку хроматографічних методів аналізу почався у 1931 році. У цей час дослідники Р. Кун, А. Вінтерштейн та Є. Ледерер проводили дослідження з використанням різноманітних рослинних та тваринних пігментів. Вони звернулись до наукових праць Михайла Цвєта та почали їх удосконалювати та розвивати.

Варто зазначити, що до цих праць практично одночасно звернулись науковці з різних країн. Наприклад, японський дослідник В. Кошара, на відміну від М. С. Цвєта, також спостерігав розділення зон на сорбенті та проявляв їх, але потім не виштовхував вологий сорбент з колонки. Натомість він продовжував подачу рідини в колонку доти, доки всі компоненти не виходили з неї почергово. Таким чином він одержав хроматограму в елюаті (тобто зібраному з колонки розчиннику). В окремих фракціях можна було надалі одразу проводити якісне та кількісне визначення індивідуальних речовин.

У 1940 році шведським ученим А. Тизеліусом були розроблені фронтальний та витискувальний хроматографічні методи.

Водночас розпочався розвиток інших напрямів хроматографії. Так, одними з розробок того часу стала паперова та тонкошарова хроматографія (ТШХ). Початок методу ТШХ закладено науковими працями радянських учених М. А. Ізмайлова та М. С. Шрайбер у 1938 році. Набувала поширення також іонообмінна хроматографія.

Одним із вирішальних та важливих етапів у розвитку цих методів після праць Михайла Цвєта вважається розробка методу розподільної хроматографії. Цей винахід здійснили англійський хімік А. Мартін та його співробітники Р. Сіндж та А. Джемс.

У 1941 році вони опублікували наукову працю, в якій описали метод розділення амінокислот на колонках з силікагелем, який був просочений водою.

У цьому методі процес розділення ґрунтувався не на адсорбції, а на розчиненні речовини в нерухомій фазі (в цьому випадку вона була водною), а точніше, відбувався розподіл компонентів аналізованої суміші між двома рідинами. Нерухома фаза була водною, а як рухома фаза був використаний органічний розчинник. Різниця в розподілі інгредієнтів суміші між двома рідинами визначала здатність методу до розділення речовин.

У 1941 році Мартін та Сіндж опублікували працю з розподільної хроматографії та вперше виклали загальну теорію хроматографії. Як фізичну модель для неї вони використали відомий процес дистиляції, додали концепцію теоретичних тарілок та зробили припущення, що поєднання газової рухомої фази та рідкої нерухомої фази надасть переваги для розділення речовин. Науковці сформулювали свої думки так: «Рухома фаза не обов'язково повинна бути рідиною, вона може бути і парою… Ефективність контакту між фазами (число теоретичних тарілок на одиницю довжини колонки) в хроматографії значно вища, ніж в звичайних дистиляційних чи екстракційних колонках. Тому можливе дуже чітке розділення летких речовин в колонці, якщо пропускати газ через гель, просочений нелетким розчинником…»

За розробку розподільної хроматографії та її різновидів Мартін та Сіндж у 1952 році були нагороджені Нобелівською премією.

У 1944 році Мартін зі співробітниками Р. Консденом і А. Гордоном на прикладі розділення амінокислот запропонували варіант розподільної хроматографії на папері (папір також був просочений водою).

Новим етапом для цього методу стали 1951–1952 роки, коли А. А. Жуховицький та його колеги запропонували хроматермографічний метод для аналізу суміші газів. Він ґрунтувався на різній сорбції газів у хроматографічній колонці за зміни температурного режиму. Водночас Мартін і Джемс запропонували метод газорідинної хроматографії за передбаченнями, зробленими ще на десятиліття раніше їх науковою групою.

На додачу до класичної теорії хроматографії Мартіна та Сінджа (теорія тарілок) датські хіміки Ван-Деємтер, Клінкенбер та Зюйдервег у 1956 році запропонували кінетичну теорію хроматографії.

Ця теорія одержала подальший розвиток в наукових працях американського хіміка Дж. Калвіна Гіддінгса. Вона була розроблена для колонкової хроматографії.

Варто також зазначити, що значний внесок до теорії та практики хроматографічних методів у різний час зробили науковці: Н. А. Шилов, М. М. Дубінін, К. В. Чмутов,

О. М. Тодос, Е. Н. Гапон, Т. Б. Гапон, Н. А. Фукс, В. В. Рачинський, М. М. Сенявін, К. М. Салдадзе, Г. Л. Старобинець, В. Г. Березкін, К. М. Ольшанова, В. І. Горшков, Б. В. Айвазов та інші.

У наш час продовжується розвиток та вдосконалення хроматографічних методів аналізу. Щороку публікуються сотні наукових праць, присвячених цим методам, а їх широке практичне застосування також є підґрунтям для нових відкриттів у цій сфері.

1.4. ПОНЯТТЯ «ХРОМАТОГРАФІЯ»

На сьогоднішній день не існує єдиного визначення терміна «хроматографія». Основні поняття, що стосуються хроматографії, а також галузі їх застосування були систематизовані та уніфіковані спеціальною комісією ІЮПАК, відповідно до рекомендацій якої термін «хроматографія» має три значення та використовується для позначення спеціального розділу хімічної науки, процесу, а також методу.

Хроматографія — це наука про міжмолекулярні взаємодії і перенесення молекул або частинок у системі фаз, що не змішуються і рухаються одна відносно одної; це процес диференційованого багаторазового перерозподілу речовин або частинок між фазами, що не змішуються і рухаються відносно одна одної, що сприяє до відокремленню концентраційних зон індивідуальних компонентів вихідних сумішей цих речовин або частинок; це метод розділення сумішей речовин або частинок, заснований на відмінностях у швидкостях їх переміщення у системі фаз, що не змішуються і рухаються одна відносно одної.

1.5. ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ РОЗДІЛЕННЯ У ХРОМАТОГРАФІЇ

Основні механізми розділення у хроматографії — це ***сорбція, розподіл, іонний обмін, утворення малорозчинних сполук і міграція.*** На практиці часто відбувається декілька механізмів розділення одночасно, наприклад, адсорбційно-розподільний, адсорбційно-ексклюзійний тощо.

І. Сорбція. Особливістю сучасних хроматографічних методів є багаторазове повторення актів сорбції та десорбції, що відбуваються під час переміщення речовини в потоці рухомої фази вздовж нерухомої. Цей процес стає ефективним за рахунок великої поверхні розподілу фаз.

Сорбція — це фізико-хімічний процес поглинання речовини (*сорбату*), що перебуває в рідкій або газовій фазі, іншою речовиною (твердю або рідкою за агрегатним станом), яка називається *сорбентом*. Сорбент у хроматографії використовується як нерухома фаза. Зворотний процес виходу речовини із сорбенту називається *десорбцією* і здійснюється за рахунок взаємодії з рухомою фазою.

Сорбція поділяється на *адсорбцію* та *абсорбцію*.

Адсорбція — це процес накопичення однієї речовини на поверхні іншої або поглинання молекул з газового чи рідкого середовища поверхнею (зовнішньою і внутрішньою) твердої речовини. Речовину, на поверхні якої відбувається концентрування іншої речовини, називають *адсорбентом*, а речовину, яка вилучається з газової або рідкої фази й утримується на поверхні — *адсорбатом*.

Абсорбція (розподіл) — це процес поглинання речовини з рідкої або газової фази усім об'ємом твердого тіла чи рідиною. Речовину, яка поглинає (абсорбує) компоненти, називають *абсорбентом*, а яка поглинається з газової або рідкої фази — *абсорбатом* (рис. 1.4). Під час абсорбції речовина спочатку адсорбується на поверхні абсорбату, а вже потім за рахунок броунівського руху переноситься в його об'єм.



Абсорбція Адсорбція

Рис. 1.4. Схематичне зображення процесів адсорбції та абсорбції

Молекули речовини утримуютьсяв результаті дії міжмолекулярних сил тяжіння або так званих сил Ван дер Ваальса (рис. 1.5), які мають електростатичну природу та виникають між сорбентом і сорбатом. Енергія взаємодії між молекулами сорбату та частинками сорбенту складається з енергій орієнтаційних, індукційних та дисперсійних сил. Багато в чому сорбція зумовлена також силами специфічної взаємодії — виникненням водневого або донорно-акцепторного зв'язку.

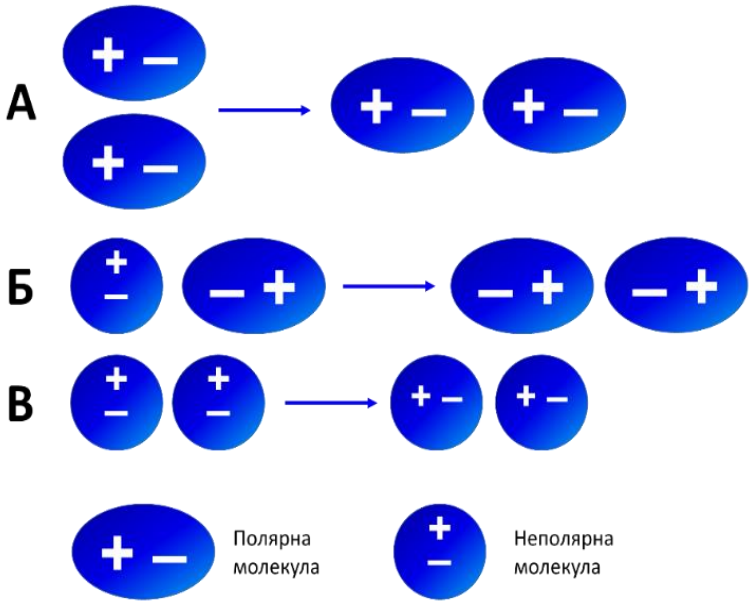


Рис. 1.5. Вандерваальсові взаємодії молекул: **А** — орієнтаційна; **Б** — індукційна; **В** — дисперсна

Орієнтаційна (диполь-дипольна) взаємодія виникає між полярними молекулами, які мають сталий дипольний момент. Під час їх зближення молекули орієнтуються таким чином, щоб позитивний бік одного диполя був орієнтований до негативного боку другого диполя. Взаємодія двох таких диполів зумовлює взаємне тяжіння молекул. Наприклад, у разі адсорбції полярних молекул хлористого метилу на полярному сорбенті — кремнеземі, вагомий внесок у міжмолекулярну взаємодію роблять орієнтаційні сили.

Індукційна взаємодія має місце між полярною і неполярною молекулами. Під час їх зближення в неполярній молекулі виникає так званий індукційний диполь і в результаті відбувається взаємодія між індукційним і сталим диполями, що приводить до взаємного електростатичного притягування молекул. Така взаємодія відбувається, наприклад, під час адсорбції неполярних молекул алканів на полярному сорбенті — оксиді алюмінію.

Дисперсійна взаємодія виникає між різними молекулами незалежно від їх полярності. Однак більш вагомий внесок в енергію міжмолекулярної взаємодії сили дисперсії роблять у разі взаємного притягування неполярних молекул. Дисперсійна взаємодія зумовлена міграцією електронної густини в атомі (молекулі) внаслідок безперервного руху електронів. Тому навіть у неполярних молекулах, які за своєю будовою є також системою заряджених частинок — протонів та електронів, виникають короткочасні миттєві дипольні моменти. Електростатична взаємодія таких диполів спричиняє

міжатомне (міжмолекулярне) притягання, наприклад, у разі адсорбції неполярних молекул хлору на неполярному вуглецевому адсорбенті.

Водневий зв'язок виникає під час взаємодії електропозитивних атомів водню, наприклад, тих, що входять до складу гідроксильної групи, з електронегативними атомами, в основному азоту, кисню та фтору. Водневий зв'язок у міжфазовій взаємодії сорбент-сорбат може утворюватись зокрема тоді, коли сорбентом є речовина, на поверхні якої знаходяться хімічно зв'язані гідроксильні групи, а до складу молекул сорбату входять електронодонорні атоми. Наприклад, метанол, піридин та інші електронодонорні молекули добре сорбуються на поверхні гідратованого кремнезему, який містить зв'язані гідроксильні групи.

Донорно-акцепторний (координаційний) зв'язок виникає між атомами, один з яких має вільну електронну пару, наприклад, атом кисню в молекулі води або атом азоту в молекулі ацетонітрилу, а другий — вільні атомні орбіталі, наприклад, *d*-орбіталі силіцію в кремнеземі. Виникнення донорно-акцепторного зв'язку зумовлене передачею електронної пари із заповненої орбіталі одного атома (донора) на вакантну орбіталь іншого (акцептора) з утворенням спільної зв'язувальної орбіталі. Особливо сприятливі умови для виникнення донорно-акцепторних зв'язків створюються у разі адсорбції іонів *d*-елементів на адсорбентах з іммобілізованими або хімічно закріпленими на їх поверхні органічними реагентами, до складу яких входять електронодонорні атоми.

Примітка. Двома основними класами молекул є ***полярні*** та ***неполярні*** молекули.

Полярні молекули виникають, коли два атоми не поділяють електрони порівну в ковалентному зв'язку. Утворюється диполь, причому частина молекули несе невеликий позитивний заряд, а інша частина несе невеликий негативний заряд. Це відбувається, коли є різниця між значеннями електронегативності кожного атома. Екстремальна різниця утворює іонний зв'язок, тоді як менша різниця утворює *полярний ковалентний зв'язок.* Якщо різниця електронегативності між двома атомами становить від 0,5 до 2,0, атоми утворюють полярний ковалентний зв'язок. Якщо різниця електронегативності між атомами більше 2,0, то зв'язок є *іонним.* Іонні сполуки є надзвичайно полярними молекулами. Приклади молекул з полярним ковалентним зв'язком: вода (H_2O), аміак (NH_3), діоксид сірки (SO_2), сірководень (H_2S), етанол (C_2H_5OH).

Зверніть увагу, що такі іонні сполуки, як хлорид натрію (NaCl), є полярними. Однак здебільшого, коли говорять про «полярні молекули», вони мають на увазі «полярні ковалентні молекули», а не всі типи сполук із полярністю! Говорячи про полярність сполук, найкраще уникати плутанини та називати їх неполярними, полярними ковалентними та іонними.

Неполярні молекули — це молекули, що рівномірно ділять електрони в ковалентному зв'язку. У таких молекулах немає чистого електричного заряду, оскільки електрони розподілені

рівномірно. Це явище характерне для молекул, у яких атоми мають однакову або подібну електронегативність. Загалом, якщо різниця електронегативності між двома атомами менша за 0,5, зв'язок вважається неполярним, навіть якщо справді неполярними є лише молекули, утворені ідентичними атомами. Неполярні молекули також утворюються, коли атоми, що мають спільний полярний зв'язок, розташовуються так, що електричні заряди компенсують один одного. Приклади сполук з неполярним ковалентним зв'язком: будь-який із благородних газів (He, Ne, Ar, Kr, Xe), будь-який з гомоядерних двоатомних елементів (H_2, N_2, O_2, Cl_2), вуглекислий газ (CO_2), бензен (C_6H_6), чотирихлористий вуглець (CCl_4), метан (CH_4), етилен (C_2H_4), вуглеводневі рідини (бензин, толуол) тощо.

Якщо ви знаєте полярність молекул, ви можете передбачити, чи будуть вони змішуватися разом, утворюючи хімічні розчини. Загальне правило полягає в тому, що «подібне розчиняється подібним», що означає, що полярні молекули розчинятимуться в інших полярних рідинах, а неполярні молекули розчинятимуться в неполярних рідинах. Ось чому нафта і вода не змішуються: нафта неполярна, а вода полярна. Корисно знати, які сполуки є проміжними між полярними та неполярними, тому що ви можете використовувати їх як проміжні для розчинення хімічної речовини в такій, з якою інакше вона б не змішалася. Наприклад, якщо ви хочете змішати іонну або полярну сполуку в органічному розчиннику, ви можете розчинити її в етанолі (полярному, але небагато). Потім ви можете розчинити розчин етанолу в органічному розчиннику, наприклад, ксилолі.

Однією з найпоширеніших теорій, що пояснює адсорбцію молекул газу на поверхні твердого тіла, є ***теорія Ленгмюра***. Згідно з цією теорією на поверхні адсорбенту є силове поле, яке здатне притягувати молекули іншої речовини й утворювати мономолекулярний шар адсорбованих молекул. Утримання поверхневих атомів чи молекул здійснюється або фізичними вандерваальсовими силами міжмолекулярної взаємодії, або хімічними — утворенням поверхневих сполук. Між поверхнею адсорбенту і середовищем встановлюється рухома адсорбційна рівновага, яка визначається рівністю швидкостей адсорбції і десорбції молекул.

II. Розподіл розчиненої речовини між двома рідкими фазами, які не змішуються. Розділення в розподільній хроматографії відбувається за рахунок розподілу хімічних сполук між двома рідкими фазами — нерухомою та рухомою.

III. Іонний обмін — реакція обміну іонів між рухомою і нерухомою фазами. Зазвичай нерухома фаза — це тверда малорозчинна сполука, здатна обмінювати певні іони зі складу своїх функціональних груп. В основі іонообмінної (іонної) хроматографії лежить хімічна реакція іонного обміну, а також різна спорідненість іонів до фіксованих іонних функціональних груп сорбенту утворених в результаті дисоціації.

IV. Утворення малорозчинних сполук відбувається між компонентами рухомої фази з речовинами, які входять до складу нерухомої фази. Рівноважна концентрація речовини в рухомій фазі залежить від добутку розчинності утвореної малорозчинної сполуки.

Осадова хроматографія базується на різній розчинності осадів, що утворюються під час взаємодії компонентів досліджуваної суміші з реагентом-осаджувачем.

V. Міграція — проникнення у внутрішні пори — затримка речовин рухомої фази в порах нерухомої фази, куди вони потрапляють за рахунок броунівського руху (міграції).

Ступінь затримки залежить від розмірів молекул рухомої фази і розміру пор нерухомоїфази.

1.6. ФАКТОРИ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА РОЗДІЛЕННЯ РЕЧОВИН

Розділення речовин у хроматографічних методах залежить від таких багатьох факторів, які впливають на взаємодію речовини з нерухомою та рухомою фазами, як:

- ✓ *Природа речовини, яку визначають.*
- ✓ *Розмір, заряд та маса молекули.* Молекули різних розмірів та мас можуть порізному взаємодіяти з нерухомою та рухомою фазами. Більші молекули можуть рухатися повільніше або менше взаємодіяти з нерухомою фазою.
- ✓ *Полярність та гідрофільність речовин.*
- ✓ *Тип та властивості нерухомої фази, розмір частинок.* Різні типи нерухомих фаз (наприклад, силікагель, оксид алюмінію тощо) мають різні характеристики та порізному взаємодіють з аналізованими речовинами. Вибір правильного типу нерухомої фази важливий для ефективного розділення. Крім того, дрібні частинки забезпечують більшу поверхню для взаємодії з речовинами.
- ✓ *Тип та концентрація рухомої фази.* Тип рухомої фази (наприклад, органічний розчинник, вода, буферний розчин) також впливає на розділення речовин. Вибір рухомої фази залежить від характеристик аналізу та речовин, які аналізуються.
- ✓ *Температура* може впливати на розмір молекул, їхню рухливість і взаємодію з нерухомою та рухомою фазами.
- ✓ *pH середовища* може впливати на заряд молекул та їхню полярність.
- ✓ *Форма та розмір колонки.* Довжина і діаметр колонки можуть впливати на час розділення та роздільну здатність.

✓ *Тиск.* Високий тиск може покращити роздільну здатність та швидкість розділення у рідинній хроматографії, особливо у високоефективних рідинних хроматографічних системах.

✓ *Режим роботи*, такий, як аналітичний чи підготовчий, також може впливати на умови розділення та вибір методики.

Залежно від конкретних умов аналізу та речовин, які аналізуються, ці фактори можуть бути оптимізовані для досягнення найкращого розділення та точності аналізу в хроматографії.

1.7. КЛАСИФІКАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ

На сьогоднішній день існує значна кількість варіантів здійснення хроматографічного дослідження. В основу класифікацій методів покладені принципи, які враховують певні особливості процесу розділення:

✓ *відмінності в агрегатному стані нерухомої та рухомої фаз;*

✓ *відмінності в характері взаємодій речовин, що розділяються, з нерухомою фазою;*

✓ *апаратурне оформлення або спосіб розміщення нерухомої фази;*

✓ *методика проведення аналізу або спосіб переміщення рухомої фази вздовж нерухомої;*

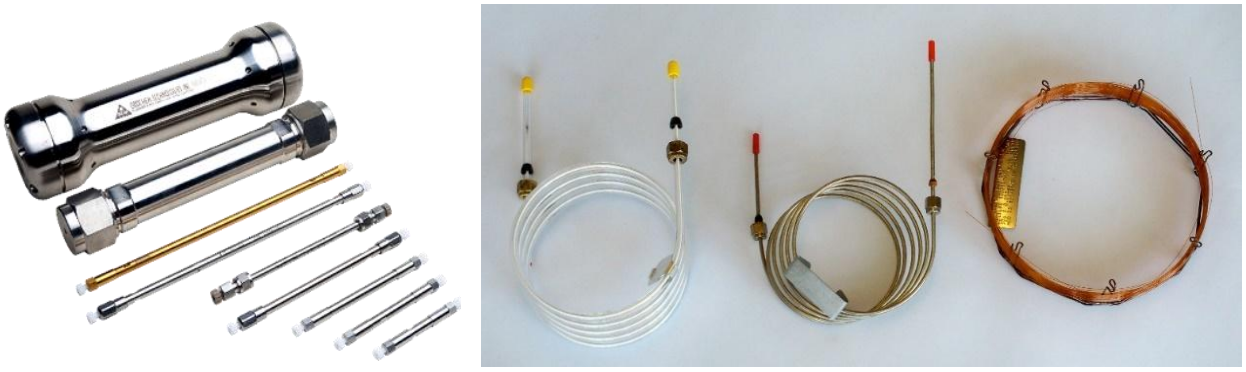
✓ *мета проведення аналізу;*

✓ *ефективність хроматографічного розділення.*

З-поміж основних варіантів класифікації хроматографічних методів виділяють такі.

За технікою (способом) проведення процесу розділення виділяють *колонкову (в колонці або капілярі)* та *площинну,* або *планарну,* (на хроматографічному папері або тонкому шарі сорбенту) хроматографії.

У колонковому варіанті розділення проводять на хроматографічних колонках, що являють собою трубки, заповнені нерухомою фазою. Якщо нерухома фаза — рідина, вона наноситься на поверхню і в пори гранул інертного носія. Варіантом колонкової хроматографії є капілярна, коли рідка нерухома фаза наноситься у вигляді плівки або шару сорбенту на внутрішню стінку капіляра (рис. 1.6).



А **Б**

Рис. 1.6. Види хроматографічних колонок: **А** — для високоефективної рідинної та іонної хроматографії; **Б** — для газової хроматографії

У планарній (площинній) хроматографії процес розділення речовин зумовлений їх переносом рухомою фазою (елюентом) вздовж нерухомої. Хроматографічний процес розділення відбувається або на папері, або у тонкому шарі сорбенту.

Методи планарної хроматографії — це не тільки методи, у якій переміщення рухомої фази відбувається під дією капілярних та гравітаційних сил (*паперова, тонкошарова, високоефективна тонкошарова хроматографія*), але і методи, які грунтуються на використанні різноманітних зовнішніх сил (*тонкошарова хроматографія під тиском, кругова тонкошарова хроматографія, тонкошарова хроматографія під дією відцентрової сили — ротаційна тонкошарова хроматографія).*

Площинна хроматографія підрозділяється на паперову і тонкошарову. У паперовій хроматографії роль нерухомої фази виконує хроматографічний папір, оброблений спеціальним чином. У тонкошаровій хроматографії розділення проводять у тонкому шарі дрібнодисперсного сорбенту, нанесеного на інертну підкладку (носій) — скляну, алюмінієву або пластмасову. У площинній хроматографії рухомою фазою є рідина, рух якої здійснюється завдяки капілярним силам.

У фармацевтичному аналізі істрично першим був метод паперової хроматографії. Однак на сьогоднішній день розповсюдженими для аналізу субстанцій, лікарських засобів, лікарської рослинної сировини (ЛРС) є також методи тонкошарової та високоефективної тонкошарової хроматографії. Ці методи використовуються для розділення, ідентифікації та встановлення чистоти (визначення домішок) органічних та неорганічних сполук. Деякі з методів, наприклад, тонкошарова та високоефективна тонкошарова хроматографії використовують також для кількісного визначення сполук.

За типом контактних фаз (за агрегатним станом рухомої та нерухомої фаз). Для досягнення оптимального розділення компонентів сумішей необхідно обрати оптимальну комбінацію нерухомої та рухомої фаз. Нерухома фаза може бути твердою речовиною або рідиною, що сорбована на твердому носії; рухома фаза може виступати рідиною або газом; аналізовані сполуки можуть перебувати у рідкому, газуватому або пароподібному стані.

Залежно від агрегатного стану рухомої фази хроматографія поділяється на *газову* та *рідинну*. В газовій хроматографії розділяють *газорідинну* і *газотвердофазну (газоадсорбційну)*, в рідинній — *рідинно-рідинну*, *рідинно-твердофазну* та *рідинно-гелеву*. Перше слово у назві методу характеризує агрегатний стан рухомої фази, друге — агрегатний стан нерухомої фази.

У газовій хроматографії рухомою фазою є газ-носій. Використовується цей вид хроматографії для аналізу летких, термічно стабільних речовин із невеликою молекулярною масою.

У разі використання як рухомої фази рідини метод має назву рідинна хроматографія, яка надає більше можливостей для визначення сполук. Критерієм для її використання є розчинність аналізованих сполук у рухомій фазі.

За природою процесів, що відбуваються під час розділення компонентів (за механізмом взаємодії сорбенту і сорбату), можна виділити кілька таких видів хроматографії:

- ✓ *адсорбційна* — розділення речовин ґрунтується на відмінності в адсорбованості (адсорбції) компонентів суміші на цьому адсорбенті (паперова, тонкошарова, високоефективна тонкошарова хроматографія);
- ✓ *розподільна* — розділення ґрунтується на відмінності в розчинності сорбатів (абсорбції) у рухомій і нерухомій фазах або на відмінності в стабільності комплексів, що утворюються (колонкова, рідинна, газова, HILIC хроматографія);
- ✓ *іонообмінна* — розділення речовин ґрунтується на різній здатності речовин до іонного обміну;
- ✓ *ексклюзійна (гель-проникальна, гель-фільтраційна, ситова)* — розділення відбувається за рахунок різниці у розмірах молекул. Метод ґрунтується на розділенні молекул суміші за розміром з урахуванням їх різної здатності проникати у пори носія. При цьому першими з колонки виходять більші за розміром молекули (більшої молекулярної маси та об'єму), що здатні проникати у мінімальне число пор носія. Останніми елюються речовини з малими розмірами молекул, які вільно проникають у пори сорбенту;

✓ *афінна* — передбачає утворення міцного зв'язку зі специфічними групами (лігандами, афінатами) нерухомої фази на основі біологічних властивостей. Під час розділення ферментів лігандами служать їх субстрати, інгібітори чи коферменти, токсинів — рецептори, білків — антитіла.

✓ *хеміхроматографія* — розділення ґрунтується на різній здатності речовин вступати у хімічні реакції (осадова, комплексоутворювальна, окисно-відновна). Швидкість переміщення продукту реакції нерухомою фазою пропорційна константі рівноваги реакції.

Цими видами не вичерпуються всі механізми розділення, наприклад, існує *адсорбційно-комплексоутворювальна хроматографія*, що заснована на утворенні координаційних сполук різної стійкості у фазі або на поверхні сорбенту. Її використовують тоді, коли відомий домінантний механізм, а сам процес розділення дуже часто проходить відразу за декількома механізмами.

Залежно від мети проведення хроматографічного процесу розрізняють *аналітичну, препаративну і промислову* (виробничу) хроматографію.

Аналітичну хроматографію використовують для визначення якісного та кількісного складу зразка. Зазвичай для цього відбирають малу кількість зразка (до 10 мг). *Препаративна* хроматографія — це процес виділення та очищення речовин із суміші у чистому вигляді в лабораторних умовах або у виробничих процесах з метою їх подальшого використання. Працюють з великою кількістю зразка (понад 10 мг, може бути понад 1 кг). *Промислову* (виробничу) хроматографію використовують для доведення продуктів до заданого ступеня чистоти.

Класифікувати види хроматографічного аналізу можна також ***за методикою виконання хроматографічного розділення***, виходячи з властивостей рухомої фази (елюенту). Виходячи із цієї класифікації розрізняють *фронтальну, елюентну і витісну хроматографію* (рис. 1.7).

Елюентна (проявна) хроматографія полягає в тому, що в безперервний потік рухомої фази, яка практично не сорбується, вноситься порція об'єкта аналізу (суміш компонентів). Елюент захоплює частину компонентів об'єкта аналізу, яка перебуває в рівновазі між ним і нерухомою фазою, і просуває їх вздовж нерухомої фази з різними швидкостями. Компоненти виходять із зони розділення послідовно відповідно до їх сорбційних властивостей. Це призводить до розділення суміші на окремі компоненти.

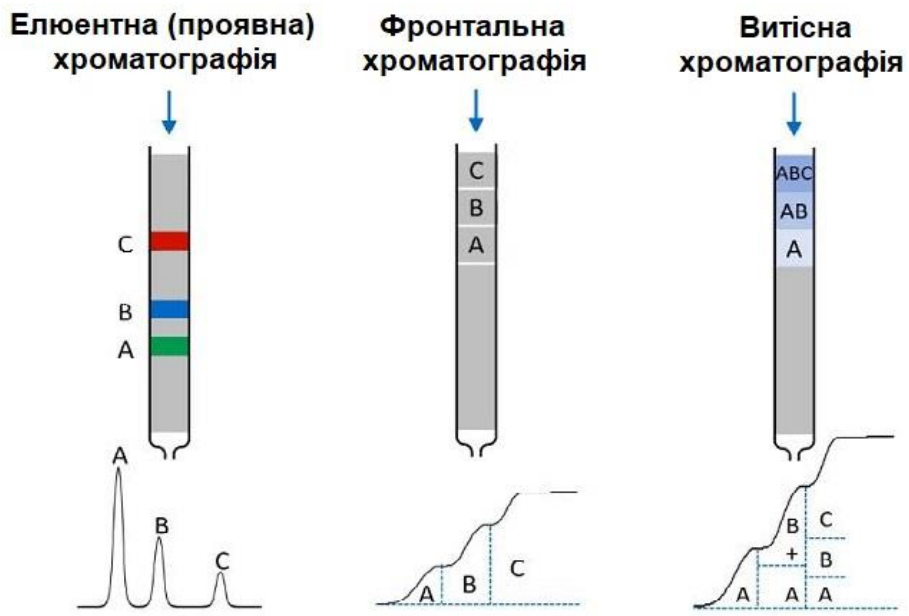


Рис. 1.7. Схематичне зображення елюентної, фронтальної та витісної хроматографії

Фронтальна — об'єкт аналізу сам є рухомою фазою і подається безперервно крізь шар нерухомої фази. Фронтальний аналіз застосовують, зокрема, для очищення води іонообмінними адсорбентами та очищення повітря активованим вугіллям у протигазах.

Витісна — в нерухому фазу вноситься порція об'єкта аналізу, яка адсорбується на сорбенті. Потім додається речовина, яка сорбується сильніше, ніж компоненти об'єкта аналізу, і послідовно витісняє їх із сорбенту в елюат, який виносить їх із колонки. Цей метод використовується в основному для визначення мікродомішок.

1.8. ЗАСТОСУВАННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДІВ

Хроматографічні методи широко застосовують як для якісного, так і для кількісного аналізу, для відділення домішок та одержання хімічно чистих лікарських засобів, для розділення та виділення індивідуальних компонентів неорганічних та органічних складних сумішей. З їх допомогою визначають аніони (галогеніди, нітрати, нітрити, сульфати, ацетати тощо) і катіони, головним чином лужних і лужно-земельних металів у питній та технічній воді, у продуктах технологічної переробки харчової, фармацевтичної та інших галузей промисловості; у клінічних дослідженнях, в аналізі об'єктів навколишнього середовища (атмосфери, ґрунту, водних басейнів). Хроматографічні методи незамінні для розділення органічних сполук, близьких за структурою і властивостями.

Головні завдання, які можуть бути вирішені за допомогою хроматографічних методів:

- ✓ якісний і кількісний аналіз складних сумішей речовин;
- ✓ розділення багатокомпонентних за складом сумішей на індивідуальні компоненти;
- ✓ концентрування речовин з їх дуже розбавлених розчинів;
- ✓ очищення технічних продуктів від домішок, доведення цих продуктів до заданого ступеня хімічної чистоти, отримання чистих хімічних реактивів;
- ✓ контроль різних виробництв методами хроматографії;
- ✓ визначення молекулярної структури деяких сполук шляхом визначення зв'язку між здатністю до сорбції і будовою певної речовини.

1.9. ПЕРЕВАГИ ТА НЕДОЛІКИ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ

З-поміж ***переваг*** хроматографічних методів аналізу можна виділити такі:

1. Хроматографічні методи є універсальними методами дослідження, які дають змогу одночасно проводити процес розділення та визначення кількох компонентів. Це дозволяє вирішувати як аналітичні завдання (розділення, ідентифікація, кількісне визначення), так і препаративні (очищення, виділення, концентрування). Вирішення цих завдань можна поєднувати, виконуючи їх в режимі «online».

2. Методи хроматографії мають значну чутливість, що дозволяє використовувати їх для визначення мікрокількостей речовин.

3. Розділення у хроматографії має динамічний характер, причому акти сорбції — десорбції компонентів, що розділяються, повторюються багаторазово. Цим обумовлена висока ефективність хроматографічного розділення порівняно зі статичними методами сорбції та екстракції.

4. Для розділення використовують різні типи взаємодії сорбатів та нерухомої фази: від суто фізичних до хемосорбційних. Це зумовлює можливість селективного розділення широкого спектра речовин.

5. На речовини, що розділяються, можна накладати додаткові поля (гравітаційне, електричне, магнітне тощо), які, змінюючи умови розділення, розширюють можливості хроматографії.

Недоліками хроматографічних методів аналізу є:

1. Хроматографічним обладнанням може керувати лише висококваліфікований персонал.
2. Прилади для хроматографії мають значну вартість.
3. Помилка виникає через перевантаження зразками.
4. Деякі методи хроматографії вимагають більше розчинника для відділення аналітів.
5. Потрібно проводити періодичне технічне обслуговування та змінювати деталі.
6. Деякі методи хроматографії вимагають значного енергоспоживання.
7. Для досягнення ефективного розділення може знадобитися високий робочий тиск.

Примітка. *Чутливість методу (межа виявлення)* — це мінімальна кількість речовини, яка може бути виявлена та виміряна цим методом із заданою довірчою ймовірністю. *Селективність* — ступінь взаємного розподілу двох або більше визначуваних речовин у ході хроматографічного процесу.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Ознайомтеся із загальними поняттями і термінологією у хроматографії, явищами, на яких базуються хроматографічні методи розділення речовин.
2. Ознайомтеся з історією становлення та розвитку хроматографічних методів дослідження, назвіть провідних науковців цієї галузі.
3. Охарактеризуйте сучасний стан хроматографічних методів аналізу та галузі їх застосування, значення і місце з-поміж інших аналітичних методів.
4. Охарактеризуйте обов'язкові складові компоненти хроматографічного процесу та їх взаємозв'язок: рухома фаза, нерухома фаза, аналізована речовина (суміш речовин).
5. Що таке «полярні» та «неполярні» сполуки? Як впливає розчинність, pH, ліпофільність речовин на їх розділення у хроматографічних методах?
6. Зазначте фізико-хімічні основи процесу хроматографічного розділення та характерні особливості хроматографічних методів дослідження.

7. Які основні механізми розділення речовин переважають у хроматографічних методах аналізу?

8. Зазначте фактори, що впливають на розділення речовин у хроматографічних методах.

9. Наведіть класифікацію хроматографічних методів аналізу за технікою (способом) проведення процесу розділення; за типом контактних фаз (за агрегатним станом рухомої та нерухомої фаз); за природою процесів, що відбуваються під час розділення компонентів (за механізмом взаємодії сорбенту і сорбату); залежно від мети проведення хроматографічного процесу.

10. Наведіть переваги та недоліки хроматографічних методів.

Тема 2. ХРОМАТОГРАФІЯ НА ПАПЕРІ (ПАПЕРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ)

ГЛОСАРІЙ

Хроматографічний папір — це основа для проведення паперової хроматографії, яка зазвичай складається з целюлозного матеріалу.

Хроматографічна камера — це ємність, яка використовується для розділення компонентів зразка за допомогою хроматографії. Вона забезпечує умови для взаємодії рухомої та нерухомої фаз.

Рухома фаза у методі паперової хроматографії — це рідина, яка вбирається у папір та рухається крізь нього, переносячи аналізовані речовини.

Коефіцієнт утримування (R_f) — це величина, яка вказує на здатність речовини залишатися у нерухомій фазі під час руху рухомої фази. Визначається як відношення відстані, пройденої речовиною, до відстані, пройденої рухомою фазою.

Хроматографія на папері, або паперова хроматографія — це відносно недорогий хроматографічний метод розділення речовин за рахунок їх різної швидкості міграції вздовж аркуша хроматографічного паперу.

Метод був відкритий у 1943-1944 роках Консденом, Гордоном, Мартіном і Сінджем, котрі розробили та застосували його для аналізу білкових гідролізатів (амінокислот). Однак з 1952 року метод паперової хроматографії почав поступово витіснятися хроматографією у тонкому шарі сорбенту.

Хроматографічний процес у методі паперової хроматографії перебігає на аркуші спеціального хроматографічного паперу під час переміщення по його капілярах та на поверхні рідкої рухомої фази. Нерухомою фазою є або сам хроматографічний папір, або речовини, попередньо нанесені на його волокна.

Механізм хроматографії на папері може бути *розподільним* або *адсорбційним*.

Розподільна хроматографія отримала таку назву, оскільки речовини розділяються або розподіляються між двома фазами рідини. Однією з фаз є вода (або водний розчин певних речовин), яка утримується в порах хроматографічного паперу (у цьому процесі хроматографічний папір діє як інертний носій), а іншою рідиною є безпосередньо рухома фаза – ліпофільна рідина чи сумші рідин, яка відповідає за переміщення досліджуваних сполук вздовж хроматографічного паперу. Компоненти зразка будуть легко розділятися залежно від того, наскільки сильно вони адсорбуються на нерухомій фазі порівняно з тим, наскільки легко вони розчиняються у рухомій фазі. Тобто речовини в аналізованій суміші рухаються у двох розчинниках, що не змішуються.

Хоча в більшості застосувань паперової хроматографії принцип ґрунтується на розподільній хроматографії, але інколи може бути використана *адсорбційна хроматографія*, коли нерухомою фазою є целюлоза, а рухомою фазою є рідка фаза. У цьому процесі може бути використаний хроматографічний папір, що просочений адсорбентом, наприклад, оксидом алюмінію або кремнеземом. Тобто деякі з компонентів можуть бути адсорбовані більше, ніж інші, що призводить до їх розділення.

Паперова хроматографія є варіантом рідинної хроматографії (найчастіше рідинно-рідинний вид хроматографії). Переміщення рухомої фази відбувається або тільки під дією капілярних сил (рухома фаза піднімається вгору, *висхідна хроматографія*), або під дією капілярних сил і сили тяжіння (рухома фаза стікає вниз, *низхідна хроматографія*).

Під час хроматографування аналізовані речовини утворюють на папері зони адсорбції у вигляді круглих або овальних плям або смуг (залежно від способу нанесення — точково чи смугою). Сукупність зон адсорбції, отриманих під час хроматографування певного аналізованого зразка, називається ***хроматограмою***.

Рухливість речовини під час хроматографування характеризується коефіцієнтом утримування (затримки, R_f).

2.1. ОБЛАДНАННЯ ТА УСТАТКУВАННЯ У МЕТОДІ ПАПЕРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ. КОМПОНЕНТИ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Хроматографічним папером (рис. 2.1) називають целюлозний фільтрувальний папір, що відрізняється особливою чистотою вихідної сировини та деякими особливими властивостями, а також інші типи паперу, наприклад, папір з модифікованої целюлози, скловолокна тощо. Такий папір стійкий до корозійноактивних реагентів і має низьку адсорбційну здатність.



Рис. 2.1. Зовнішній вигляд хроматографічного паперу

До паперу, що застосовується у методі паперової хроматографії, висуваються певні вимоги:

✓ має бути хімічно чистим і нейтральним, однорідним за складом і будовою волокон (з їх довжиною 0,5–3 мм);

✓ має бути інертним по відношенню до рухомої фази та аналізованих сполук.

Для паперової хроматографії найбільш придатним є Лінтерн-папір, що не містить речовин, розчинних у воді.

Примітка! Лінтерн-целюлоза — це високомолекулярний полісахарид, що містить 2500–3000 залишків глюкози у макромолекулі.

Інша важлива особливість хроматографічного паперу полягає в тому, що нанесена на нього рідина переміщується під дією капілярних сил по капілярах, утворених волокнами паперу. Кількісно ця характеристика паперу визначається швидкістю, з якою розчинник проникає в капіляри, та кінцевою висотою підйому. Ці характеристики капілярного підйому залежать від густини та густоти сітки волокон паперу: чим папір цупкіший (а отже, менш проникний і менш прозорий), тим нижчі характеристики капілярного підйому.

Для отримання хімічно чистого паперу його обробляють реагентами, які з неорганічними іонами утворюють комплексні сполуки, що потім вимиваються розчинниками. Такими реагентами можуть бути трилон Б, 8-оксихінолін, амінооцтова кислота тощо.

У методі паперової хроматографії застосовується папір, який може бути модифікованим відповідно до поставлених завдань. Так, хроматографічний папір може бути *гідрофільним* (утримує воду у своїх порах) і *гідрофобним* (утримує неполярні органічні розчинники).

Гідрофільний папір зазвичай містить близько 20–22 % води, яка виконує роль нерухомої фази. Рухомою фазою тут служать органічні водонерозчинні розчинники. Гідрофільний папір застосовується для аналізу водорозчинних речовин.

Для спеціальної обробки гідрофільного паперу (шляхом ацетилювання або просоченням гідрофобними речовинами: парафіном, каучуком, органічними реагентами) отримують *гідрофобний* папір. Аналіз на гідрофобному папері проводять для речовин, що не розчиняються у воді (жиророзчинні кислоти, вітаміни). Неполярний розчинник, з допомогою якого був модифікований папір, служить нерухомою фазою, а полярний (водні розчини спиртів, органічних кислот) — рухомою.

Для аналізу фільтрувальний папір потрібної щільності та кваліфікації «для хроматографії» розрізають у напрямку, перпендикулярному або паралельному волокнам, на листки (смуги), довжина яких приблизно дорівнює висоті камери.

Примітка! Хроматографічний папір має бути розрізаний так, щоб рухома фаза рухалася уздовж напрямку волокон паперу.

Для проведення хроматографії на папері використовують чисті та сухі герметичні ***хроматографічні камери*** (рис. 2.2), виготовлені з інертного матеріалу (скло, пластик, неіржавна сталь). Вони можуть бути різного розміру та форми залежно від довжини хроматографічного паперу та способу хроматографування. Найбільшу перевагу мають скляні ємності або циліндри з пришліфованою кришкою, що дозволяють спостерігати за процесом розділення під закритою кришкою камери. Крім того, скло — інертний матеріал, який не буде реагувати з компонентами рухомої фази. На кришці можуть бути отвори (шлюзи) для додавання розчинника або зменшення надлишкового тиску в камері.



Рис. 2.2. Приклади хроматографічних камер
у методі паперової хроматографії

Внутрішні стінки хроматографічної камери зазвичай вистилають фільтрувальним папером, що сприяє більш швидкому та повному її насиченню парами суміш розчинників, що входять до складу рухомої фази. Цей процес називають «насиченням хроматографічної камери».

Залежно від способу проведення хроматографування хроматографічні камери можуть мати додаткове обладнання та матеріали для здійснення процесу розділення речовин.

Для проведення *висхідної хроматографії* (рис. 2.3) хроматографічна камера у верхній частині може бути оснащена пристроєм для закріплення хроматографічного паперу, з допомогою якого папір можна опускати, не відкриваючи камери. Рухому фазу наливають або на дно камери, або у спеціальну ємність (кювету), що також розташовується на дні камери.



Рис. 2.3. Хроматографічна камера для висхідної
паперової хроматографії

Для проведення *низхідної хроматографії* у верхній частині камери поміщають посудину для рухомої фази, що має назву «кювета» або «човник» (рис. 2.4).

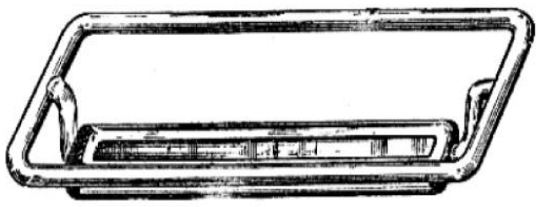


Рис. 2.4. Кювета (човник) для низхідної паперової хроматографії

Кювета має вміщати об'єм рухомої фази, що є достатнім для проведення принаймні одного хроматографування. Довжина кювети має перевищувати ширину хроматографічного паперу. Камера у разі низхідного хроматографування також має бути забезпечена пристроями для закріплення хроматографічного паперу в робочому положенні та пристроєм для введення до кювети рухомої фази.

У методі кругової (радіальної) хроматографії як хроматографічна камера може використовуватися *ексикатор* (рис. 2.5), на дно якого поміщають рухому фазу.



Рис. 2.5. Схема приладу для отримання кругової хроматограми:
А — чашка Петрі; **Б** — ексикатор

Рухома фаза (елюент) – це розчинник або суміш розчинників, які поміщаються у хроматографічну камеру та відповідають за перенесення досліджуваних зразків вздовж нерухомої фази. Індивідуальні розчинники використовуються досить рідко. Підбирають рухому фазу в методі паперової хроматографії залежно від природи нерухомої фази і типу аналізованих сполук.

Найчастіше як розчинники виступають спирти (метанол, етанол, *н*-пропанол, бутанол), етери (етиловий, метиловий), кетони (ацетон, ацетил-ацетон), ефіри органічних кислот (метилацетат, етилацетат), піридин, хлороформ.

Вимоги до аналітичних розчинників:

- ✓ відповідна чистота (для одержання надійних та відтворюваних результатів);
- ✓ розчинники рухомої та нерухомої фаз не мають змішуватися;
- ✓ склад рухомої фази в процесі хроматографування не має змінюватися;
- ✓ розчинники мають легко видалятися з паперу після хроматографування.

Для розділення водорозчинних речовин, наприклад, неорганічних іонів, як рухому фазу зазвичай використовують органічний розчинник або суміш розчинників, а як нерухому фазу — воду (папір заздалегідь змочують водою). Для розділення речовин, добре розчинних в органічних розчинниках, гідрофільний папір перетворюють на гідрофобний, а як рухому фазу використовують воду, водні розчини кислот або лугів, спиртів, буферні розчини тощо. На чистому хроматографічному папері як елюент найчастіше виступає суміш води та органічних сполук. Загалом чим більша розчинність аналізованої речовини в розчиннику, тим більша її рухливість у цьому розчиннику і тим вище значення коефіцієнта утримування (див. розділ «Хроматографія на папері. Розрахунок параметрів»). Через різну розчинність у двох фазах аналізовані речовини мігрують папером з різною швидкістю. Речовина, яка краще розчиняється в рухомій фазі, буде швидше рухатися разом з розчинником і відділиться від інших компонентів аналізованого зразка.

Пристрої для нанесення проби. Для нанесення речовин на поверхню хроматографічного паперу використовують капілярні піпетки, калібровані капіляри та мікрошприци. При цьому потрібно слідкувати, щоб зона нанесення була оптимального розміру. Зазвичай наносять 5–10 мкл 5–20 % розчину аналізованої суміші у відповідному розчиннику, тобто кількість речовини в одній зоні нанесення має складати від 0,01 до 0,3 мг (рис. 2.6).



А **Б**

Рис. 2.6. Пристрої для нанесення: **А** — калібровані капіляри;
Б — мікрошприци

Виявлення хроматографічних зон (детектування). Після закінчення хроматографування одержані хроматограми підсушують для видалення залишків розчинників рухомої фази і переглядають у видимому або ультрафіолетовому світлі (за певної довжини хвилі), відзначаючи водночас зони адсорбції. Іноді для виявлення зон адсорбції хроматограму піддають обробці спеціальними реагентами, що утворюють з аналізованими

речовинами забарвленні продукти реакції шляхом обприскування або занурення у розчин реагенту. Розчин для виявлення наносять на хроматографічний папір за допомогою пульверизатора (рис. 2.7).



Рис. 2.7. Види пульверизаторів

2.2. ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ПАПЕРІ

Аналіз методом паперової хроматографії складається з таких *етапів:*

I. Підготовка хроматографічного паперу.
II. Підготовка хроматографічної камери та рухомої фази.
III. Підготовка досліджуваних зразків та нанесення на хроматографічний папір.
IV. Хроматографування (елюювання).
V. Видалення залишків рухомої фази та виявлення хроматографічних зон (детектування).
VI. Розрахунок параметрів, оформлення висновку.

I. Підготовка хроматографічного паперу. Для аналізу використовують целюлозний папір високої якості з певною пористістю та високою роздільною здатністю, підготовку якого проводять відповідно до завдань дослідження. Вирізають фільтрувальний папір певного розміру залежно від кількості зразків та довжини шляху, що має пройти рухома фаза.

Відступивши від нижнього краю паперу певну відстань, за допомогою лінійки та графітового олівця позначають лінію нанесення зразків (лінія «старт») та відстань, яку має пройти рухома фаза (лінія «фініш»).

Примітка! Відстань від кінця смуги паперу до лінії «старт» підбирається таким чином, щоб під час занурення паперу в рухому фазу лінія «старт» була вище рівня рухомої фази.

Також помічають та підписують місця нанесення аналізованих зразків.

II. Підготовка хроматографічної камери та рухомої фази. Залежно від завдання дослідження використовують попередньо насичену та ненасичену хроматографічну камеру. Для насичення камери її внутрішню поверхню вистилають фільтрувальним папером, поміщають рухому фазу, закривають кришкою та залишають на певний час для насичення камери парами рухомої фази.

Як рухома фаза можуть використовуватися різні комбінації органічних і неорганічних розчинників у певних співвідношеннях, наприклад, бутанол — оцтова кислота — вода (12:3:5). Рухому фазу готують в окремій колбі з кришкою та переносять у хроматографічну камеру.

III. Підготовка досліджуваних зразків та нанесення на хроматографічний папір. Перед початком аналізу зразок розчиняють у відповідному розчиннику для одержання розчину необхідної концентрації.

Для отримання хроматограми на лінію «старт» хроматографічного паперу невеликими порціями наносять аналізовану суміш (найчастіше від 2 до 20 мкл) з допомогою спеціальних пристроїв (мікропіпетка, калібрований капіляр, мікрошприц); кожну наступну порцію додають тільки після випаровування розчинника з попередньої. Одержані зони добре висушують.

Проба випробовуваної суміші може наноситися або точково на лінію «старт», або у вигляді рівномірної смуги вздовж усієї лінії «старт», при цьому первинна зона адсорбції матиме вигляд плями, а вторинна — смуги, паралельної лінії «старт».

IV. Хроматографування (елюювання). Папір поміщають у хроматографічну камеру, його кінець занурюють у посудину з елюентом. За рахунок капілярних сил суміш аналізованих речовин піддається багатократній адсорбції та десорбції, її компоненти рухаються слідом за рухомою фазою з різною швидкістю і розділяються на папері у вигляді плям або смуг (хроматографічних зон). Коли рухома фаза дійде до лінії «фініш», папір виймають та висушують.

V. Видалення залишків рухомої фази та виявлення хроматографічних зон (детектування). Під час хроматографування аналізовані речовини утворюють на папері зони адсорбції у вигляді круглих або овальних плям або смуг залежно від способу нанесення (у вигляді точок або смуг). Сукупність зон адсорбції, отриманих під час хроматографування зразка, що аналізується, називається *хроматограмою.*

Залежно від типу аналізованих сполук використовують декілька варіантів їх виявлення. Якщо сполуки забарвлені, то після елюювання на хроматограмі можна

спостерігати розділені кольорові хроматографічні зони. Якщо сполуки безбарвні, то положення зон компонентів визначають шляхом обробки хроматографічного паперу відповідними реагентами, які з компонентами суміші, що розділяється, утворюють забарвлені сполуки.

VI. Розрахунок параметрів, оформлення висновку. Розраховують значення коефіцієнта утримування (див. розділ «Паперова хроматографія. Розрахунок параметрів») для одержаних хроматографічних зон та роблять відповідні висновки.

2.3. РОЗРАХУНОК ПАРАМЕТРІВ

Механізм хроматографічного розділення на папері досить складний. У нерухомій фазі речовина може утримуватися не тільки внаслідок розчинення в адсорбованому папером воді, а й адсорбуватися папером. Нанесені на папір компоненти, що аналізуються, багатократно то переходять у рухому фазу, то знову поглинаються нерухомою фазою і таким чином по капілярах паперу переміщаються з різними швидкостями відповідно до коефіцієнта розподілу кожного з них. У початковий момент хроматографування деяка частина речовини з паперу перетворюється на рухому фазу. Коли органічний розчинник досягає ділянки паперу, що не містить розчиненої речовини, знову відбувається перерозподіл: з органічної фази речовина переходить у водну. У результаті кожен компонент концентрується на певній ділянці паперового листка — утворюються відповідні зони окремих компонентів на хроматограмі.

Для оцінки можливості поділу речовин на папері використовують коефіцієнт утримування (затримки, R_f).

Коефіцієнт утримування (затримки, R_f) є відношенням відстані від точки нанесення проби до центру хроматографічної зони після хроматографування до відстані, пройденої фронтом розчинника від точки нанесення (від лінії «старт» до лінії «фініш») (рис. 2.8).

$$R_f = \frac{l}{L},$$

де L — відстань, що пройшла рухома фаза (відстань від лінії «старт» до лінії «фініш»);

l – відстань від точки нанесення проби до центра зони після хроматографування.

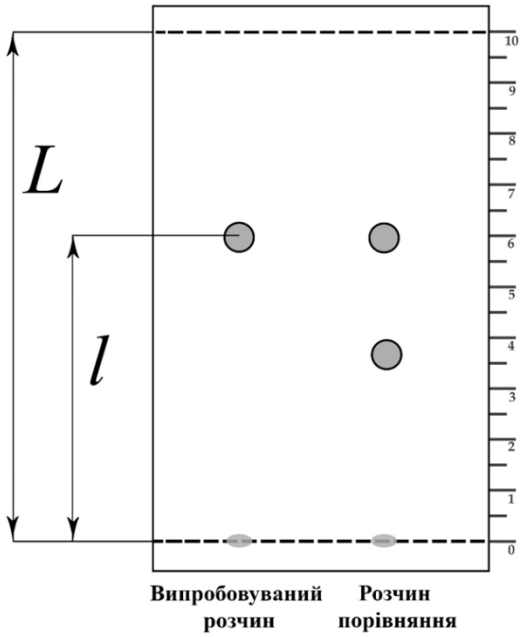


Рис. 2.8. Визначення показників у розрахунку коефіцієнта утримування

Розрахунок коефіцієнта утримування проводять для ідентифікації речовини та визначення супровідних домішок.

Для більш надійної ідентифікації досліджуваних речовин компонентів застосовують речовини-«свідки» — розчини стандартних речовин, для виготовлення яких використовується той же розчинник, що й аналізована речовина. Стандартну речовину наносять на лінію «старт» поруч з аналізованою пробою і хроматографують в одних умовах.

Коефіцієнт R_f залежить від багатьох факторів: природи носія, речовин, що хроматографуються, розчинників і умов проведення експерименту.

На практиці рухливість речовин, що розділяються, залежить від типу хроматографічного паперу (його пористості, щільності, товщини, ступеня гідратації), природи речовини, розчинників, складу рухомої фази, умов експерименту (температури, часу хроматографування) тощо. За незмінності всіх параметрів хроматографування значення коефіцієнта R_f визначається лише індивідуальними властивостями кожного компонента.

2.4. СПОСОБИ ВИКОНАННЯ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ПАПЕРІ

Паперові хроматограми можна отримувати шляхом висхідного, низхідного або горизонтального (радіального) руху елюентів, використовуючи одновимірне або двовимірне хроматографування.

Одновимірна паперова хроматографія передбачає нанесення проби досліджуваної суміші на лінію «старт» у вигляді круглої плями або у вигляді смуги та подальше проведення процедури хроматографування в одному напрямку (рис. 2.9).

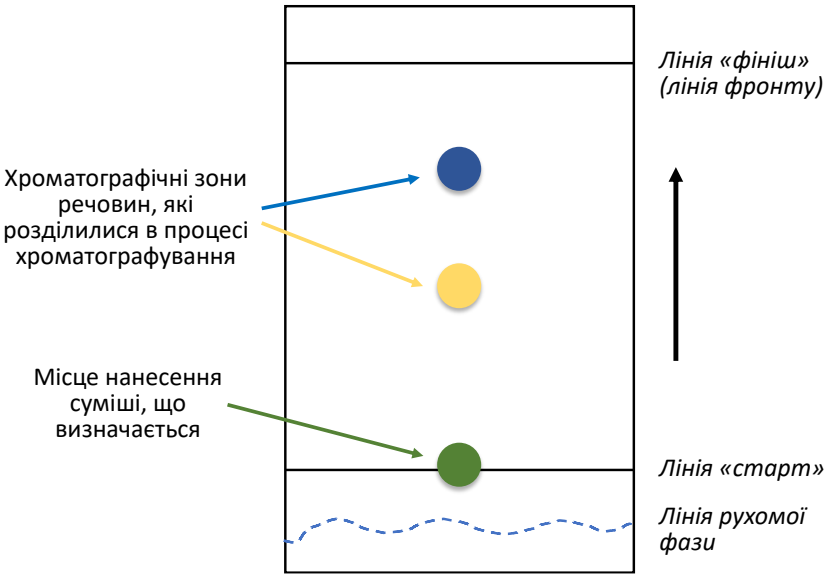


Рис. 2.9. Схема одновимірної паперової хроматографії

Двовимірна хроматографія передбачає послідовне проходження рухомої фази у двох перпендикулярних напрямках, що дозволяє забезпечити більш чітке розділення суміші аналізованих речовин (рис. 2.10).

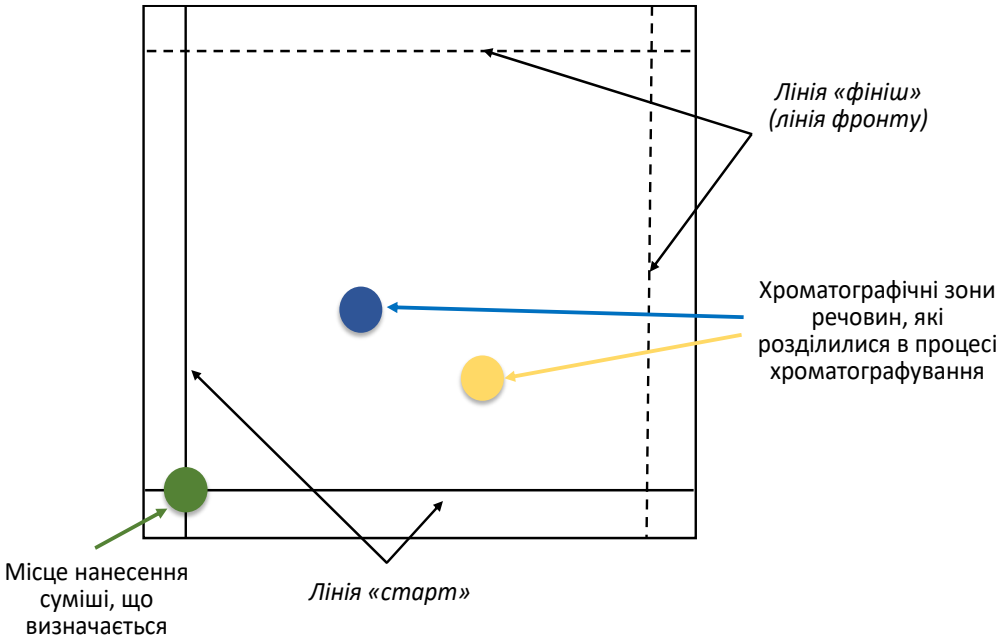


Рис. 2.10. Схема двовимірної паперової хроматографії

1. Одновимірне висхідне хроматографування. Під час виконання дослідження методом одновимірної висхідної хроматографії способом паперової хроматографії процедуру проводять таким чином:

✓ Вирізають смужку хроматографічного паперу та відзначають на ній лінію «старт» на відстані близько 2 см від нижнього краю паперу і, відступивши відстань, що має пройти рухома фаза, креслять лінію «фініш».

✓ На лінію «старт» за допомогою пристрою для нанесення проби поміщають досліджувану речовину та поруч — розчин порівняння.

✓ На дно хроматографічної камери наливають розчинник (рухома фаза), насичений нерухомою фазою (водою).

✓ Хроматографічний папір разом з нанесеними пробами поміщають у хроматографічну камеру та закріплюють таким чином, щоб він вільно спадав вниз, не торкаючись стінок камери, а нижній кінець був опущений у рідину.

Слід пам'ятати, що лінія старту з нанесеними краплями має знаходитися вище розчинника!

У процесі хроматографування рухома фаза під дією капілярних сил піднімається вгору папером, розділяючи компоненти на окремі зони. Оскільки компоненти суміші рухаються з різною швидкістю, то вони виходять на різній відстані від лінії «старт». Коли фронт розчинника дійде до лінії «фініш», хроматографічний папір виймають із камери, сушать і виявляють хроматографічні зони (рис. 2.9).

2. Одновимірне низхідне хроматографування. Одновимірну низхідну хроматограму можна отримати, змінивши методику проведення аналізу. Рухомий розчинник, насичений нерухомим розчинником, наливають у спеціальну *кювету (човник)*, закріплену у верхній частині камери (рис. 2.4).

На дно камери поміщають бюкс з нерухомим розчинником, насиченим рухомим розчинником. Це необхідно для того, щоб запобігти випаровуванню розчинника з паперу. На смужку паперу на відстані 5 см від верхнього краю наносять випробовуваний розчин та поруч — розчин порівняння. Папір висушують. Потім верхній край смужки паперу занурюють у верхню кювету з рухомою фазою. Під дією капілярних сил і сил тяжіння розчинник переміщується вниз смужкою паперу. Хроматографування закінчують, коли фронт розчинника досягне нижнього краю паперу (рис. 2.11).

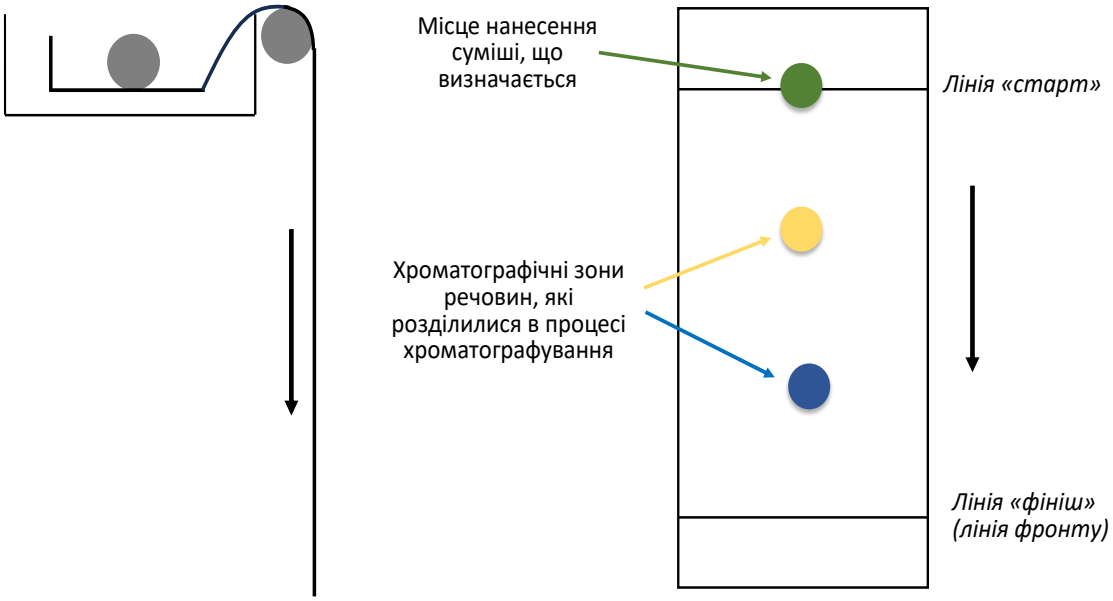


Рис. 2.11. Одновимірне низхідне хроматографування

3. Висхідне-низхідне хроматографування. Розчинник спочатку рухається вгору, а потім вниз папером (рис. 2.12).

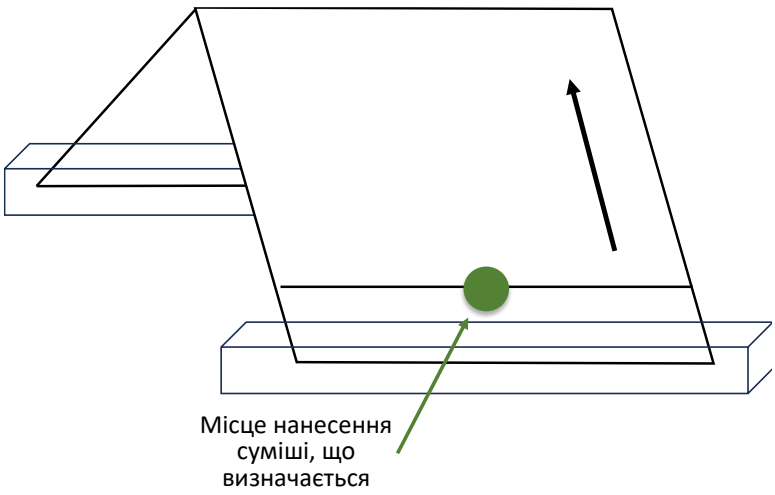


Рис. 2.12. Висхідне-низхідне хроматографування

4. Двовимірне хроматографування. Якщо складну суміш не можна розділити за допомогою одного розчинника, застосовують послідовно два розчинника з різними коефіцієнтами розподілу. Для цього вирізають з хроматографічного паперу квадрат (20 × 20, 30 × 30, 40 × 40 см). У лівому кутку на відстані 5 см від краю наносять випробовуваний розчин. Після висушування папір поміщають у камеру, занурюючи нижній кінець у розчинник. Проводять хроматографування висхідним методом.

Після досягнення розчинником верхнього краю паперу процес припиняють. Папір висушують. Потім, повернувши його на 90° проти годинникової стрілки, поміщають в іншу камеру з іншим розчинником. Знову проводять хроматографування

висхідним методом. Хроматограму після завершення процесу висушують вдруге і проявляють. Отримують двовимірну хроматограму (рис. 2.13).

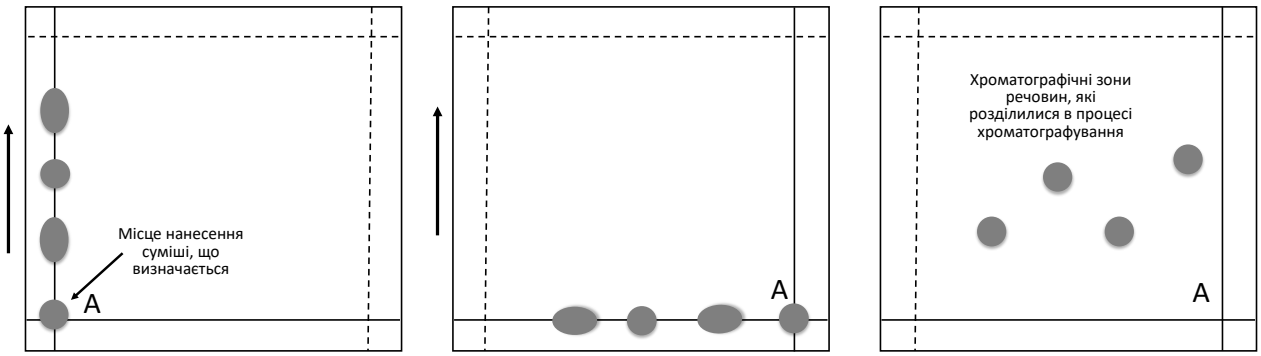


Рис. 2.13. Схема отримання двовимірної хроматографії: 1 — перша хроматограма; 2 — хроматограма перед зануренням у другу рухому фазу; 3 — друга хроматограма (суміш з шести компонентів розділилася)

5. Кругове (радіальне) хроматографування. Замість звичайних плям на папері можна отримати концентрично розташовані кільця. Це досягається шляхом кругової (радіальної) паперової хроматографії.

Для її отримання з паперу вирізують коло потрібного діаметра. У центр кола наносять розчин досліджуваної речовини. Зони нанесення висушують на повітрі або в ексикаторі. Коли зона нанесення висохне, на колі вирізають невелику смужку (*гніт*) (рис. 2.14). Смужку відгинають, коло поміщають на чашку Петрі або ексикатор (рис. 2.5) з налитим у неї розчинником (насичена рухома фаза). Зверху коло накривають іншою чашкою Петрі. Швидкість надходження розчинника в центр кола можна регулювати шириною гніту.

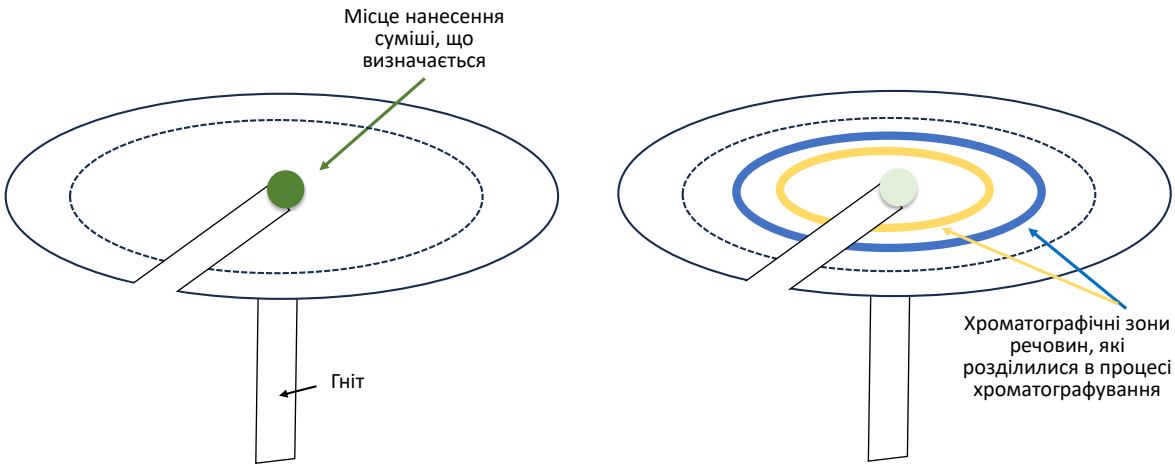


Рис. 2.14. Схема кругової (радіальної) паперової хроматографії

6. Електрофоретичне хроматографування. Прийом, в якому після впливу електричного струму проходить процес розділення суміші, отримав назву електрофоретична хроматографія. У цьому випадку папір просочують розчином електроліту, наносять краплю аналізованого розчину і закріплюють між електродами від джерела постійного струму. Після електрофорезу папір виймають з приладу, сушать і проводять хроматографування за методом висхідної або спадної хроматографії. Після хроматографування отримані зони проявляють. Як хроматографічна камера може бути використана будь-яка посудина, що герметично закривається: висока склянка, ексикатор, чашки Петрі тощо.

2.5. ЗАСТОСУВАННЯ ПАПЕРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Паперова хроматографія може використовуватися для визначення ідентичності та чистоти аналізованої речовини.

Ідентичність підтверджується під час одночасного хроматографування на одному аркуші хроматографічного паперу аналізованої та стандартної речовини. Якщо зразки ідентичні, відповідні їм зони адсорбції на хроматограмах мають однаковий вигляд і однакові значення коефіцієнта утримування. Для ідентифікації іноді доцільно хроматографувати суміш рівних кількостей аналізованої та стандартної речовин. На хроматограмі має спостерігатися одна зона, що характеризує зону адсорбції. Умови хроматографування слід підбирати так, щоб значення R_f були відмінними від 0 і не перевищували 1. Крім того, для підтвердження іденичності аналізованої речовини можуть бути використані конкретні умови її детекції (виявлення), що зазначені у фармакопейній статті.

Під час випробування на чистоту домішки та основна речовина повинні мати різні значення R_f. Про ступінь чистоти аналізованої речовини можна судити за величиною та інтенсивністю забарвлення (або поглинання) зон адсорбції домішок, що проявляються на хроматограмі.

Напрями та галузі застосування паперової хроматографії:

- ✓ контроль якості лікарських засобів (ідентифікація речовин, визначення чистоти та виявлення домішок);
- ✓ дослідження реакційних сумішей у біохімічних лабораторіях;
- ✓ виявлення забруднювачів у харчових продуктах і напоях;

- ✓ для вивчення процесу дозрівання та бродіння;
- ✓ для виявлення наркотиків і допінгу;
- ✓ в аналізі косметики.

2.6. ПЕРЕВАГИ ТА НЕДОЛІКИ МЕТОДУ ПАПЕРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Перевагами методу паперової хроматографії є його швидкість та експресність, мала трудоємність, простота проведення, що дозволяє широко застосовувати цей метод у різноманітних галузях. Методом паперової хроматографії можна ідентифікувати неорганічні й органічні сполуки, а для аналізу необхідна невелика кількість зразка. Паперова хроматографія дешевша і не займає багато місця порівняно з іншими хроматографічними методами.

Обмеження паперової хроматографії полягають у неможливості працювати з великою кількістю зразка; метод неефективний у кількісному аналізі та для розділення складних сумішей; менш точний порівняно з іншими хроматографічними методами. Ще одним недоліком методу є залежність коефіцієнта затримки (R_f) від щільності паперу та напрямку його волокон.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Наведіть класифікацію хроматографічних методів за технікою виконання дослідження, зазначте до якого виду належить хроматографія на папері.
2. Зазначте головні особливості методів, що належать до планарної (площинної) хроматографії.
3. Особливості проведення хроматографії на папері.
4. У чому різниця між розподільною та адсорбційною паперовою хроматографією?
5. Охарактеризуйте компоненти хроматографічного процесу в методі паперової хроматографії: нерухома та рухома фаза, аналізована проба.
6. Які існують види та вимоги до хроматографічного паперу, яку функцію він виконує?

7. Які види хроматографічних камер використовуються у хроматографії на папері? Яке їх призначення?

8. Зазначте, які існують вимоги до аналітичних розчинників, що використовуються для виготовлення рухомої фази (елюенту).

9. Які пристрої використовують для несення проби на хроматографічний папір?

10. Охарактеризуйте способи виявлення хроматографічних зон у паперовій хроматографії. Яке обладнання використовується?

11. Наведіть основні етапи проведення дослідження під час аналізу речовин методом хроматографії на папері.

12. Способи проведення паперової хроматографії: одновимірне висхідне та нисхідне хроматографування; двовимірне хроматографування; кругове (радіальне) хроматографування.

13. Розрахунок коефіцієнта утримування (затримки). Його зв'язок із фізико-хімічними властивостями речовини. Які фактори на нього впливають?

14. Наведіть переваги та недоліки методу паперової хроматографії, галузі його застосування.

Тема 3. МЕТОДИ ТОНКОШАРОВОЇ ТА ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

ГЛОСАРІЙ

Тонкошарова хроматографія — це метод розділення й аналізу сумішей речовин, що базується на їхній різній сорбованості тонким шаром сорбенту (нерухомою фазою) під час руху по ньому розчинника (рухомої фази).

Пластина для тонкошарової хроматографії — це підготовлена пластинка зі спеціальною поверхнею для нанесення нерухомої фази, на якій проводять аналіз у методі тонкошарової хроматографії.

Пластина для високоефективної тонкошарової хроматографії — це пластина, яка використовується для удосконалення роздільної здатності у методі високоефективної тонкошарової хроматографії та має менший розмір частинок сорбенту.

Хроматографічна камера — це пристрій, який використовується для проведення тонкошарової хроматографії, забезпечуючи оптимальні умови для руху рухомої фази та взаємодії з нерухомою фазою.

Рухома фаза у методі тонкошарової хроматографії — це рідина, яка рухається по поверхні нерухомої фази і переносить аналізовані речовини для їхнього розділення.

Коефіцієнт утримування — це величина, яка вказує на здатність речовини залишатися у нерухомій фазі під час руху рухомої фази. Визначається як відношення відстані, пройденої речовиною, до відстані, пройденої рухомою фазою.

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) — швидкий, чутливий і відносно недорогий метод, який використовується для визначення кількості компонентів у суміші, перевірки ідентичності та чистоти сполуки, моніторингу перебігу реакції, визначення складу розчинника для препаративного розділення, а також аналізу фракції, отриманої за допомогою колонкової хроматографії тощо.

Метод ТШХ був запропонований у 1938 році (М. А. Ізмайлов, М. С. Шрайбер), однак широко використовуватися для аналізу він став значно пізніше. Значний внесок у розвиток ТШХ зробили Ю. Кірхнер та Е. Шталь. Так, наприклад, Е. Шталь розробив

обладнання для методу ТШХ, показав його практичну значущість і у 1956 році вперше запропонував теоретичне керівництво щодо використання цього методу.

Метод ТШХ ще має назву «***хроматографія у тонкому шарі сорбенту***» (рис. 3.1), оскільки хроматографічний процес перебігає під час проходження рухомої фази (елюенту) крізь стандартизований тонкий шар сорбенту або носія, який нанесений і зафіксований на підхожій інертній поверхні. Перед хроматографуванням розчини речовин, що аналізують, наносять на пластину. Метод заснований на тому, що речовини, які розділяються, по-різному розподіляються між адсорбційним шаром і елюентом, що протікає через нього. Унаслідок чого відстані, на які зміщуються речовини за один і той же час, відрізняються.

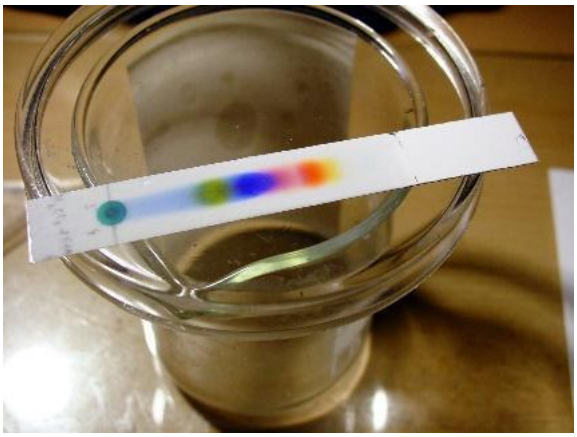


Рис. 3.1. Хроматографія у тонкому шарі сорбенту

Метод високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) відрізняється від методу ТШХ більш високою чутливістю, ефективністю та швидкістю, що забезпечується використанням спеціальних ВЕТШХ-пластин, що мають менший розмір частинок сорбенту.

Механізми процесу розділення речовин у тонкому шарі сорбенту можуть бути різними. Залежно від природи аналізованих речовин, складу тонкого шару, властивостей використовуваних розчинників, розділення речовин на пластинах може відбуватися в результаті *адсорбції* (вибіркового поглинання речовини з рідкого середовища поверхневим шаром адсорбенту) або в результаті *розподілу* компонентів суміші між двома рідинами, що не змішуються між собою. Іноді розділення речовин досягається внаслідок *іонного обміну* тощо. На практиці спостерігається поєднання декількох механізмів розділення у процесі аналізу одних і тих же речовин в однакових умовах.

3.1. ОБЛАДНАННЯ ТА УСТАТКУВАННЯ МЕТОДІВ ТШХ/ВЕТШХ. КОМПОНЕНТИ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ПРОЦЕСУ

ТШХ/ВЕТШХ-пластини. ТШХ-пластина складається з підкладки та шару сорбенту (рис. 3.2). Розрізняють пластинки з незакріпленим та закріпленим шаром сорбенту. Для виготовлення пластинок із закріпленим шаром до сорбенту додають в'яжучий (закріплювальний) компонент, унаслідок чого шар сорбенту стає стійкішим до механічних впливів.

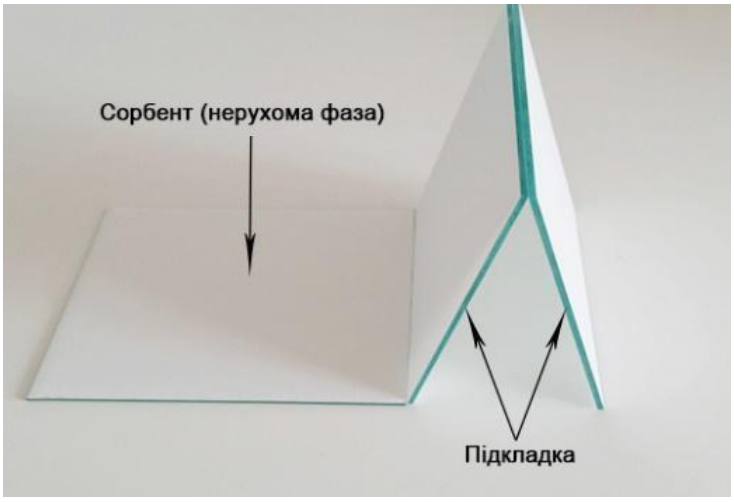


Рис. 3.2. Розміщення сорбенту на підкладці

1.1. Підкладка. Для аналізу методом ТШХ зазвичай використовують скляні, алюмінієві або пластикові підкладки (рис. 3.3) розміром 10 × 10, 10 × 20 або 20 × 20 см, що вкриті шаром сорбенту. ВЕТШХ-пластини зазвичай виготовляють того ж розміру зі скла або алюмінію.



А **Б** **В**

Рис. 3.3. Пластини на скляній (**А**), алюмінієвій (**Б**) та пластиковій (**В**) підкладці

Скло, як підкладка для ТШХ/ВЕТШХ-пластин, має свої переваги: воно жорстке та прозоре, хімічно стійке та термостабільне. Однак скляні пластини відносно важкі, їх складніше розрізати до потрібного розміру, оскільки скляна підкладка крихка і дуже чутлива до руйнування. Для розрізання скляних пластин використовують склоріз або спеціальне устаткування із закріпленим склорізником (рис. 3.4).



А **Б**

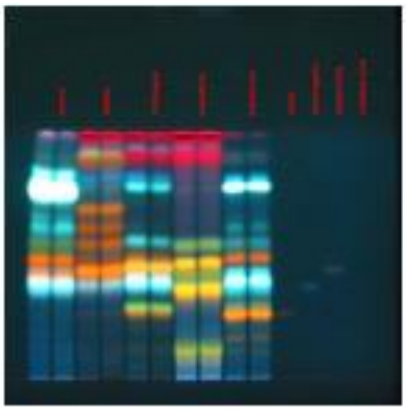
Рис. 3.4. Розрізання пластини на скляній підкладці (**А**)
та на алюмінієвій підкладці (**Б**)

Алюмінієва фольга є одним із найзручніших матеріалів для роботи з-поміж усіх наявних матеріалів для пластин ТШХ. Порівняно зі скляними пластинами пластини з алюмінієвої фольги тонкі, легкі та прості у роботі. Їх можна легко обрізати ножицями до потрібних розмірів. Крім того, алюмінієві пластини мають міцне зчеплення шару адсорбенту і добре підходять для використання з елюентами, що містять високу концентрацію води. Але порівняно зі склом вони не настільки хімічно стійкі до реагентів, що містять сильні кислоти, концентрований аміак або йод.

Дедалі рідше використовуються пластикові плівки з поліетилентерефталату (ПЕТ). Перевага пластикових підкладок в тому, що вони тонкі, легкі, легко ріжуться та зручні у роботі. Однак їхня гнучкість (шар адсорбенту може розтріскуватися) і термолабільність є дуже помітними недоліками.

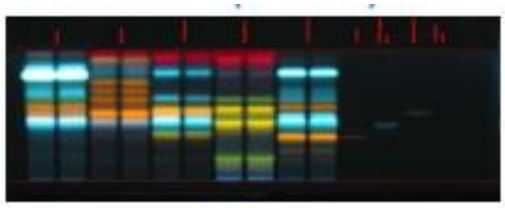
1.2. Сорбент та в'яжуча (закріплювальна) речовина. Сорбент разом із в'яжучим (закріплювальним) компонентом, що нанесений на підкладку, називають *нерухомою фазою.*

Товщина шару сорбенту для ТШХ-пластинок складає 200–500 мкм, розмір частинок становить від 5 до 40 мкм. У ВЕТШХ-пластинах товщина шару сорбенту складає 100 мкм, тоді як розмір зерен сорбенту коливається від 2 до 10 мкм. За рахунок меншого розміру частинок сорбенту в методі ВЕТШХ розділення хроматографічних зон відбувається краще, зони більш концентровані, ніж у методі ТШХ, для аналізу використовують менший об'єм проби та менші за розміром пластини (рис. 3.5).



ТШХ-пластина 20 × 20 см (відстань від лінії «старт» до «фініш» — 12 см, об'єм рухомої фази — 35 мкл, час хроматографування — 32 хв)

А



ВЕТШХ-пластина 20 × 10 см (відстань від лінії «старт» до «фініш» — 7 см, об'єм рухомої фази — 10 мкл, час хроматографування — 10 хв)

Б

Рис. 3.5. Хроматограма, одержана на ТШХ-пластині (**А**) та на ВЕТШХ-пластині (**Б**)

У багатьох фармакопеях світу присутні методики нанесення тонкого шару сорбенту на підкладку, однак останнім часом у фармацевтичному аналізі майже повністю використовують пластини промислового виробництва.

Одним з найпоширеніших та найчастіше використовуваних сорбентів у ТШХ/ВЕТШХ є *силікагель*. Його отримують шляхом осадження кислотою з розчинів силікатів або гідролізом похідних кремнію. З погляду хімії, поверхня силікагелю містить силоксанові (Si-O-Si) і гідрофільні силанольні групи (Si-O-H). Гідрофільні силанольні групи можуть бути вільними, віцинальними або гемінальними. Вони також можуть взаємодіяти одна з одною за рахунок утворення водневих зв'язків (рис. 3.6).

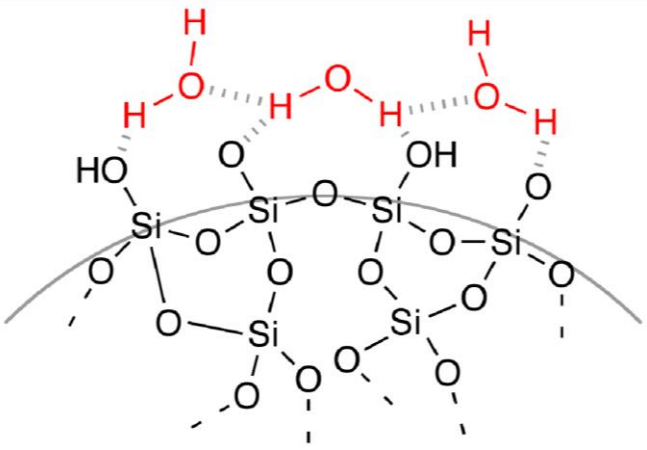


Рис. 3.6. Поверхня силікагелю

На сьогоднішній день існують методики, які дозволяють отримувати силікагель сферичної форми із заданим розміром зерен. Багато марок силікагелю мають розмір зерен 60 Å і тому на маркуванні таких пластинок міститься назва «силікагель 60». Його також можна використовувати в модифікованій формі. Модифікують силікагель трьома типами реакцій: *етерифікацією, взаємодією з хлорсиланом,* що містить необхідний органічний замісник, або *хлоруванням* з подальшою обробкою літійорганічними сполуками. Така модифікація сприяє утворенню нерухомих фаз з особливими властивостями.

Окрім силікагелю для аналізу чутливих речовин та для запобігання розкладання аналізованого зразка, використовують менш активний адсорбент — *оксид алюмінію.* Крім того, є відомості про використання як адсорбентів целюлози, поліаміду та флорисилу (силікату магнію) тощо.

Перед аналізом сполук для вибору найбільш придатного адсорбенту враховують властивості сполук, що розділяються: по-перше, гідрофільні чи гідрофобні властивості самого досліджуваного зразка, його розчинність; по-друге, чи можуть аналізовані сполуки хімічно реагувати з адсорбентом або елюентом. Виходячи з цих міркувань рекомендовано:

- ✓ для аналізу ліпофільних речовин слід використовувати силікагель, оксид алюмінію, ацетильовану целюлозу, поліамід;
- ✓ для аналізу гідрофільних речовин: слід використовувати целюлозу, целюлозні іонообмінники, поліамід і обернено-фазовий силікагель.

Приклади деяких типів нерухомих фаз у порядку збільшення їх полярності наведено на рис. 3.7.

Приблизну спорідненість загальних функціональних груп до силікагелю можна побачити на рис. 3.8.

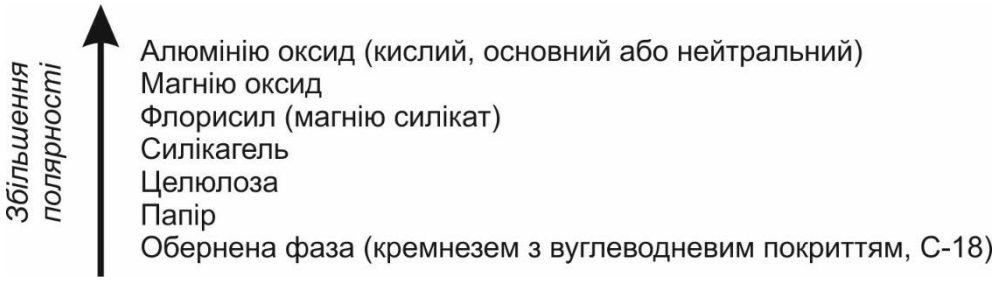


Рис. 3.7. Полярність нерухомих фаз, що використовуються у методі ТШХ

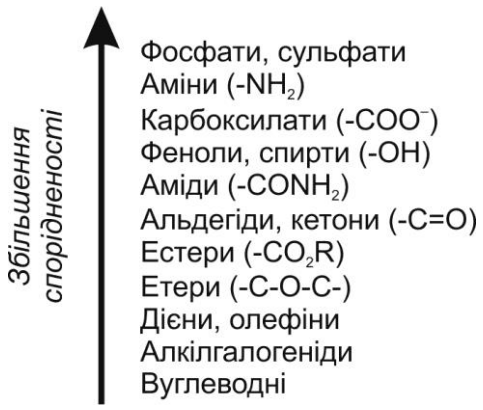


Рис. 3.8. Спорідненість загальних функціональних груп для силікагелю (приблизно)

Швидкість, з якою сполуки мігрують угору по пластині силікагелю, залежить від їх полярності. Якщо припустити, що використовується полярний адсорбент (силікагель), більш полярні сполуки будуть елююватися повільніше, оскільки будуть сильніше утримуватися сорбентом, а більш неполярні сполуки — швидше.

Для зміцнення пластин може використовуватися ***в'яжуюча (закріплювальна) речовина.*** З цією метою, наприклад, у пластинках із *силікагелем G*, використовується гіпс у кількості 13 масових відсотків. У сучасних комерційно доступних пластинках використовуються органічні в'яжучі речовини (наприклад, *метакрилат*). У літературі описано також застосування *крохмалю* і *карбоксиметилцелюлози.*

Сорбент може містити ***флуоресцентний індикатор***, що дозволяє більш зручно детектувати (виявляти) положення зон речовин. Під час опромінення індикатора ультрафіолетовим випромінюванням за довжини хвилі 254 нм індикатор випускає зелене (F_{254}) або блідо-блакитне (F_{254s}) випромінювання. Водночас зона речовини, що поглинає ультрафіолет, виглядає темною на тлі флуоресцентного шару. Приклади деяких нерухомих фаз наведено в табл. 3.1.

Силікагель має високу спорідненість до води і швидко встановлює з нею рівновагу, тому результат, що одержують у дослідженні, може деякою мірою залежати від вологості в приміщенні. Саме тому перед використанням готові пластини зі скляною та алюмінієвою підкладками звичайно активують шляхом нагріванням упродовж 20 хв (максимум до 1 год) за температури 100–105 °C, іноді до 120 °C, для видалення вологи, що знижує активність сорбенту. Пластини з полімерною підкладкою термічній активації не підлягають.

Іноді перед використанням пластини промивають, елюючи чистий розчинник або систему розчинників.

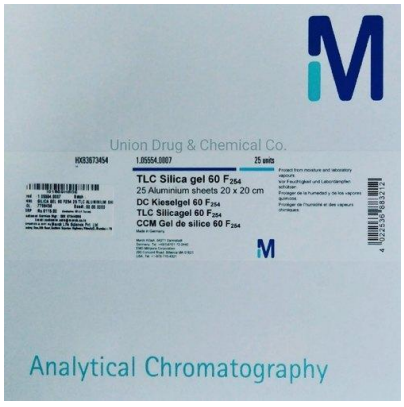
Таблиця 3.1

Нерухомі фази, що найчастіше використовуються у методі ТШХ

Нерухома фаза	Опис	Застосування
Силікагель G	Силікагель із розміром частинок 15 мкм та вмістом зв'язувального агента (кальцію сульфату) приблизно 13 %	Використовується у широкому спектрі фармакопейних тестів. На практиці можуть використовуватися комерційні пластини, які містять різні типи зв'язувального агента
Силікагель GF_{254}	Силікагель G із додаванням флуоресцентного агента	Те саме застосування, що і Силікагель G, де має проводитися візуалізація в УФ-світлі
Целюлоза	Порошок целюлози з розміром частинок менше 30 мкм	Ідентифікація тетрациклінів
Кизельгур G	Діатомова земля, що містить як зв'язувальний агент кальцію сульфат	Використовується як тверда опора для таких нерухомих фаз, як рідкий парафін, що використовується для аналізу фіксованих олій

Перед аналізом пластини можуть бути також просочені (імпрегновані) необхідним реактивом для підвищення хроматографічного розділення шляхом обприскування пластини, її занурення у відповідний розчин або шляхом елюювання (борна кислота, нітрат срібла, пікринової кислота, солі цинку, кадмію та ін.).

В України зазвичай використовують такі марки готових пластин: «Merck» (Німеччина), «Supelco» (США) (рис. 3.9) тощо.



А

SUPELCO Analytical

Б

Рис. 3.9. Пластини фірми «Merck» (**А**), «Supelco» (**Б**)

Широкого розповсюдження набувають двофазні пластини, що покриті двома сорбентами. У першій зоні (передадсорбційна) відбувається очищення і концентрування проби, а у другій зоні — розділення компонентів суміші.

Хроматографічна камера являє собою ємність, яка виготовлена з інертного прозорого матеріалу, відповідає за розміром використовуваним пластинкам та споряджена щільно припасованою кришкою. Форма хроматографічної камери може бути прямокутної, трапецієподібної або циліндричної форми (рис. 3.10). Дно хроматографічної камери може бути пласким або розділеним на два жолоби, з допомогою чого відбувається розмежування рухомої фази — для насичення камери та елюювання.



А **Б** **В**

Рис. 3.10. Види хроматографічних камер: **А** — трапецієподібна з двома жолобами; **Б** — прямокутна з пласким дном; **В** — циліндрична

Наведені вище камери використовуються для *вертикального елюювання,* коли рухома фаза рухається вгору. Для *горизонтального елюювання* хроматографічна камера має жолоб для рухомої фази і додатково містить пристрій для подачі рухомої фази до нерухомої.

Рухома фаза (елюент). Пошук відповідної системи розчинників зазвичай є найскладнішою частиною експериментального дослідження у методі ТШХ, а система розчинників є фактором, який має найбільший вплив на вигляд одержаної хроматограми.

Рухома фаза відповідає за переміщення зразка хроматографічною системою, вибір якої має забезпечити виконання трьох умов:

- ✓ добре розділення сполук, що досліджуються;
- ✓ висока чутливість виявлених сполук;
- ✓ хороша відтворюваність коефіцієнта утримування.

Як рухому фазу в методі ТШХ/ВЕТШХ можна використовувати як індивідуальний розчинник, так і складні суміші до п’яти компонентів. Незалежно від кількості присутніх аналітичних розчинників у складі рухомої фази підготовлена система має бути гомогенною без ознак помутніння.

Рухома фаза може бути охарактеризована двома параметрами:

✓ силою розчинника, що визначає ступінь рухливості компонентів зразка по сорбенту;

✓ селективністю, що впливає на порядок зон речовин.

Крім того, для ефективного розділення компонентів суміші розчинник має мати певну чистоту.

Сила розчинника — це параметр, що визначає здатність рухомої фази переміщати речовини сорбентом. Так, слабкий розчинник не здатний зрушити зону речовини з точки нанесення, а сильний, навпаки, зміщує зону речовини практично з лінією фронту. Визначення відповідного елюенту проводиться експериментально.

Типовими елюентами у методі ТШХ є алкани, циклоалкани, пентен-1, галогенметани, спирти, органічні кислоти, вода, ацетон, прості та складні ефіри, ацетонітрил, бензен та його похідні, диметилформамід, диметилсульфоксид тощо. Для вибору розчинника завжди звертають увагу на його полярність та температуру кипіння. Перевагу мають леткі розчинники з низькою температурою кипіння, оскільки вони швидше випаровуються з поверхні пластини після хроматографування.

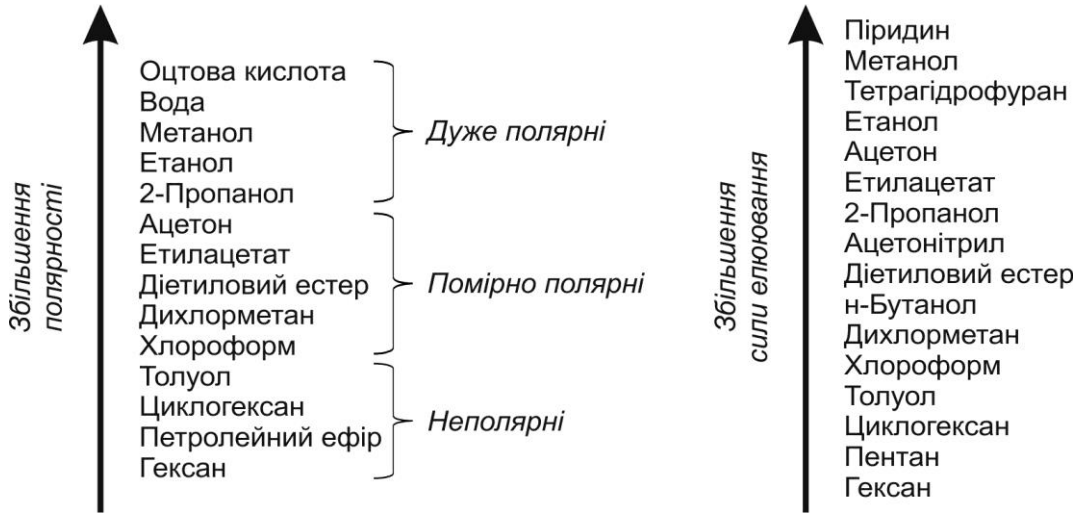


Рис. 3.11. Поширені розчинники для рухомої фази,
що перераховані в порядку збільшення полярності

На рис. 3.11 перераховані типові розчинники в порядку збільшення полярності. Чим полярніший розчинник або суміш розчинників, тим далі вони просуватимуть полярну сполуку вгору по ТШХ-пластині із силікагелем. Коли аналізуються неполярні сполуки, не буде помітного збільшення відстані, що переноситься зі збільшенням полярності рухомої фази, оскільки вони мігрують до фронту розчинника за більшості

умов. Хоча вода полярна, існують практичні труднощі з використанням чистого розчинника, оскільки багато органічних сполук погано розчиняються у воді; тому він зазвичай використовується у рухомих фазах, що містять змішуваний з водою органічний розчинник як метанол. Досить тонких змін у розділенні можна досягти, використовуючи складні суміші розчинників.

Таку властивість, як полярність, складно описати, тому на сьогоднішній день існують декілька підходів, що використовуються з цією метою: через дипольний момент та через діелектричну проникність. Багато наукових дослідників радять використовувати ***індекс полярності за Снайдером (P`)***, оскільки він описує полярність одним числом та є зручним у використанні. Завдяки індексам полярності Снайдера, з одного боку, можна оцінити полярність того чи іншого розчинника, а з іншого боку — полярність однієї системи (елюенту) відносно іншої.

Розрахунок індексу полярності за Снайдером проводять шляхом додавання індексів полярності розчинника, помножених на об'ємну частку кожного розчинника у суміші. Наприклад, необхідно розрахувати полярність суміші гексан — етилацетат (50:50) і порівняти її з полярністю суміші діетиловий ефір — метанол (80:20). Для першої системи розчинників індекс полярності за Снайдером буде становити: 0,0 • 0,5 + 4,3 • 0,5 = 2,15, де 0 та 4,3 — індекси полярності гексану та етилацетату, 0,5 — об'ємна частка. Для другої системи розчинників індекс полярності буде становити: 2,8 • 0,8 + 6,6 • 0,2 = 3,56. Тобто друга суміш більш полярна і вона буде краще елюювати полярні компоненти із сорбенту, ніж перша рухома фаза. Якщо ж ми визначаємо полярні сполуки, то перевагу буде мати друга рухома фаза і навпаки.

Пристрої для нанесення проби. Для нанесення проби на пластинку використовують мікропіпетки, калібровані капіляри, мікрошприци або інші пристрої, придатні для точного дозування і нанесення дуже малих кількостей речовини (рис. 3.12).



А **Б**

Рис. 3.12. Пристрої для нанесення речовин на пластину:

А — мікрошприци; **Б** — калібровані капіляри

Перед аналізом мікрошприц тричі промивають чистим розчинником (метанолом, етанолом), а потім тричі випробовуваним розчином і лише після цього його заповнюють випробовуваним розчином. Після нанесення проби мікрошприц знову промивають чистим розчинником.

Пристрої для нагрівання пластини. Для прискорення процедури нанасення випробовуваних розчинів можуть бути використані спеціальні пристрої, які підігрівають підкладку пластини та сприяють швидшому випаровуванню розчинника випробовуваного розчину (рис. 3.13).



Рис. 3.13. Пристрої для підігріву підкладки пластини

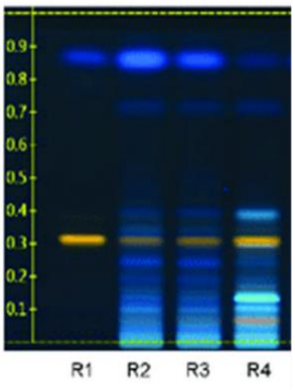
Виявлення хроматографічних зон (детектування) речовин на хроматограмі здійснюють різними способами:

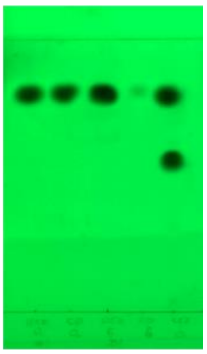
1. Візуально, якщо речовини утворюють забарвлені зони. Наприклад, розчини пігментів або барвників після хроматографування будуть зразу давати характерні кольорові хроматографічні зони (рис. 3.14).



Рис. 3.14. Хроматограма розчинів барвників

2. Якщо речовини флуоресціюють чи фосфоресціюють або на пластинку нанесений відповідний флуоресцентний індикатор, то такі речовини проявляються під дією УФ-світла за певної довжини хвилі (рис. 3.15). Як джерело УФ-світла використовують спеціальні УФ-кабінети (рис. 3.16).





А **Б**

Рис. 3.15. Хроматограма в УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм (**А**) та 254 нм (**Б**)



Рис. 3.16. УФ-кабінет

3. За допомогою спеціальних детектувальних реактивів (проявників), які вступають у хімічну реакцію з аналізованими сполуками з утворенням характерних кольорових зон (рис. 3.17).

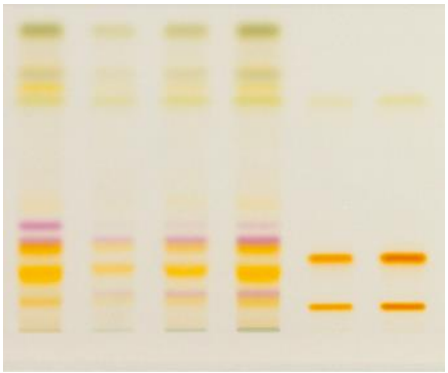


Рис. 3.17. Хроматограма після нанесення детектувальних реактивів

Проявники наносять на пластину, розпилюючи розчин з пульверизатора або шляхом занурення у відповідний розчин (рис. 3.18).

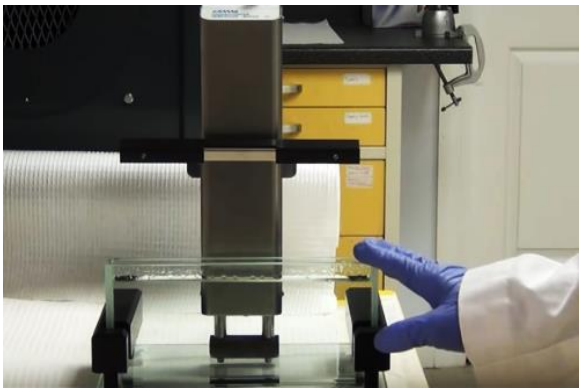


Рис. 3.18. Пристрій для занурення пластини

3.2. ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТОДАМИ ТШХ/ВЕТШХ

Аналіз методом ТШХ/ВЕТШХ складається із таких *етапів:*

I. Підготовка хроматографічної пластини.

II. Підготовка хроматографічної камери та рухомої фази.

III. Підготовка досліджуваних зразків та нанесення на пластину.

IV. Хроматографування (елюювання).

V. Видалення залишків рухомої фази та виявлення хроматографічних зон (детектування).

VI. Розрахунок параметрів, оформлення висновку.

I. Підготовка хроматографічної пластини. Як вже було зазначено раніше, залежно від завдань аналізу підготовка пластини може полягати:

— у промиванні, елююванні пластини чистим розчинником або системою розчинників;

— у просоченні (імпрегнуванні) необхідним реактивом для підвищення хроматографічного розділення шляхом обприскування пластини, її занурення у відповідний розчин або шляхом елюювання;

— в активуванні пластини шляхом нагрівання у термостаті за температури 100–105 °С, інколи 120 °С протягом 20 хв (максимум до 1 год) для видалення вологи із сорбенту.

Якщо немає інших указівок у відповідній нормативній документації, відступають не менше 15 мм від нижнього краю пластини і графітовим олівцем креслять лінію, що має назву *лінія «старт»*. Від лінії «старт» відступають *відстань, що має пройти рухома фаза*, та креслять *лінію «фініш»*. Відстань, що має пройти рухома фаза (фронт розчинника), має бути не менше 50 мм або не менше 30 мм для високоефективних пластинок (рис. 3.19).



Рис. 3.19. Типова схема хроматограми

II. Підготовка хроматографічної камери та рухомої фази. Якщо немає зазначень у нормативній документації за замовчуванням використовують насичену хроматографічну камеру. Для цього хроматографічну камеру вистилають фільтрувальним папером, який на декілька міліметрів не доходить до верхнього краю камери. На дно камери наливають необхідну кількість рухомої фази і витримують протягом 1 год за температури від 20 до 25 °С. За цей час відбувається насичення камери, про що свідчить повне змочування фільтрувального паперу рухомою фазою.

Іноді хроматографування проводять у ненасиченій камері, що має бути зазначено у нормативній документації.

Для приготування рухомої фази в окремій колбі з притертою пробкою змішують компоненти системи розчинників. Утворена рухома фаза має бути прозорою. Іноді змішування компонентів рухомої фази проводять у ділильній лійці, після чого відділяють верхній або нижній шар.

Приклад розрахунку:

Необхідно приготували 50 мл рухомої фази *етанол (96 %) Р — вода Р* у співвідношенні *(70:30)*. Існує декілька варіантів розрахунку.

Співвідношення 70:30 означає, що необхідно взяти 70 частин етанолу та 30 частин води, щоб отримати об'єм 50 мл. Відповідно: 70х + 30х = 50, 100х = 50, х = 0,5, 70 · 0,5 = 35 мл *етанолу (96 %) Р,* 30 · 0,5 = 15 мл *води Р,*

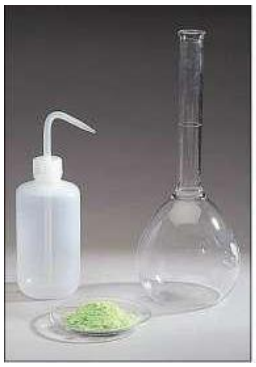
або

співвідношення 70:30 означає, що необхідно змішати 70 мл *етанолу (96 %) Р* і 30 мл *води Р*, загальний об'єм рухомої фази, що отримаємо — 100 мл. Нам потрібно 50 мл, що удвічі менше. Відповідно, всі компоненти рухомої фази необхідно зменшити у 2 рази: 70 : 2 = 35 мл *етанолу (96 %) Р,* 30 : 2 = 15 мл *води Р.*

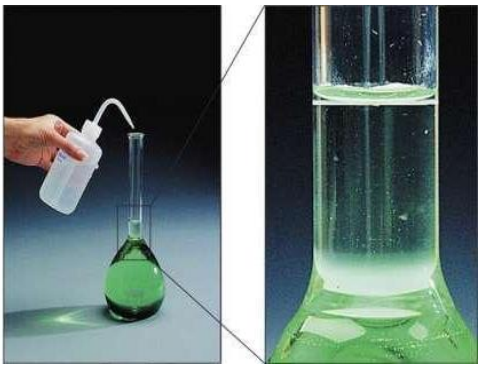
III. Підготовка досліджуваних зразків та нанесення на пластину. Цей етап полягає у приготуванні випробовуваних розчинів для аналізу (рис. 3.20).



На аналітичних вагах беруть наважку речовини



Поміщають наважку у відповідну мірну колбу



Розчиняють у невеликій кількості розчинника, доводять об'єм розчину до позначки, перемішують

Рис. 3.20. Підготовка досліджуваних зразків та нанесення на пластину

Для розчинення проби використовують розчинник, у якому повністю мають розчинитися всі компоненти проби. Розчинник має швидко видалятися з пластини і добре змочувати шар сорбенту.

Приклад розрахунку:

Необхідно приготували *2 % розчину випробовуваної речовини.* 2 % розчин означає, що 2,0 субстанції необхідно помістити у мірну колбу на 100,0 мл, розчинити у невеликій кількості розчинника, довести об'єм розчину до мітки. На виході ми отримаємо 100 мл 2 % розчину випробовуваної речовини.

Однак на практиці зазвичай готують розчини менших об'ємів, наприклад, 10, 20, 25 або 50 мл. Для приготування *2 % розчину випробовуваної речовини об'ємом 10,0 мл,* необхідно взяти мірну колбу на 10,0 мл та помістити у неї 0,2 г субстанції: 2,0 г — 100 мл, X г — 10 мл, X = 0,2 г.

Аналогічно проводимо розрахунки для приготування 20 мл 2 % розчину випробовуваної речовини: 2,0 г — 100 мл, Y г — 20 мл, Y = 0,4 г.

Необхідно взяти мірну колбу на 20,0 мл та помістити у неї 0,4 г субстанції.

Пробу, що досліджується, рекомендують наносити на пластинку у вигляді розчинів у порівняно легколеткому розчиннику — метанолі, хлороформі або ацетоні. Рідини, що мають більш низьку температуру кипіння (наприклад, діетиловий ефір), збільшують похибку в разі нанесення і діаметр плями.

Розчини наносять якомога меншими порціями, одержуючи круглі плями від 2 до 5 мм у діаметрі (від 1 до 2 мм для високоефективних пластинок).

Іноді, особливо для аналізу лікарських засобів рослинного походження та ЛРС, фармакопея рекомендує наносити пробу у вигляді смуг завдовжки від 10 до 20 мм (від 5 до 10 мм для високоефективних пластинок) і завширшки від 1 до 2 мм. Збільшення плями, що наноситься, дуже позначається на розмірах плям, отриманих у результаті хроматографування, погіршуючи розділення. Тому загальний об'єм проби не має перевищувати 0,01 мл. Відповідно підбирається концентрація розчину.

Допускають відстань мінімум 10 мм (5 мм для високоефективних пластинок) між центрами округлих плям і 5 мм (2 мм для високоефективних пластинок) між боками смуг.

Пластину з нанесеними розчинами також підсушують для видалення розчинників. За поганого просушування зони для нанесення можуть виникнути певні порушення процесу елюювання.

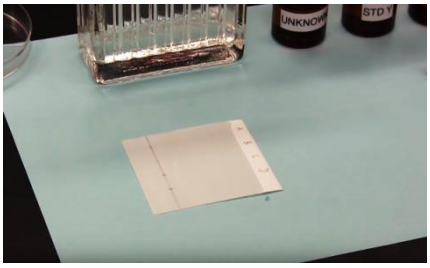
IV. Хроматографування (елюювання). Приклад цього процесу наведено на рис. 3.21.



Пластинку з нанесеними розчинами поміщають у хроматографічну камеру з рухомою фазою, слідкуючи за тим, щоб плями лежали вище рівня рухомої фази



За рахунок дії капілярних сил розчинник рухається вздовж сорбенту і переносить компоненти суміші з різною швидкістю



Коли фронт розчинників пройде зазначену в монографії відстань, пластинку виймають з хроматографічної камери

Рис. 3.21. Хроматографування (елюювання)

V. Видалення залишків рухомої фази та виявлення хроматографічних зон (детектування). Пластину висушують або за кімнатної температури, або у потоці повітря та виявляють хроматографічні зони.

VI. Розрахунок параметрів, формування висновку. *Ідентифікація.* Основну зону на хроматограмі, одержаній для випробовуваного розчину, порівнюють візуально з відповідною зоною на хроматограмі, одержаній для розчину порівняння, порівнюючи забарвлення, розмір і *коефіцієнт затримки* (R_f) обох зон (див. розділ «Паперова хроматографія. Розрахунок параметрів»).

Для більш надійної ідентифікації досліджуваних речовин застосовують «свідків» — розчини стандартних речовин (в тому ж розчиннику, що й проба). Стандартну речовину наносять на лінію «старту» поруч з аналізованою пробою і хроматографують за однакових умов.

Розрахунок коефіцієнта утримування проводять для ідентифікації речовини та визначення супровідних домішок.

Випробування на супровідні домішки. Додаткову пляму (плями) на хроматограмі, одержаній для випробовуваного розчину, порівнюють візуально з відповідною плямою (плямами) на хроматограмі, одержаній для розчину порівняння. Розчин порівняння може містити як саму домішку (домішки), так і різні розведення випробовуваного розчину. Перевірка розділювальної здатності. Вимоги для перевірки розділювальної здатності зазначають у відповідних монографіях.

Перевірка чутливості. Чутливість вважається задовільною, якщо пляма або смуга чітко проявляється на хроматограмі, одержаній з найбільш розведеним розчином порівняння.

Вміст домішок може бути визначено напівкількісно. Для цього на одному аркуші паперу одночасно хроматографують певну кількість аналізованої речовини і кілька зразків домішки («свідка») з різними, точно відомими концентраціями. Вміст домішки в аналізованому зразку оцінюють, порівнюючи її зону адсорбції на хроматограмі за сукупністю площі зони адсорбції та інтенсивністю забарвлення (або поглинання) із зонами адсорбції речовини-«свідка».

Для кількісного аналізу застосовують спеціальні прилади, що дозволяють проводити вимірювання в ультрафіолетовій та видимій ділянках спектра. Для оброблення хроматограм у видимій ділянці спектра доцільно використовувати планшетні сканери та відповідне програмне забезпечення. Можна проводити кількісне визначення речовин після їх екстракції з хроматограми. Для цього зони адсорбції вирізають і екстрагують визначувану речовину відповідним розчинником. Вміст аналізованої речовини у витяжці або сухому залишку після відгонки розчинника знаходять будь-яким методом, який придатний для визначення малих концентрацій і враховує будову аналізованої речовини.

3.3. ГАЛУЗІ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ ТШХ/ВЕТШХ

✓ Фармацевтична галузь (контроль якості лікарських засобів: ідентифікація, однорідність дозування, тести на чистоту лікарського засобу та стабільність, виявлення фальсифікатів).

✓ Клінічні дослідження (аналіз метаболізму, скринінг ліків, допінг-контроль).

✓ Харчова галузь (контроль якості продуктів харчування, добавок, пестицидів, тести на стабільність).

✓ Косметологія (доброякісність сировини; консерванти, барвники; скринінг на наявність заборонених речовин).

✓ Промислове застосування (розроблення й оптимізація процесів, моніторинг виробничих процесів, валідація очищення).

✓ Екологія (аналіз води, ґрунту, залишкового вмісту речовин).

✓ Криміналістика (визначення фальсифікацій, аналітична токсикологія, аналіз барвників та чорнил) тощо.

3.4. ПЕРЕВАГИ ТА НЕДОЛІКИ МЕТОДІВ ТШХ/ВЕТШХ

З-поміж *переваг* методів ТШХ/ВЕТШХ виділяють:

✓ Використовується більш просте обладнання порівняно з методами рідинної чи газової хроматографії.

✓ Можливість проведення повного аналізу суміші невідомого складу, оскільки дослідник має можливість побачити, чи не залишилися на старті неелюйовані компоненти.

✓ Мають досить високу селективність, яку легко змінювати, добираючи склад рухомої фази, немає обмежень у виборі розчинників.

✓ Дають можливість одночасного розділення декількох зразків, використання одноразового і багаторазового елюювання.

✓ Можливе детектування (виявлення) сполук з високою чутливістю та селективністю, які можна змінювати добором проявника; отримані результати легко оцінити візуально.

✓ Хроматограми можна зберігати для подальшого детектування і здійснення спектральної ідентифікації хроматографічних зон після розділення у будь-якому діапазоні довжин хвиль.

З-поміж *недоліків* методів можна зазначити:

✓ Невелика довжина пластин.

✓ Чутливість нижча, ніж у методі високоефективної рідинної хроматографії.

✓ Залежність результатів аналізу від навколишнього середовища.

✓ Труднощі в роботі зі зразками, які мають високу леткість, а також з речовинами, чутливими до дії кисню повітря чи світла.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Наведіть класифікацію хроматографічних методів за технікою виконання дослідження, зазначте до якого виду належить хроматографія у тонкому шарі.
2. Ознайомтеся з історією відкриття методу тонкошарової хроматографії.
3. Які особливості проведення хроматографії у тонкому шарі сорбенту?
4. Охарактеризуйте компоненти хроматографічного процесу в методах тонкошарової та високоефективної тонкошарової хроматографії: нерухома та рухома фаза, аналізована проба.

5. Які існують види та вимоги до хроматографічних пластин? Охарактеризуйте складові компоненти пластини: підкладка, сорбент, в'яжучий компонент. Назвіть відмінності між пластинами для тонкошарової та пластинами для високоефективної тонкошарової хроматографії.

6. Які види хроматографічних камер використовуються? Які особливості їх підготовки до аналізу?

7. Зазначте, які існують вимоги до аналітичних розчинників, що використовуються для виготовлення рухомої фази (елюенту)?

8. Які пристрої використовують для нанесення проби? Які їх переваги та недоліки?

9. Охарактеризуйте способи виявлення хроматографічних зон у методах ТШХ/ВЕТШХ? Яке обладнання використовується?

10. Наведіть основні етапи проведення дослідження під час аналізу речовин методом хроматографії у тонкому шарі.

11. Як виявляють хроматографічні зони після елюювання? Яке обладнання використовується?

12. Особливості проведення дослідження на апаратному комплексі Camag®.

13. Як розраховується коефіцієнт утримування (затримки) у методах ТШХ/ВЕТШХ?

14. Перевірка придатності ТШХ/ВЕТШХ-пластин.

15. Наведіть переваги та недоліки методів ТШХ/ВЕТШХ, галузі їх застосування.

Тема 4. ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ

ГЛОСАРІЙ

Аналіт — це компонент, який досліджується або вимірюється у процесі хроматографічного аналізу.

Буфер — це розчин, який стабілізує pH рухомої фази.

Відтворюваність — це ступінь, до якого результати хроматографічного аналізу можуть бути повторені за одних і тих самих умов.

Випаровувальна світлорозсіювальна детекція — це метод детекції, який використовує розсіювання світла на частинках аналізованої речовини.

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) — це метод розділення, який використовується для ідентифікації, кількісного визначення і очищення компонентів у складних сумішах.

Гель-проникна хроматографія — це метод розділення, заснований на розмірі молекул аналізованих речовин.

Градієнтне елюювання — це метод, за якого склад рухомої фази змінюється з часом, щоб покращити розділення компонентів.

Детектор — це прилад, який реєструє компоненти, що виходять з колонки, і перетворює сигнал на вимірюваний формат.

Діодно-матричний детектор (DAD) — це тип детектора, який використовує масив діодів для вимірювання поглинання світла у широкому спектрі довжин хвиль.

Зразок — це суміш, яка вводиться у хроматографічну систему для аналізу.

Елюент — це рухома фаза, яка використовується для промивання компонентів через колонку.

Елюційний профіль — це відображення змін концентрації елюенту в градієнтному елююванні.

Ізократичне елюювання — це метод, за якого склад рухомої фази залишається постійним протягом усього процесу елюювання.

Ізотопне розділення — це метод розділення, який базується на відмінностях в ізотопному складі молекул.

Інертність — це властивість матеріалу не реагувати з аналізованими компонентами або елюентом.

Інжектор — це пристрій для введення зразка у систему ВЕРХ.

Калібрування — це процес налаштування хроматографічної системи для отримання точних і відтворюваних результатів.

Колонка — це основна частина ВЕРХ, заповнена стаціонарною фазою, де відбувається розділення компонентів.

Мас-спектрометричний детектор (МС детектор) — це тип детектора, який ідентифікує компоненти на основі їхньої маси.

Матрична ефективність — це вплив матриці зразка на результат хроматографічного аналізу.

Механічна стабільність — це властивість стаціонарної фази витримувати фізичні навантаження без змін у структурі.

Об'єм пори — це простір у стаціонарній фазі, через який можуть проходити молекули аналіту.

Пікова площа — це площа під піком на хроматограмі, пропорційна концентрації аналіту.

Піковий час — це час, у який детектор реєструє максимальну концентрацію компонента.

Полярність — це властивість молекул рухомої фази, яка впливає на їхню взаємодію зі стаціонарною фазою.

Пробовідбірник — це пристрій для автоматичного введення проб зразків у систему ВЕРХ.

Реєстратор — це пристрій для запису хроматограм у цифровому або аналоговому форматі.

Рефрактометричний детектор — це тип детектора, який виявляє зміни в показнику заломлення елюенту.

Роздільна здатність — це показник здатності хроматографічної системи розділяти компоненти суміші.

Розділювальна потужність — це здатність хроматографічної системи розділяти компоненти зразка.

Розчинник — це рідина, яка розчиняє зразок перед уведенням у систему ВЕРХ.

Рухома фаза — це рідина (елюент), яка проходить через колонку і транспортує компоненти суміші.

Стандартний зразок — це відомий зразок, використовуваний для калібрування хроматографічної системи.

Стаціонарна фаза — це нерухома фаза в колонці, яка взаємодіє з компонентами суміші, сприяючи їх розділенню.

Температурне програмування — це зміна температури системи для покращання розділення компонентів.

Ультрафіолетовий детектор (UV детектор) — це тип детектора, який виявляє компоненти, що поглинають ультрафіолетове світло.

Флуоресцентний детектор — це тип детектора, який виявляє компоненти, що флуоресціюють під дією ультрафіолетового або видимого світла.

Хемотропність — це селективність взаємодії між стаціонарною фазою і аналізованими молекулами.

Хроматограма — це графік, який відображає сигнал детектора залежно від часу, показуючи розділення компонентів.

Час утримання — це час, який потрібен компоненту для проходження через колонку до детектора.

Рідинна хроматографія являє собою метод хроматографічного розділення, заснований на різниці у розподілі молекул речовини між двома фазами, що не змішуються, в якому рухомою фазою (елюентом) є рідина, що переміщується через нерухому фазу, розміщену в колонці.

Рідинна хроматографія ґрунтується на механізмах адсорбції, масового розподілу, іонного обміну, розподілу за розмірами молекул та стереохімічних взаємодіях.

Основні вимоги до умов визначення методом рідинної хроматографії наведено у загальній статті ДФУ 2.2.29. Рідинна хроматографія.

Як будь-який інший тип хроматографічного розділення, цей метод складається з двох важливих компонентів: *рухомої* та *нерухомої фаз.*

Рухома фаза має таку назву, оскільки рухається через колонку вздовж нерухомої фази, яка утримує та/або розділяє основні компоненти будь-якої суміші (зразка).

Протягом останніх років спостерігається тенденція до підвищення використання методу рідинної хроматографії, а також високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у багатьох галузях, найбільше у фармацевтичній, хімічній, природничих

науках, харчовій промисловості та криміналістиці. ВЕРХ відрізняється використанням високого робочого тиску (50-350 бар) у спеціальному приладі (хроматографі), тоді як рух елюенту в РХ зазвичай перебігає під впливом сили тяжіння.

ВЕРХ поступово стає домінантним з-поміж інших методів аналізу. Велика кількість опублікованих наукових праць, присвячених розробці методів ВЕРХ, свідчить про його поширеність та актуальність. Переважно це пов'язано зі збільшенням кількості наукових та комерційних лабораторій, проведенням валідації методик та активною розробкою нових лікарських засобів.

Цей метод має низку переваг, а саме:

✓ *Висока чутливість.* Метод придатний для визначення речовин у надзвичайно низьких кількостях, що дозволяє застосовувати його, наприклад, в аналізі домішок.

✓ *Точність.* ВЕРХ забезпечує надійне і точне якісне та кількісне визначення, що дозволяє проводити аналіз активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та їх супутніх домішок під час одного аналізу та розділяти складні суміші. Крім того, метод ВЕРХ є більш точним у разі кількісного визначення та більш чутливим порівняно з методом тонкошарової хроматографії (ТШХ).

✓ *Відсутність обмежень щодо природи речовин для аналізу.* Порівняно з газовою хроматографією ВЕРХ придатна для аналізу нелетких і термолабільних речовин. Молекулярна маса субстанції також не впливає на можливість аналізу цим методом.

✓ *Автоматизація та висока швидкість.* Сучасні хроматографи потребують мінімального втручання хроматографіста. Весь процес аналізу, за виключенням пробопідготовки, перебігає швидко та в автоматичному режимі.

✓ *Висока відтворюваність результатів та економічна ефективність.*

Отже, можна стверджувати, що метод ВЕРХ наразі став найбільш важливим хроматографічним методом, який використовується в наукових лабораторіях. Водночас використання високого тиску для проходження розчинника через сорбент викликало необхідність у використанні колонок, виготовлених з неіржавної сталі, насосів, які здатні працювати під таким тиском, та аналітичних інструментів як детекторів.

Тому до складу будь-якого сучасного рідинного хроматографа входять п'ять обов'язкових складових частин (рис. 4.1, 4.2):

✓ насос для подачі рухомої фази через колонку;

✓ дозатор для введення проби в колонку (інжектор) — ручне введення або за допомогою автосамплера;

✓ хроматографічна колонка;

✓ детектор — пристрій для отримання аналітичного сигналу, пропорційного концентрації компонента;

✓ система реєстрації даних — перетворювач аналітичного сигналу у форму, зручну для сприйняття людиною.

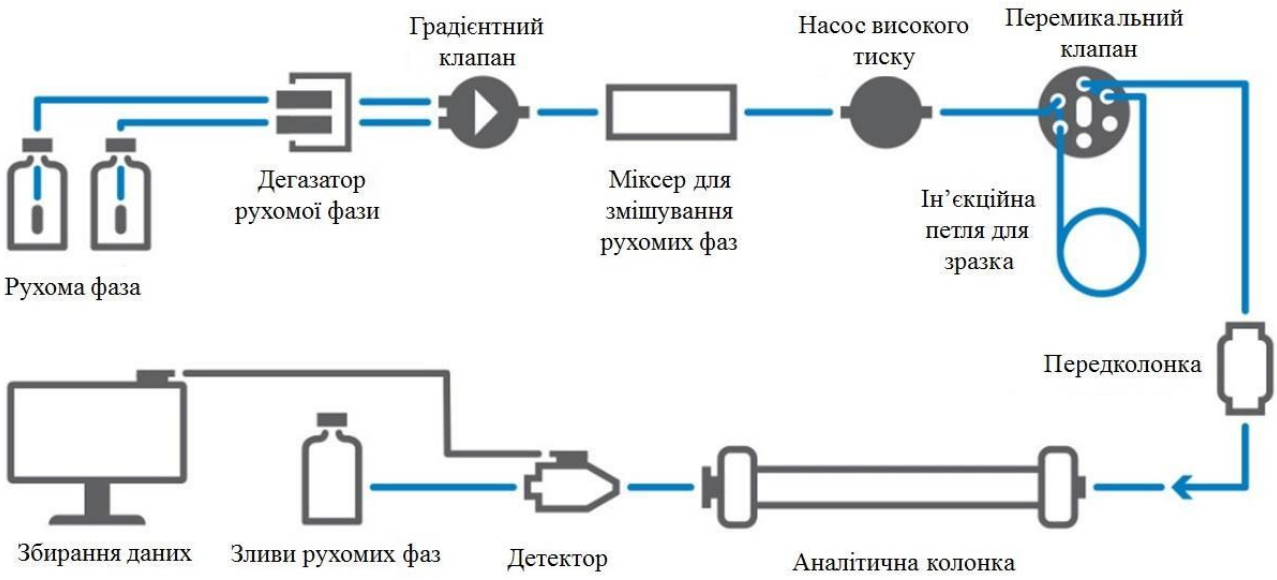


Рис. 4.1. Типова схема рідинного хроматографа



Рис. 4.2. Зовнішній вигляд рідинного хроматографа

4.1. ОБЛАДНАННЯ ТА УСТАТКУВАННЯ У МЕТОДІ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ. КОМПОНЕНТИ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Рухома фаза. Спочатку необхідно підготувати рухому фазу — процес, який передбачає змішування різних розчинників (рис. 4.3) у різних концентраціях та співвідношеннях з подальшою фільтрацією та дегазацією.

Рухома фаза звичайно подається під тиском з однієї або декількох ємностей і протікає через колонку звичайно з постійною швидкістю, а потім через детектор.

Основні властивості розчинників, що застосовуються у методі ВЕРХ:

- ✓ чистота розчинника;
- ✓ сумісність з детектором;
- ✓ в'язкість розчинника;
- ✓ безпека роботи;
- ✓ температура кипіння;
- ✓ змішуваність з іншими розчинниками;
- ✓ елюювальна сила розчинника.



Рис. 4.3. Розчинники для методу ВЕРХ

Фільтрування рухомої фази. Компоненти рухомої фази зазвичай *фільтрують* (рис. 4.4) з метою видалення частинок більше 0,45 мкм (або 0,2 мкм, якщо нерухома фаза складається із частинок менше 0,2 мкм і якщо використовуються спеціальні детектори, наприклад, нефелометричний детектор).



Рис. 4.4. Пристрій для фільтрування рухомої фази

Дегазування рухомої фази. Крім того, профільтровану рухому фазу зазвичай *дегазують* перед подаванням. Це пов'язано з тим, що бульбашки повітря у насосі можуть спричинити проблеми з подачею рухомої фази у колонку, як наслідок, це може призвести до нестабільної швидкості потоку та зміни часу утримування. Повітря в оптичних детекторах, наприклад, діодно-матричному, рефрактометричному буде розсіювати світло, що спричинить більшу кількість шумів або буде призводити до некоректної роботи детектора.

Процедуру дегазування проводять шляхом барботування гелієм, обробкою ультразвуком та/або використовуючи мембранно-вакуумні модулі у режимі on-line.

Після приготування рухому фазу поміщають у резервуар. Далі завдяки насосам рухома фаза рухається системою ВЕРХ.

Насоси, які використовуються у сучасних ВЕРХ системах, дозволяють здійснювати постійний потік рухомої фази крізь колонку за тиску до 400 бар, тоді як деякі системи надвисокого (ультрависокоефективна рідинна хроматографія — УВЕРХ, UPLC/UHPLC) можуть працювати на рівні 1000–1200 бар. Для надвисокого тиску потрібні спеціально розроблені колонки та з'єднання в приладі, які придатні для високого тиску.

Насоси забезпечують подачу необхідного об'єму рухомої фази.

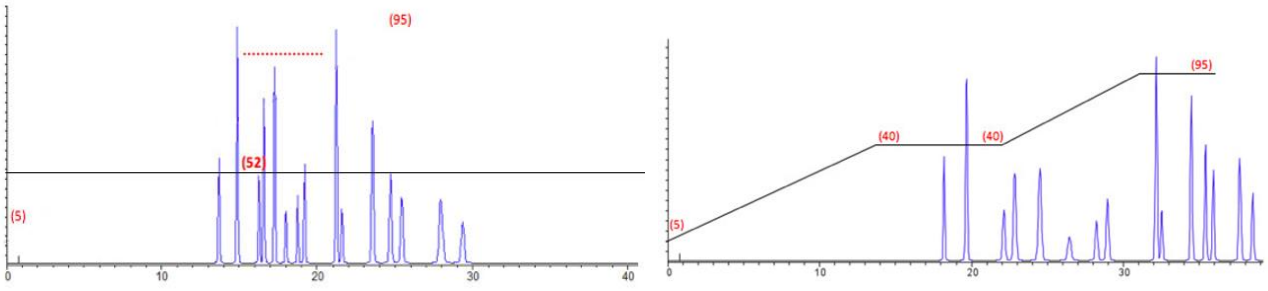
Існує два типи насосів:

- ✓ *пристрій поршневого типу*, який використовує поршень;
- ✓ *роторний насос*, що являє собою ротор з лопатями, які рухаються всередині порожнини резервуара розчинника.

Роторний насос дає більш постійний потік, але в поршневих насосах використовуються два поршні: один поршень наповнюється фазою, тоді як інший її подає, щоб забезпечити постійний потік рухомої фази.

Найбільш поширені швидкості потоку у ВЕРХ складають від 0,1 до 10 мл $хв^{-1}$.

Режими подачі рухомої фази. Подача рухомої фази може здійснюватися в *ізократичному* або у *градієнтному* режимі (рис. 4.5).



А Б

Рис. 4.5. Ізократичний (А) та градієнтний (Б) режими елюювання

За ізократичного елюювання склад рухомої фази залишається постійним протягом всієї процедури аналізу. Такий тип елюювання характеризується простотою виконання, тому його використовують для виконання рутинних завдань.

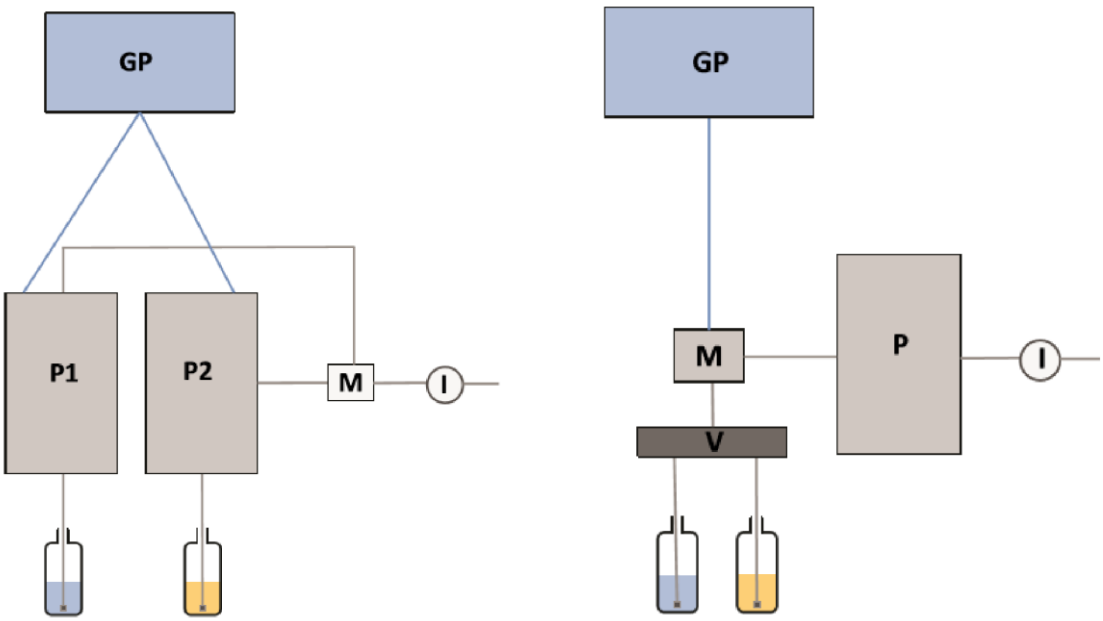
Градієнтне елюювання характеризується тим, що склад рухомої фази протягом всієї процедури аналізу змінюється (співвідношення розчинників, змінюється полярність). Градієнтний тип елюювання використовується для розділення більш складних сумішей, а також для розроблення методу з метою аналізу невідомих сумішей.

У градієнтному елююванні рухома фаза складається з двох або більше розчинників. Під час проведення аналізу їхнє співвідношення змінюється, що дозволяє розділити речовини різної хімічної природи та з різними фізико-хімічними властивостями. Зазвичай кількість органічного розчинника збільшується під час проведення аналізу. Програма градієнта має містити періоди промивання для врівноваження колонки перед початком наступного аналізу.

Є два різні способи змішування рухомих фаз (рис. 4.6):

✓ У разі перемішування низького тиску розчинники змішуються перед входом у систему високого тиску.

✓ У разі змішування високого тиску кожен з двох насосів доставляє розчинник за підвищеного тиску до міксера.



А **Б**

Рис. 4.6. Перемішування високого (**А**) та низького (**Б**) тиску:
Р — насос; М — міксер; І — інжектор

Пробопідготовка зразка. Перш ніж рухома фаза досягне колонки, в неї необхідно ввести зразок. Слід забезпечити ретельне розчинення зразка у відповідному середовищі до його введення в систему ВЕРХ. Будь-які тверді частинки, які містяться у зразку, можуть також пошкодити колонку та вплинути на ВЕРХ систему.

Розчинення зразка роблять аналогічним чином, як і у методах планарної хроматографії.

Для очищення невеликої кількості розчину зразка використовуються *мембранні шприцеві фільтри* (рис. 4.7). Вони являють собою диски, корпус яких виконаний з інертного матеріалу. У конструкції фільтрів не застосовують жодних сполучних речовин, щоб уникнути впливу цих речовин на склад випробовуваного розчину.



Рис. 5.7. Мембранний шприцевий фільтр

Інжекційна система. Сучасні системи ВЕРХ для введення зразка в колонку використовують *ручний інжектор* (рис. 4.8) або *автоінжектор (автосамплер)* (рис. 4.10).

Ручний інжектор складається з шестипортового клапана, який заповнюють зразком за допомогою зовнішньої інжекції. Обертання ротора клапана за годинниковою стрілкою розміщує заповнену зразком петлю у рухливий потік з подальшим уведенням зразка у верхню частину колонки через канал. Клапанний механізм необхідний у зв'язку з високим тиском, який спостерігається у разі використання методу ВЕРХ (рис. 4.9). Зазвичай у клапан вводиться надлишок об'єму проби для максимального заповнення петлі. Після повернення клапана та введення зразка в систему будь-який надлишковий об'єм досліджуваного зразка подається у зливи.



Рис. 4.8. Ручний інжектор

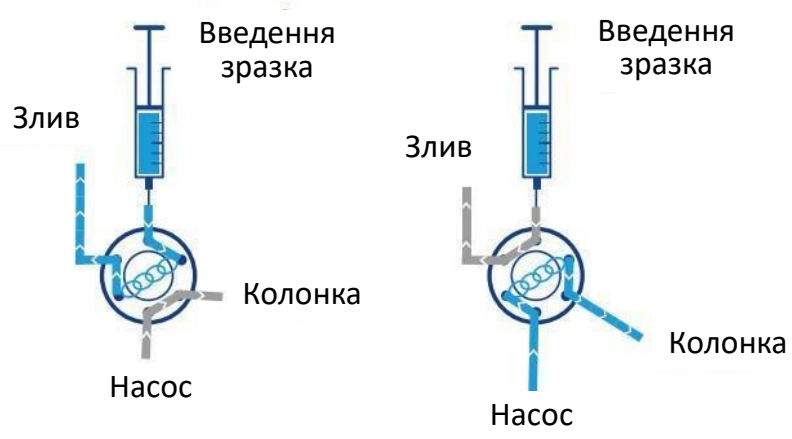


Рис. 4.9. Схема інжектора

На сьогоднішній день апарати ВЕРХ часто використовують автоматичну систему введення проби (автоінжектор, автосамплер). У такій конструкції зазвичай є кюветне відділення, що являє собою спеціальну платформу з 50–100 місцями, у які вставляються віали.

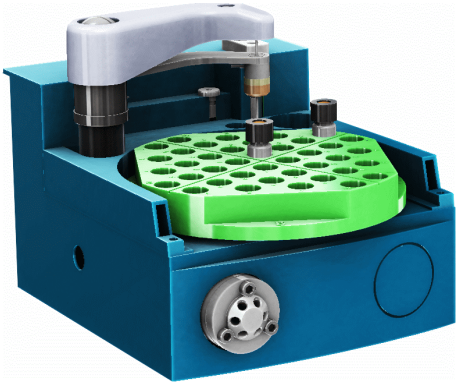


Рис. 4.10. Автоматичний інжектор (автосамплер)

Переваги використання автоматичного інжектора полягають у тому, що виключаються будь-які коливання об'єму інжекції, викликані втручанням людини, що сприяє кращій відтворюваності результатів. А також, що найбільш важливо, велика кількість зразків може бути завантажена і залишена для роботи протягом тривалого періоду часу (наприклад, протягом ночі).

Типова точність для ручного інжектора складає приблизно від 0,5 до 1,2 % відносного стандартного відхилення (RSD), автоінжектори забезпечують покращену точність і показують від 0,1 до 0,2 % RSD.

Хроматографічна колонка. Рухома фаза несе пробу з місця введення до колонки, в якій міститься нерухома фаза. Три компоненти — рухома фаза, зразок та нерухома фаза — взаємодіють, а розділення/утримання визначається за декількома факторами, з яких полярність рухомої та нерухомої фаз, розмір колонки тощо.

Колонки, які використовуються у ВЕРХ, зазвичай виготовляють з неіржавної сталі для протистояння високому тиску, який виникає під час проведення аналізу (рис. 4.11).



Рис. 4.11. Хроматографічні колонки

Внутрішня поверхня колонки має бути відшліфована для забезпечення плавного потоку розчинника.

Колонки, що застосовуються в аналізі, зазвичай мають довжину від 10 до 30 см із внутрішнім діаметром до 4,6 мм. Колонки з внутрішнім діаметром менше 2 мм часто відносять до мікроколонок.

Менші внутрішні діаметри дають більш концентровані смуги сорбентів (менше розведення проби на колонці). За зменшення внутрішнього діаметра підвищується чутливість і межа виявлення речовини для детекторів зростає.

Температура рухомої фази та колонки має підтримуватися постійною протягом усього аналізу.

Для розділення з аналітичною метою частіше використовують нерухомі фази з розміром частинок від 2 до 10 мкм (рис. 4.12). Частинки можуть бути сферичними або неправильної форми, з різною пористістю та питомою поверхнею. Ці ознаки визначають хроматографічні властивості конкретних нерухомих фаз.

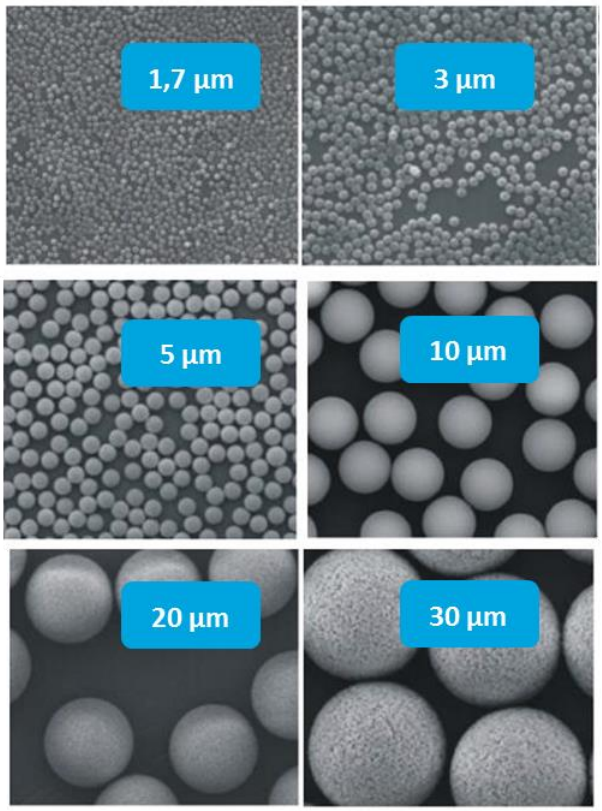


Рис. 4.12. Розмір силікагелю, що використовується у методі ВЕРХ

Частинки за розміром пор класифікують на макропористі (> 200 нм), мезопористі (2–200 нм), мікропористі (< 2 нм), непористі. Макропористі матеріали мають низьку питому площу поверхні (< 135 $м^2/г$) і великий розмір гранул, мезопористі з питомою

площею поверхні до 600 м^2/г. Непористі модифікації, наприклад, з кремнезему, мають питому площу поверхні до 300 м^2/г і малий розмір гранул до 40 нм. Для розроблення більшості методик рекомендуються колонки, які мають частинки діаметром 3–5 мкм (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Характеристики частинок, які використовують у деяких аналітичних колонках для ВЕРХ

Діаметр і характеристики зерен	Застосування
5 мкм, повістю пористі частинки	Більшість розділень
3 мкм, повістю пористі частинки	Швидке розділення
1,5 мкм, пелікулярні частинки	Дуже швидке розділення (особливо макромолекул)
Пори від 70 до 12 нм, від 150 до 400 м^2/г	Розділення малих молекул
Пори від 15 до 100 нм, від 10 до 150 м^2/г	Розділення макромолекул

Основний матеріал для сорбентів у методі ВЕРХ — ***силікагель***.

Основні переваги силікагелю:

- ✓ механічна стійкість до високого тиску;
- ✓ значна пористість;
- ✓ стійкість до дії розчинників, температури, води;
- ✓ 2 < pH < 9.

Силікагель SiO_2xH_2O має аморфну структуру, його внутрішня поверхня енергетично неоднорідна через наявність кількох типів хаотично розподілених силанольних ОН-груп. В адсорбційних процесах, крім ОН-груп, беруть участь і поверхневі силоксанові групи ΞSi-O-SiΞ. Присутня в силікагелі вода утримується в ньому в результаті взаємодії з поверхневими силанольними групами і за рахунок капілярної конденсації (рис. 4.14).

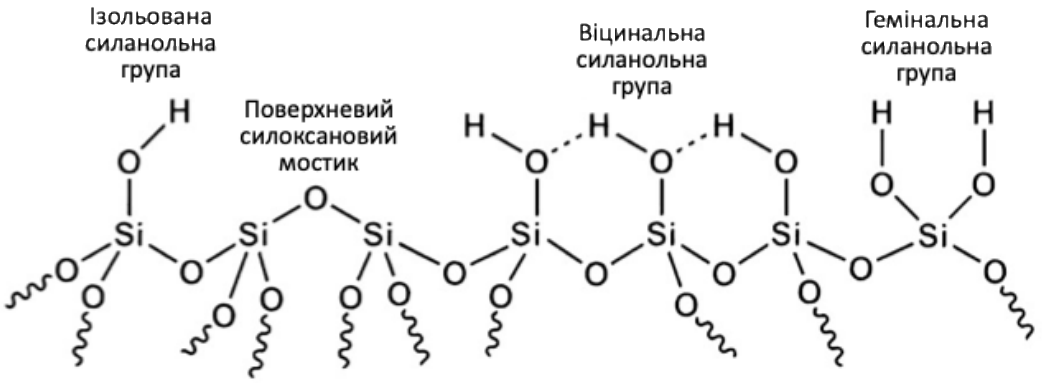


Рис. 4.14. Різні типи груп на поверхні силікагелю

Є багато інших різновидів нерухомих фаз, що застосовують у рідинній хроматографії, таких, як:

✓ силікагель, окис алюмінію або пористий графіт, використовувані у нормально-фазовій хроматографії, в якій розподіл заснований на різниці в адсорбції і/або масовому розподілі (розподільна хроматографія);

✓ смоли або полімери з кислотними або основними групами, що використовуються в іонообмінній хроматографії, в якій розподіл заснований на конкуруванні між поділюваними іонами та іонами рухомої фази;

✓ пористі силікагелі та полімери, що використовуються в ексклюзійній хроматографії, в якій розподіл заснований на розбіжностях у розмірах молекул, відповідних стеричній ексклюзії;

✓ безліч хімічно модифікованих носіїв, одержаних із полімерів, силікагелю або пористого графіту, використовуваних у нормально-фазовій (адсорбційна хроматографія) і обернено-фазовій рідинній хроматографії, в якій розподіл заснований на розподілі молекул речовини між рухомою фазою та нерухомою фазою;

✓ спеціальні хімічно модифіковані нерухомі фази, наприклад, похідні целюлози або амілози, білків або пептидів, циклодекстринів та ін., для розподілу енантіомерів (хроматографія на хіральних нерухомих фазах).

Типи носіїв, які використовуються у ВЕРХ для отримання нерухомих фаз, залежно від хімічної структури можна розділити на неорганічні, полімерні і карбонові (рис. 4.15).

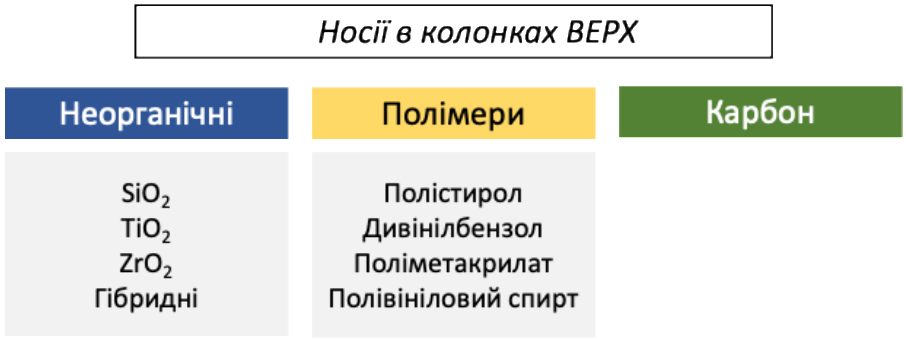


Рис. 4.15. Типи носіїв у методі ВЕРХ

Найбільш поширені сорбенти, що використовуються в обернено-фазовій хроматографії, це С18 (октадецильсилановий), С8 (октильсилановий), С4 (октабутилсилановий сорбент), С2 (етилсилановий сорбент) та ін.:

✓ ***С18 (октадецильсилановий сорбент)*** має більше довгих октадецильних груп (-$C_{18}H_{37}$) на поверхні частинок, що робить його ще більш гідрофобним. Розділення

аналітів з високою гідрофобністю: C18 використовується для розділення ароматичних сполук, амінокислот, лікарських препаратів та багатьох інших гідрофобних аналітів. Використовується у фармацевтичній хімії для аналізу та очищення лікарських речовин. Відділення та концентрація таких біологічних молекул, як білки та нуклеїнові кислоти.

✓ ***C8 (октильсилановий сорбент)*** сорбент містить октильсиланові групи ($-C_8H_{17}$) на поверхні сорбентних частинок. Ці групи взаємодіють з аналітами на основі вандерваальсових сил та гідрофобних взаємодій. Розділення гідрофобних сполук: C8 добре утримує такі гідрофобні аналіти, як ліпіди, фенольні сполуки, тригліцериди та інші органічні сполуки. C8 може бути використаний для видалення забруднень, які легко зв'язуються з його гідрофобною поверхнею. Застосовується для очищення та концентрування аналітів перед аналізом.

✓ ***C4 (октабутилсилановий сорбент)*** містить октабутилсиланові групи ($-C_4H_9$) на поверхні сорбентних частинок. Ці групи забезпечують гідрофобну взаємодію з аналітами. Розділення менш гідрофобних сполук: C4 може бути корисним для розділення аналітів, які менш гідрофобні, ніж ті, що розділяються за допомогою C18. Він використовується для аналізу алканів, фенолів, амінокислот та інших сполук. Використовується для аналізу різних органічних сполук, включаючи хімічні реакційні проміжні та дериватизовані аналіти.

✓ ***C2 (етилсилановий сорбент)*** містить етильні групи ($-C_2H_5$) на поверхні сорбентних частинок. Вони забезпечують меншу гідрофобність порівняно з C4, C8 та C18. C2 може бути використаний для видалення забруднень або домішок, які легко зв'язуються з його поверхнею. Завдяки меншій гідрофобності C2 може бути корисний для аналізу таких менших органічних сполук, як метаболіти та деривати.

Вибір конкретного сорбенту залежить від характеристик аналіту та мети аналізу.

Детектор необхідний для ідентифікації та кількісної оцінки відокремлених сполук, коли вони елюються з колонки. Після цього детектор генерує електричний сигнал, який можна побачити в програмному забезпеченні для ВЕРХ-приладу у вигляді хроматограми (табл. 4.2).

Спектрофотометричний детектор характеризується як детектор визначення ультрафіолетового поглинання. Володіє кращою чутливістю, зазвичай доходить до 10^{-8} г/мл (*0,01 ppm*). Він не реагує на коливання температури, відносно недорогий, простий в експлуатації, з ним можна працювати в режимі градієнтного елюювання. УФ-детектор чутливий до широкого спектра органічних сполук. Завдяки цим перевагам його використовують приблизно у 80 % проведених хроматографічних дослідженнях.

Винятки становлять випадки, коли розчинники володіють значним світлопоглинанням в УФ-ділянки або визначаються компоненти, які не поглинають у цій же ділянці спектра. В аналізі розчинена в рухомій фазі проба проходить через прозору кварцеву кювету. Прилад фіксує різницю між інтенсивністю ультрафіолетового випромінювання, що спостерігається для рухомої фази (без зразка) і самого зразка. Оскільки УФ-поглинання також відрізняється залежно від того, яка довжина хвилі використовується, важливо вибрати відповідну довжину хвилі залежно від типу досліджуваного зразка.

Таблиця 4.2

Види детекторів у методі ВЕРХ

Детектор	Вимірювана властивість рухомої фази	Орієнтовна чутливість, мг
Фільтровий фотометричний	Оптична густина за певної довжини хвилі, яка пропускається фільтром	10^{-10}
Спектрофотометричний, діодно-матричний	Оптична густина на вибраній довжині хвилі монохроматора: з фіксованою довжиною хвилі; зі змінною довжиною хвилі; запис на багатьох довжинах хвиль одночасно	10^{-8}
Рефрактометричний	Різниця показника заломлення розчинника і випробовуваного розчину	10^{-6}
Флуориметричний	Інтенсивність випромінювання молекул проби в елюенті	10^{-11}
Амперометричний	Струм окиснення або відновлення електрохімічно активних сполук	$10^{-9} – 10^{-11}$
Кондуктометричний	Електропровідність іонів проби в елюенті (воді)	10^{-10}
МАС-селективний	Визначення молекулярної маси сполук	10^{-13}

Рефрактометричний детектор вимірює зміну в показнику заломлення між рухомою фазою і речовинами, що аналізуються в ній. Скляна кювета ділиться на дві камери (комірки). Рухома фаза з колонки протікає через «тестову» комірку, тоді як інша комірка, яка називається «контрольною», заповнена лише рухомою фазою. Коли показник заломлення рухомої фази, яка містить аналізовані компоненти, буде відрізнятися від показника заломлення чистої рухомої фази, вимірюється різниця між ними, що

можна оцінити зміст компонентів аналізованої суміші. Рефрактометричний детектор має меншу чутливість порівняно з УФ-детектором. Однак має деякі переваги: ефективно працює з елюентами будь-якого складу, не вимогливий до чистоти рухомої фази, забезпечує роботу в широкому інтервалі швидкостей потоку. Переважно застосовується для аналізу в ізократичному режимі. Він належить до універсальних детекторів, що дають відгук для більшості компонентів проби. Наприклад, зразки, що не мають поглинання ультрафіолетового випромінювання, такі, як цукор, спирт або неорганічні іони, очевидно, не можуть бути виміряні УФ-детектором. Водночас зміна показника заломлення притаманна для всіх аналізованих речовин.

Флуоресцентний детектор. Іншим типом детекторів, що використовуються для ВЕРХ, є детектор флуоресценції, що функціонує аналогічно спектрофотометричному. Виняток становить те, що він вимірює випромінювання світла аналізованих речовин. Для флуоресційних речовин такий тип детектора більш чутливий і селективний, ніж спектрофотометричний. Приблизно 15 % всіх відомих сполук мають природну флуоресценцію. Водночас деякі сполуки, що не мають природної флуоресценції, можуть бути хімічно модифіковані, що дозволить проводити їх виявлення. Прикладом є флуоресцентне маркування аміногруп з використанням фенохінону.

Електрохімічні детектори. Існує кілька різних типів електрохімічних детекторів. Виявлення засноване на визначенні електрохімічних властивостей сполук у потоці елюенту: амперометрії, полярографії, кулонометрії і кондуктометрії. Вони мають високу чутливість, простоту, зручність і широке застосування. Він особливо придатний для використання з напівмікро- або капілярною системою.

Кондуктометричний детектор. Розчини, що містять іонні компоненти, здатні проводити електричний струм. Детектор вимірює електронний опір компонента і проводить визначення концентрації іонів, присутніх у розчині. Тому він зазвичай використовується для іонної хроматографії.

Мас-спектрофотометричний детектор. Використовують для перевірки чистоти та визначення молекулярної маси речовин. Отримана інформація особливо корисна для ідентифікації складової структури. Мас-спектральна ідентифікація хроматографованих сполук стала обов'язковою тоді, коли потрібне однозначне і достовірне підтвердження результатів, отриманих із застосуванням «звичайних» детекторів. Однак його використання не обмежується ідентифікацією структури і може бути використано для кількісного визначення дуже низької межі виявлення елементарних і молекулярних компонентів.

Вибір детектора для використання у ВЕРХ залежить від хімічної природи аналізованого зразка. Якщо зразок має хромофор (група, що здатна поглинати світло), зазвичай використовується спектрофотометричний детектор. Якщо зразок флуоресцентний, то додаткова специфічність (вибірковість) може бути досягнута шляхом використання флуоресцентного детектора. Для сполук, які не поглинають світло, може бути використаний показник заломлення, що дозволяє виявити та кількісно оцінити аналіти у зразку.

4.2. КЛАСИФІКАЦІЯ МЕТОДІВ ВЕРХ ЗА МЕХАНІЗМОМ РОЗДІЛЕННЯ

Більшість розділень, виконуваних методом ВЕРХ, ґрунтується на комбінованому механізмі взаємодії речовин із сорбентом, що забезпечує різний ступінь утримування компонентів у колонці. Чисті механізми розділення на практиці зустрічаються рідко, наприклад, адсорбційний механізм у разі використання безводного силікагелю та безводного гексану для розділення ароматичних вуглеводнів.

За змішаного механізму утримування для речовин різного складу та молекулярної маси можна оцінити внесок в утримування адсорбційного, розподільного, ексклюзійного та інших механізмів. Однак для кращого розуміння механізмів розділення у ВЕРХ доцільно розглядати розділення з домінуванням певного механізму, що належать до певного виду хроматографії, наприклад, до іонообмінної.

Адсорбційна хроматографія ґрунтується на взаємодії речовин з такими адсорбентами, як силікагель або оксид алюмінію, що мають активні центри на своїй поверхні. Відмінності у здатності до взаємодії з адсорбційними центрами різних молекул призводять до їх розділення на зони в процесі руху з рухомою фазою по колонці. Досягнуте при цьому розділення зон компонентів залежить від взаємодії як з розчинником, так і з адсорбентом.

Механізм сорбції на поверхні адсорбенту з гідроксильними групами базується на специфічній взаємодії між полярною поверхнею адсорбенту і полярними (або здатними поляризуватися) групами молекул. До таких взаємодій належать диполь-дипольні взаємодії, водневі зв'язки, утворення π-комплексів або комплексів з перенесенням заряду. Часто у практиці спостерігається хемосорбція, яка може призводити до значного збільшення часу утримування, зниження ефективності, появи продуктів розкладання або необоротної сорбції речовини.

Ізотерми адсорбції речовин можуть мати лінійну, випуклу або увігнуту форму. За лінійної ізотерми адсорбції пік речовини симетричний, а час утримування не залежить від розміру проби. Найчастіше ізотерми адсорбції речовин нелінійні і мають випуклу форму, що призводить до асиметрії піку з утворенням хвоста.

В адсорбційній хроматографії найбільш часто використовуються адсорбенти із силікагелю різної пористості, поверхні та діаметра пор. Значно рідше використовують оксид алюмінію і вкрай рідко інші адсорбенти, широко застосовувані в класичній колонковій і ТШХ. Основною причиною цього є недостатня механічна міцність більшості інших адсорбентів, що не дозволяє упаковувати їх і використовувати у разі підвищених тиску, характерних для ВЕРХ.

Полярні групи, що обумовлюють адсорбцію і знаходяться на поверхні силікагелю та оксиду алюмінію, за властивостями близькі. Тому порядок елюювання сумішей речовин і елюотропний ряд розчинників для них зазвичай однакові. Однак хімічні відмінності між силікагелем і оксидом алюмінію можуть призводити до різної селективності, що вимагає вибору одного або іншого адсорбенту для конкретного завдання. Наприклад, оксид алюмінію забезпечує вищу селективність під час розділення деяких багатоядерних ароматичних вуглеводнів.

Перевага силікагелю пояснюється широким вибором його пористості, поверхні та діаметра пор, а також значно нижчою каталітичною активністю оксиду алюмінію, що часто призводить до викривлення результатів аналізу через розкладання компонентів проби або їх необоротну хемосорбцію.

Адсорбційну хроматографію з використанням силікагелю широко застосовують у класичній рідинній хроматографії. Силікагель є зручним, ефективним та недорогим сорбентом для одноразових розділень. Він також інтенсивно використовується як адсорбент для ТШХ. Адсорбційна активність силікагелю легко відновлюється через операції гідроксилювання, сушіння та активації.

Під час багаторазового використання важко підтримувати стабільність часу утримування та розділення в колонці з силікагелем. Це пов’язано з тим, що алкани, які використовуються як основні розчинники (н-гексан, н-гептан, ізооктан), містять дуже невелику кількість води, і силікагель, не маючи на поверхні адсорбованої води, є ефективним осушувачем. Це змінює активність адсорбенту та хроматографічні характеристики, поки не встановиться рівновага між кількістю води, яка поглинається та віддається. Різні партії розчинників з різною насиченістю водою також впливають на динамічну рівновагу і змінюють хроматографічні характеристики.

Адсорбційну хроматографію на оксиді алюмінію також широко використовують у колонковій хроматографії низького тиску та у методі ТШХ. З часом його використання у ВЕРХ значно зменшилося через те, що розділення, виконувані на оксиді алюмінію, легко переносяться на силікагель або привиті полярні сорбенти на його основі. Хімічна однорідність поверхні силікагелю вища, а каталітична активність оксиду алюмінію значно вища, що часто призводить до розкладання компонентів проби або їх необоротної сорбції. Внаслідок цього в колонку з оксидом алюмінію потрібно вводити вдвічі більше сорбенту, що робить його використання менш економічно вигідним.

Недоліки адсорбційної хроматографії спричинили її поступове витіснення такими іншими методами, як обернено-фазова та нормально-фазова ВЕРХ на сорбентах з привитою фазою. До основних недоліків належать тривалість процесів урівноваження адсорбентів з розчинниками, що містять мікрокількості води, труднощі приготування розчинників з визначеною та відтворюваною вологістю, погана відтворюваність параметрів утримування, розділення та селективності. Неможливість використання градієнтного елюювання також є значним недоліком, оскільки повернення до початкового стану триває надто довго.

Нормально-фазна розподільна хроматографія з привитими фазами. Недоліки адсорбційної хроматографії, а також прагнення дослідників подолати проблеми, пов'язані з розподільною хроматографією з нанесеними полярними фазами, спричинили розроблення сорбентів з привитими полярними фазами. На сьогоднішній день такі сорбенти, принаймні основні типи, мають широке застосування і випускаються більшістю виробників.

Основними привитими фазами для нормально-фазної розподільної хроматографії зараз є нітрильні та амінні групи. Кожна з них прививається за допомогою відповідного силану (диметиламінопропілхлор або диметилціанопропілхлорсилан). Нітрильні та амінні привиті фази можуть використовуватися як для нормально-фазної (з неполярними елюентами), так і для обернено-фазної (з полярними елюентами) розподільної ВЕРХ. Як нормально-фазні сорбенти вони функціонують подібно до силікагелю або оксиду алюмінію, з тими ж елюотропними рядами розчинників і схожими, але не ідентичними, порядками елюювання сполук різних класів. Через різну хімічну природу силанольних, аміно- та нітрильних груп часто виникають відмінності в селективності розділення, що дозволяє обрати той чи інший сорбент залежно від конкретного випадку.

Основні переваги сорбентів з привитими нітрильними або амінними групами порівняно з адсорбентами полягають:

1) у зменшеній ймовірності необоротної адсорбції речовин через відсутність силанольних груп;

2) у зменшеному впливі води на хроматографічне розділення, що усуває необхідність суворого контролю за вмістом води в розчинниках;

3) у швидкому досягненні рівноваги з новим складом розчинника, що дозволяє швидко переходити від одного методу до іншого або успішно використовувати градієнтне елюювання;

4) у можливості використання розчинників у широкому діапазоні полярностей, з легкістю регенеруючи колонки;

5) у тому, що сорбенти з привитими аміногрупами виявляють властивості слабких аніонообмінників.

Під час використання сорбентів з амінофазами слід враховувати деякі особливості. Не рекомендовано використовувати як розчинники і компоненти проб речовини з альдегідними або кетонними групами, оскільки це може призвести до руйнування структури привитої фази з утворенням основ Шиффа або зникнення деяких компонентів проби. Амінофаза легко окиснюється, тому слід уникати впливу сильних окисників на сорбент. Аналогічно у разі використання нітрильної привитої фази потрібно переконатися, що обраний розчинник або компоненти проби не реагують з нітрилами.

Обернено-фазна розподільна хроматографія з привитими фазами. Розподільна хроматографія, де використовуються сорбенти з привитими неполярними (зазвичай довгими алкільними або алкілсильними) групами і полярний розчинник, наприклад водний метанол, називається обернено-фазною ВЕРХ. Хоча цей термін не зовсім вдалий, він став загальноприйнятим і означає, що рухома фаза є полярною, а нерухома — неполярною. Метод виявився настільки успішним, що нині є основним у ВЕРХ. За загальними оцінками, близько 60-70 % всіх розділень, описаних у літературі і використовуваних на практиці, здійснюються саме обернено-фазною ВЕРХ.

Причини такої популярності цього методу містять розробку і швидке впровадження у виробництво сорбентів з привитими алкілсильними групами різної довжини (від С2 до С18 з прямими алкільними ланцюгами, фенільними і дифенільними групами). Розчинники, що використовуються для цього методу (ацетонітрил, метанол, вода, меншою мірою тетрагідрофуран), дозволяють працювати у широкому УФ-діапазоні, оскільки вони прозорі у спектрі 190-210 нм (ТГФ — з 220 нм). Це дає можливість

застосовувати найбільш популярний детектор — УФ-спектрофотометр, як за 190-210 нм, де він детектує неселективно, наближаючись до універсального детектора (аналіз цукрів, жирів, складних ефірів, спиртів, олефінів), так і за будь-якої довжини хвилі, забезпечуючи селективне детектування (наприклад, вітаміну А за 325 нм). Розчинники, що використовуються в обернено-фазних розділеннях, відносно легко розчиняють практично всі важливі групи речовин, які є в організмі людини, біологічних об'єктах, використовуються у вигляді лікарських препаратів, пестицидів, гербіцидів, широко застосовуються в органічній хімії, нафтохімії та біоорганічній хімії.

4.3. ОСОБЛИВОСТІ НОРМАЛЬНО-ФАЗОВОЇ ТА ОБЕРНЕНО-ФАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Нормально-фазова хроматографія — нерухома фаза полярна (гідрофільна), рухома фаза неполярна (гідрофобна).

Нормально-фазова хроматографія — історично перший варіант рідинної хроматографії. Її головною відмінною рисою є більш висока полярність поверхні сорбенту порівняно з елюентом.

У нормально-фазовій хроматографії на силікагелі використовуються рухомі фази, що мають значно меншу полярність, ніж поверхня адсорбенту. Полярність сорбатів, що аналізуються в цьому режимі, є проміжною між полярністю рухомої і нерухомої фаз. Утримування визначається складними взаємодіями між молекулами сорбату, поверхні адсорбенту і рухомої фази. Поверхня адсорбенту, що знаходиться в рівновазі з рухомою фазою, завжди покрита більш-менш міцно зв’язаним адсорбційним шаром.

Якщо рухома фаза містить два або більше компонентів, то склад адсорбційного шару відрізняється від складу рухомої фази. Адсорбція аналізованої молекули може відбуватися з витісненням однієї або декількох молекул адсорбованого шару або без нього. Взаємодія молекул сорбату з адсорбційними шарами і поверхнею твердого адсорбенту, власне, і є предметом теоретичних досліджень у сфері нормально-фазової хроматографії.

Елюентом служать суміші органічних розчинників. Для нормально-фазової хроматографії звичайно застосовують малополярні органічні розчинники. Для отримання відтворюваних результатів у розчинниках, використовуваних для приготування рухомих фаз, суворо контролюється вміст води.

Елюотропний ряд зі збільшенням сили елюєнту будується від найменш полярних до більш полярних речовин:

- ✓ алкани: пентан, гексан, гептан, ізооктан;
- ✓ ароматичні вуглеводні: бензен, толуен, ксилен;
- ✓ галогеналкани: хлороформ, дихлорметан, дихлоретан;
- ✓ ефіри: діетиловий, діізопропіловий, тетрагідрофуран, діоксан, етилацетат, бутилацетат;
- ✓ кетони: ацетон, метилетилкетон, циклопентанон;
- ✓ нітрили й аміди: ацетонітрил, диметилформамід.

Рухома фаза (суміш розчинників) складається з трьох компонентів: основи, полярної добавки і модифікатора. Основою рухомих фаз для нормально-фазової хроматографії, як правило, є аліфатичний вуглеводень, наприклад, гексан, метиленхлорид, хлороформ, які мають слабку елюювальну силу. Полярний компонент рухомої фази, що має елюювальну силу, називається полярною добавкою. Утримування в нормально-фазовій ВЕРХ зменшується у разі збільшення частки полярної добавки в рухомій фазі.

Модифікатор — компонент нормально-фазової системи, дуже полярна речовина, що значно змінює адсорбційні властивості нерухомої фази. Поверхню нерухомої фази модифікують силоксаном з полярними функціональними групами. Тобто полярність адсорбату можна пов'язати з наявністю в його структурі певних функціональних груп. З огляду на специфіку утримування в нормально-фазових умовах, функціональні групи можна розташувати в такий ряд у порядку збільшення їх полярності:

$$\text{-Cl, -Br, <Ar < -OR< -NO}_2 \text{ < -COOR < =C(O) < -COOH}^* <$$
$$\text{-NH}_2{}^* \text{ < -OH < -CN < -NHC(O)R}^* << \text{-SO}_3\text{H}^*$$

Такі сорбенти утримують в основному полярні, а не неполярні сполуки.

Двокомпонентні елюенти без модифікаторів, що містять значні кількості води, в нормально-фазовій хроматографії практично не використовуються.

Обернено-фазова хроматографія: нерухома фаза — неполярна (гідрофобна), рухома фаза — полярна (гідрофільна). Обернено-фазову хроматографію найчастіше використовують для аналізу лікарських засобів.

Сорбентом є силікагель, який може бути модифікований різними хімічними групами, прищепленими до поверхні ($C_{18,}$ C_8, CN, NH_2).

Тобто по відношенню до нормально-фазового режиму все навпаки. Це і дало підставу так назвати цей вид рідинної хроматографії, який є найпоширенішим з-поміж усіх наявних.

Причиною сорбції в обернено-фазовій хроматографії служить потужне тяжіння полярних молекул розчинника одна до одної, що «притискає» розчинені менш полярні молекули до неполярної поверхні. Порівняно з нормально-фазовою хроматографією в обернено-фазовій роль хімічної природи нерухомої фази відносно мала, так як взаємодія сорбат-сорбент обмежується слабкими дисперсійними силами.

В обернено-фазовій рідинній хроматографії застосовують водні рухомі фази з органічними модифікаторами або без: вода, метанол, ацетонітрил, етанол, тетрагідрофуран, ізопропанол, пропанол.

Багатокомпонентні рухомі фази готують змішуванням необхідних об'ємів індивідуальних компонентів.

Елюенти без води використовуються вкрай рідко, але бувають випадки застосування в обернено-фазових хроматографічних системах (особливо на полімерних сорбентах) сумішей метанол — діоксан, або навіть ізопропанол — хлороформ, що пов'язано з необхідністю суттєво змінити селективність розділення або домогтися зменшення утримування таких малополярних речовин, як, наприклад, вуглеводні або жири (тригліцериди жирних кислот).

Обернено-фазовий тип утримування реалізується у системах, що складаються з неполярних нерухомих і полярних рухомих фаз. Рухомими фазами в обернено-фазовій хроматографії є суміші водного буфера і полярних розчинників. Найчастіше як другий «сильний» компонент елюенту в градієнтних хроматографічних методиках використовуються метанол або ацетонітрил, як буфер — розчин фосфату або ацетату (табл. 4.3). Іонна сила розчину підтримується сіллю або певною концентрацією буферного розчину. Елюювальна сила органічного розчинника для обернено-фазової хроматографії збільшується в ряду : метанол < ацетонітрил < етанол < ізопропанол ≈ тетрагідрофуран (ТГФ) < хлористий метилен ≈ хлороформ.

Таблиця 4.3

Базова хроматографічна система для обернено-фазового типу утримування

Рухома фаза	Ацетонітрил-вода
Нерухома фаза	C_{18} модифікований силікагель
Модифікатор	Метанол, ацетонітрил
Адсорбати	Монозаміщені бензоли, ароматичні вуглеводні
Буферні розчини	Фосфатний, ацетатний

Поширення виду обернено-фазової ВЕРХ обумовлено однією важливою особливістю. Рух елюенту крізь шар дрібнодисперсного сорбенту в колонці відбувається під впливом високого тиску, який створюють насоси. Ключову роль тут відіграє значення в'язкості елюенту. Чим більше в'язкість, тим більший тиск має створювати насос, для забезпечення заданої швидкості потоку, що призводить в подальшому до скорочення терміну служби колонок і деталей насоса. Органічні розчинники у разі ОФ хроматографії називають модифікаторами (наприклад, ацетонітрил). Метанол зазвичай служить для розподілу кислотних сполук, а ацетонітрил — для основних сполук. Ці розчинники практично не мають УФ-поглинання і мають низьку в'язкість. Як неполярні групи на поверхню сорбенту прищеплюють н-октадецил (C_{18}), *н*-октил (C_8) або фенільні радикали.

- ✓ Чим менше розчинна у воді речовина, тим більше затримується на сорбенті.
- ✓ Час утримування збільшується зі збільшенням довжини карбонового ланцюга.
- ✓ Сполуки з розгалуженими ланцюгами елююються швидше, ніж звичайні ізомери.
- ✓ Ненасиченість ланцюгових зв'язків призводить до зменшення часу утримування.
- ✓ Нейтральні полярні і заряджені сполуки, як правило, демонструють найменше утримування.

4.4. ХРОМАТОГРАМА

Речовина в колонці розподіляється по певній довжині сорбенту, відповідно до зон, які рухаються вздовж колонки в процесі хроматографічного розділення. Коли зони досліджуваних речовин виходять з колонки, вони надходять у детектор і проходження відповідних речовин реєструється. Крива, яку реєструє детектор від моменту введення проби в колонку до повного елюювання її останнього компонента, називається *хроматограмою.* Інакше кажучи, *хроматограма* — це графічна залежність величини концентрації речовин, що розділяються на виході з колонки, від часу, що пройшов з початку розділення, а концентраційні профілі сорбатів на ній називають хроматографічними піками. Відсутності на виході з колонки досдіжуваних речовин на хроматограмі відповідає пряма лінія, яку називають нульовою або базовою лінією. Площа на хроматограмі, обмежена піком і базовою лінією, є кількісною мірою змісту цього компонента в суміші.

У хроматографічних приладах, як правило, не відбувається безпосереднього вимірювання концентрації речовини у рухомій фазі, а за допомогою спеціального вузла — детектора — вимірюється будь-яка фізична величина, функціонально пов'язана з концентрацією (електропровідність, оптична густина тощо).

Хроматограма зазвичай складається з базової лінії і піків (рис. 4.16).

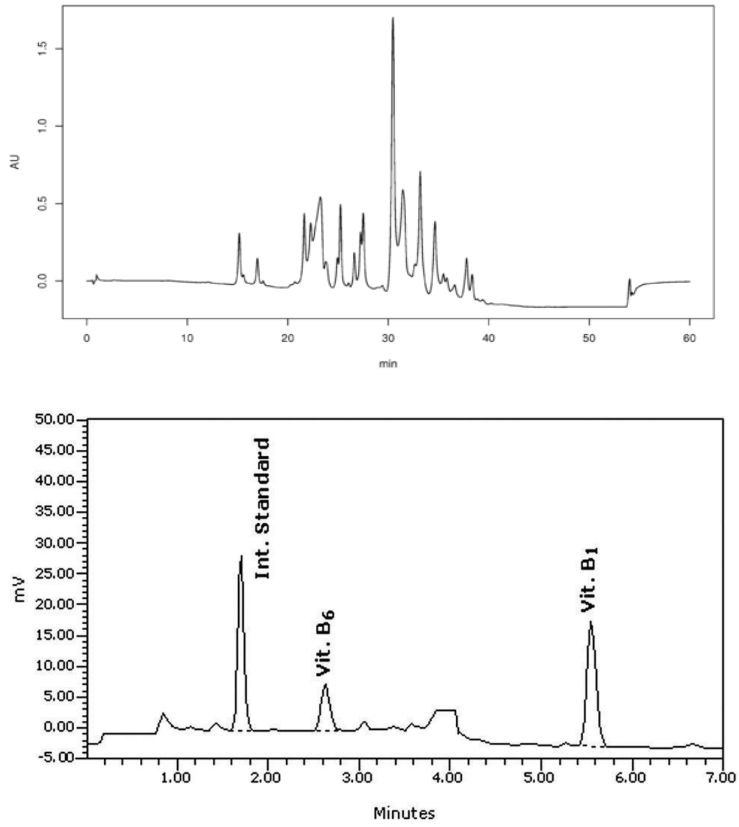


Рис. 4.16. Приклади хроматограм у методі ВЕРХ

Вісь Y (вертикальна) вказує на поглинання аналітів і характеризує аналітичний сигнал, який видає детектор. Вісь X (горизонтальна) являє собою «час утримування» (Retention time) (рис. 4.17).

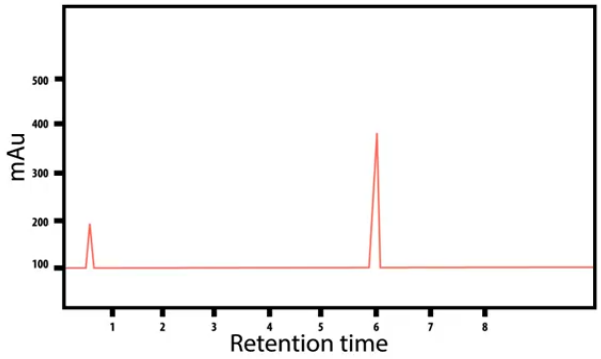


Рис. 4.17. Умовні позначення хроматограми

Час утримування — це час між уведенням аналіту і його виявленням системою. Тобто для сполуки, що зображена на рисунку, час утримання сполуки X становить 6 хвилин. Цей показник використовується для ідентифікації речовини.

Зі збільшенням концентрації піки стають більшими та вищими.

Для кількісної оцінки речовини використовують показник, який має назву «*площа піка*». Ця величина залежить від висоти та ширини піка (рис. 4.18).

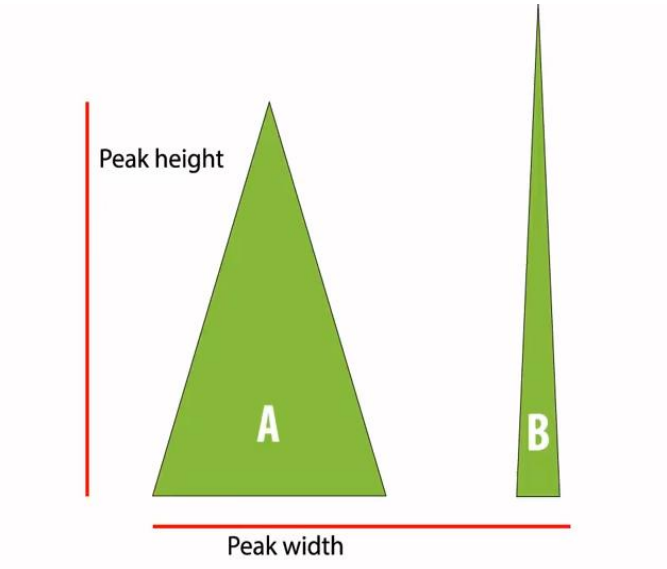


Рис. 4.18. Ширина та висота піку

Пік А має вищу концентрацію порівняно з піком В, оскільки площа піка А більша.

Комп'ютерне програмне забезпечення може автоматично розрахувати площу піка.

4.5. НЕДОЛІКИ МЕТОДУ ВЕРХ

Підводячи підсумок, варто зазначити, що метод ВЕРХ є на сьогодні одним із найбільш поширених, популярних та зручних підходів, зокрема й у сфері фармацевтичного аналізу. Водночас не слід забувати про певні обмеження, пов'язані з його використанням, а саме:

✓ *Ретельна підготовка досліджуваних зразків та рухомих фаз.* ВЕРХ вимагає ретельної підготовки зразка та вибору системи розчинників, що може забрати багато часу та стати причиною похибок в аналізі. Розчинники для ВЕРХ мають проходити

спеціальне очищення або бути промарковані як придатні до безпосереднього використання на хроматографах.

✓ *Висока вартість приладу та його складових частин.* Придбання, налаштування та обслуговування хроматографа передбачає високі витрати. Колонки з часом засмічуються і мають бути вчасно замінені на нові.

✓ *Необхідність навчання та підготовки кваліфікованих фахівців для роботи з приладом.* Проведення аналізу методом ВЕРХ потребує спеціальної підготовки та знань для одержання коректних результатів. Спеціалісту-початківцю потрібен певний час для опанування методик.

Такі фактори, як висока вартість приладу та необхідність залучення кваліфікованих фахівців, є відносними недоліками, але про них варто пам'ятати і враховувати відповідно до потреб та можливостей конкретної лабораторії.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Які компоненти хроматографічного процесу в методі рідинної хроматографії: нерухома та рухома фази, аналізована проба (суміш)?
2. Охарактеризуйте різновиди рідинної хроматографії, в чому їх принципова відмінність: адсорбційна хроматографія, розподільна хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, іонообмінна хроматографія, хіральна хроматографія.
3. Які типи фізико-хімічних взаємодій виникають у методі рідинної хроматографії?
4. Яка будова та принцип роботи рідинного хроматографа?
5. Зазначте, які існують вимоги до аналітичних розчинників, що використовуються для виготовлення рухомої фази (елюенту). Елюювальна сила розчинника, класифікація розчинників за полярністю.
6. Наведіть основні етапи проведення дослідження в аналізі речовин методом рідинної хроматографії.
7. Сорбенти для рідинної хроматографії. Полярні та неполярні сорбенти. Модифікація сорбентів.
8. Які види хроматографічних колонок використовуються у методі? Яке їх призначення?
9. Які види насосів використовуються для подачі рухомої фази?

10. Що таке інжектор? Які види інжекторів існують?

11. Зазначте, які види детекторів використовують у рідинній хроматографії. Які їх функції? Чутливість та селективність детекторів. Пряме та непряме детектування.

12. Комбінація двох самостійних методів — хроматографії та мас-спектрометрії. Які вимоги до мас-спектрометра? Зазначте переваги методу та галузь застосування.

13. Нормально-фазова, обернено-фазова: відмінності, аналітичні можливості.

14. Адсорбційна та розподільна рідинна хроматографія. Переваги та обмеження.

15. Що таке хроматограма? Хроматографічний пік, час (об'єм) утримування, «мертвий» час (об'єм).

16. Що таке площа піка? Для чого її використовують?

17. Фактор утримування. Константа розподілу. Коефіцієнт симетрії. Ступінь розділення. Відносне утримування. Число теоретичних тарілок.

Тема 5. МЕТОДИ ІОННОЇ, ІОННООБМІННОЇ ТА ЕКСКЛЮЗІЙНОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

ГЛОСАРІЙ

Іонний обмін — це процес, за якого іони одного виду замінюються на іони іншого виду у твердій фазі, зазвичай на поверхні іонообмінних смол.

Іони — це атоми або молекули, що мають електричний заряд через втрату або приєднання одного або більше електронів.

Катіони — це позитивно заряджені іони.

Аніони — це негативно заряджені іони.

Протиіони — це іони, які перебувають у розчині й здатні заміщувати інші іони на іонообмінних матеріалах.

Іонообмінна смола або іонообмінний полімер — це тверді матеріали (полімери), що містять рухливі іони, які можуть обмінюватись з іонами в розчині.

Катіоніти (катіонообмінники) — це іонообмінні смоли, які обмінюють катіони (позитивно заряджені йони) з розчину.

Аніоніти (аніонообмінники) — це іонообмінні смоли, які обмінюють аніони (негативно заряджені іони) з розчину.

Амфоліти (іоніти, іонообмінники) — це іонообмінні смоли, які можуть обмінювати як катіони, так і аніони.

Елюент — це розчинник або суміш розчинників, що використовується для вимивання (елюції) іонів з іонообмінної смоли.

Елюат — це розчин, отриманий після елюції, який містить вимиті іони з іонообмінної смоли.

Ефлюент — це вихідний потік рідини після проходження через систему іонного обміну або хроматографічну колонку.

Елюція, елюювання — це процес вимивання іонів з іонообмінної смоли або хроматографічної колонки за допомогою елюенту.

Супресори (пристрої пригнічення) — це пристрої або реагенти, що використовуються для зменшення фонових сигналів або пригнічення певних реакцій в іонообмінній хроматографії для поліпшення точності вимірювань.

Іонна хроматографія — інструментальний метод, форма високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), який використовується в процедурах тестування лікарських препаратів на різних етапах життєвого циклу, таких, як фармакотехнологічні та біотехнологічні випробування, установлення стандартів ідентичності, вмісту, якості та чистоти продуктів, для вимірювання неорганічних аніонів і катіонів, органічних кислот, вуглеводів, цукрових спиртів, аміноглікозидів, амінокислот, білків, глікопротеїнів та потенційно інших аналітів.

Перші дані про застосування іонообмінної хроматографії датуються 1850 роком. З уведенням у 1970-х роках деяких модифікацій цей метод розвинувся до ***іонної хроматографії***. З 1975 року іонна хроматографія отримала широке застосування в багатьох галузях промисловості. Іонна хроматографія є дуже потужним методом розділення та очищення, який використовується не тільки для препаративної, а й для аналітичної хроматографії.

Іонна хроматографія дозволяє прискорити визначення та кількісну оцінку вмісту неорганічних аніонів і катіонів у фармацевтичних композиціях. Більшість фармацевтичних препаратів виробляються синтетичним шляхом, а потім формуються у вигляді таких лікарських форм, як таблетки або розчини для ін'єкцій. Багато з цих речовин виробляються в особливих формах солі для підвищення розчинності, стабільності та біодоступності. Найпоширенішими фармацевтичними *протиіонами*, які використовуються для розробки основних ліків, є хлорид і сульфат, натрій, калій, кальцій та магній. Приблизно половина всіх АФІ виготовляється і вводиться у вигляді солей.

Широкий вибір неорганічних і органічних іонів можна використовувати як протиіони лікарської речовини, причому різні іони використовуються для зміни таких біологічних і фізико-хімічних властивостей, як розчинність, стабільність і швидкість розчинення. Скринінг і аналіз широкого спектра протиіонів і АФІ має вирішальне значення для контролю якості фармацевтичних солей для підтвердження ідентичності форми солі та балансу маси АФІ. Відповідно до природи аналіту іонна хроматографія застосовувалась до всіх аспектів виробництва та утилізації фармацевтичних продуктів, включаючи характеристику АФІ, допоміжних речовин, продуктів розпаду, домішок і технологічних потоків.

Техніка особливо цінна для іонних або іонізованих (у рухомій фазі) аналітів, які мають невелике або взагалі не мають природного поглинання УФ-променів. Наприклад, хімічні антибіотики зазвичай аналізують за допомогою ВЕРХ з УФ-детектуванням, але якщо хромофор відсутній в АФІ або домішках, іонна хроматографія з виявленням

із пригніченою провідністю вважається найкращою альтернативою для вибіркового визначення. Можливість поєднати іонообмінне розділення з численними стратегіями виявлення, наприклад, аналіз гліканів (цукрів/вуглеводів) з імпульсним амперометричним виявленням (PAD), розширює застосування іонної хроматографії до випадків, коли стратегії виявлення аналіту можуть забезпечити необхідний ступінь чутливості або специфічності.

На важливість цього хроматографічного методу для аналізу терапевтичних продуктів та їх інгредієнтів вказує той факт, що вже у 2010 році USP32-NF27 містила 6 загальних глав (<1065>, <345>, <1045>, <1052>, <1055> і <1086 >) та близько 110 монографій, у яких використовується одна або кілька процедур тестування на основі іонної хроматографії (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Система іонної хроматографії, яка використовується для виявлення та вимірювання таких катіонів, як натрій, амоній і калій у відхаркувальних препаратах від кашлю

Основними корисними перевагами іонної хроматографії є надійність, дуже хороша точність, висока селективність, висока швидкість, висока ефективність розділення та низька вартість витратних матеріалів.

Іонообмінна хроматографія (*англ. ion-exchangechromatography, IEC*) — метод рідинної хроматографії, розроблений для розділення різним чином заряджених чи поляризованих сполук між рухомою та нерухомою фазами. Іонообмінне розділення суміші іонів базується на різній здатності досліджуваних *іонів* до іонного обміну з нерухомою фазою (*іонітом*) та визначається різницею їх зарядів, а також іонною силою розчину. Залежно від спорідненості до нерухомої фази досліджувані іони рухаються з різною

швидкістю: чим вища спорідненість, тим більша взаємодія частинок і менша швидкість. Поділ також виконується на основі відмінностей у гідрофобному характері іонних форм. Іонообмінна хроматографія зазвичай виконується за температури навколишнього середовища. Як і в інших формах ВЕРХ, розділення іонообмінна хроматографія базується на змінних коефіцієнтах ємності та зазвичай відповідає рівнянню Нокса. Іоннообмінна хроматографія є технікою, яка доповнює більш широко використовувані ВЕРХ з оберненою та нормальною фазами, а також методи атомно-абсорбційної та іонозв'язаної плазми (спектрохімія плазми) у фармацевтичному аналізі.

5.1. ПРИНЦИП ІОНООБМІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Іонообмінна хроматографія використовує заряд-зарядову взаємодію між аналітами, присутніми в зразку, і зарядом функціональних груп, іммобілізованих на нерухомій фазі (смолі). Рухома фаза зазвичай є водним буфером, в якому розчиняються вихідні речовини, а нерухома фаза — органічною матрицею (іонообмінний полімер) з хімічно закріпленими функціональними іонізованими групами, котрі містять протилежно заряджені замінні іони (рухомі іони). Зв'язані аналіти можна елюювати, збільшуючи іонну силу або змінюючи pH елюювального буфера.

Зазвичай у катіонному обміні використовуються буферні розчини: цитратний, HEPES (HEPES або N-(2-гідроксіетил)піперазин-N'-(2-етансульфонової кислоти), MES (2-(*N*-морфоліно)етансульфонової кислоти) і фосфатний тощо. В аніонообмінній хроматографії зазвичай використовуються N-метил-піперазиновий, біс-трис (біс(2-гідроксіетил)аміно-трис(гідроксиметил)метан), трис((гідроксиметил) амінометану), фосфатний і піперидиновий буферні розчини. Вибір буферу є важливою складовою для досягнення хорошого розділення в іонообмінній хроматографії.

Залежно від типу іонообміного полімеру іоннообмінну хроматографію можна далі розділити на катіонообмінну та аніонообмінну хроматографію.

У катіонообмінній хроматографії позитивно заряджені аналіти зв'язуються з негативно зарядженою смолою (*катіонообмінником*). Катіонообмінна хроматографія використовується, коли досліджувана молекула має позитивний заряд.

В аніонообмінній хроматографії негативно заряджені аналіти зв'язуються з позитивно зарядженою смолою (*аніонообмінником*). Аніонообмінна хроматографія зазвичай використовується, коли досліджувана молекула має негативний заряд.

Розділення відбувається на основі зв'язування розділюваних іонів аналіту з протиіонами, що знаходяться на нерухомій фазі (рис. 5.2).

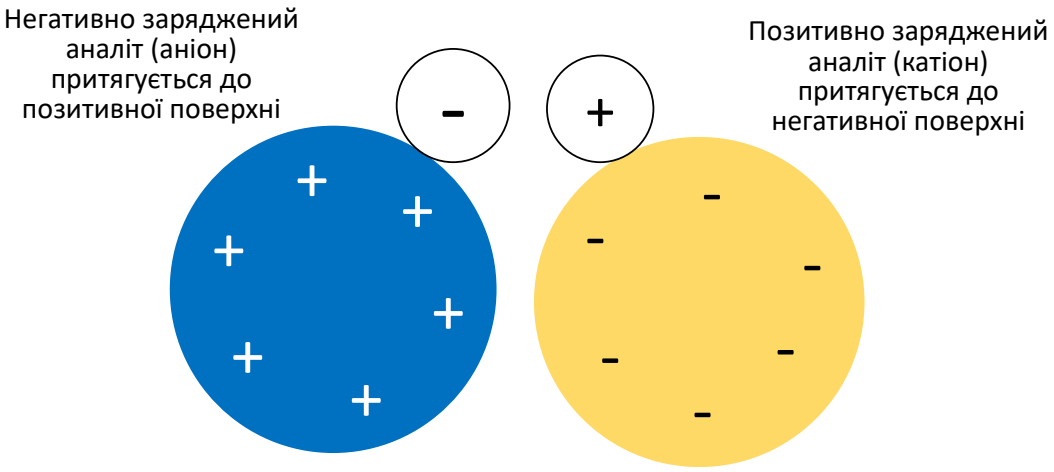


Рис. 5.2. Принцип дії іонообмінної хроматографії

Для розділення суміші катіонів використовують відповідно катіоніти, а для суміші аніонів — аніоніти.

Іонообмінні смоли: катіоніти, аніоніти, амфоліти. Нерухома фаза в іонообмінній хроматографії — це речовина (твердий сорбент або рідина), здатна обмінювати свої функціональні групи на іони, що перебувають у рухомій фазі.

З-поміж твердих адсорбентів використовуються такі матеріали:

- ✓ природні неорганічні (глина, пісок);
- ✓ природні органічні (целюлоза);
- ✓ синтетичні органічні смоли — іоніти.

Саме останні знайшли найширше застосування на практиці, тому ми детальніше розглянемо їх різновиди та принцип дії.

Усі іоніти — нерозчинні високомолекулярні полімери, стійкі до дії кислот та основ, що не руйнуються у присутності багатьох окисників та відновників, у водних розчинах набухають.

Їх каркас (матриця) складається з високополімерної просторової сітки вуглеводневих ланцюжків (R), на якій закріплені функціональні групи (A), що несуть позитивний або негативний заряд.

Під час контакту з водним розчином іони, що входять до складу іоніту, можуть *стехіометрично* заміщуватися на присутні в розчині іони. Цей зворотний процес називається реакцією іонного обміну та описується рівнянням:

$$R\text{—A} + \text{B} \leftrightarrow R\text{—B} + \text{A},$$

де A та B — іони, що мають однойменні заряди; R — органічна полімерна матриця.

Залежно від знака заряду функціональних груп на поверхні іонообмінні смоли поділяються на катіоніти, аніоніти та іоніти змішаного типу (амфоліти).

Катіоніти містять кислотні функціональні групи (-SO_3H, -COOH, -PO_3H та ін). Сильнокислими є катіоніти, що містять сульфогрупу, а слабокислими ті, що містять карбоксильну групу. Всі катіоніти здатні заміщати іони водню на інші катіони:

$$[R]H^+ + Me^+ \leftrightarrow [R]Me + H^+$$

Якщо рівновага повністю зміщена вліво, кажуть, що катіоніт перебуває у H^+-формі, а якщо вправо — то в Me^+-формі.

! Процес іонного обміну проходить **стехіометрично**. Якщо в катіоніт у H^+-формі ввести розчин, що містить іони Ca^{2+}, у системі встановиться рівновага:

$$R—(SO_3H)_2 + Ca^{2+} = (R—SO_3)_2Ca + 2H^+$$

Тобто в розчині з'являться іони водню, а еквівалентну кількість іонів кальцію поглине катіоніт.

Аніонообмінні смоли (аніоніти) є багатоатомними основами з функціональними групами, здатними до обміну на аніони. Функціональними групами каркаса аніонітів є четвертинні -NR^{3+}, третинні -NR^{2H+} або первинні -NH^{3+} амонієві, піридинові або інші основи, а рухомими протиіонами виступають аніони, що можна зобразити схематично таким чином:

$$[R]OH + A^- \leftrightarrow [R]A + OH^-$$

Біфункціональні іоніти(амфоліти, амфотерні іоніти) несуть на своїй поверхні обидва типи функціональних груп — основні та кислотні, і здатні до обміну на аніони та катіони.

Важливою характеристикою іонообмінника є його *обмінна ємність (ОЄ),* що визначається числом функціональних груп його каркаса та ступенем їх іонізації за певного значення pH розчину.

Обмінну ємність іоніту виражають кількістю молей еквівалента функціональних груп на одиницю маси або об'єму сухого іоніту (моль/г).

Іонообмінні смоли. *Нерухома тверда фаза або* сорбент для іонного обміну являє собою тверду нерозчинну речовину, що містить у своїй структурі іоногені групи, здатні до реакції іонного обміну. Катіонообмінні смоли складаються з аніонного полімеру з протикатіонами, зазвичай Na^+ (натрію). Відповідно, аніонообмінні смоли зазвичай постачаються у формі хлориду Cl^-, який є високорухливим протианіоном.

До протиіонів в іонообмінних полімерах належать *протони* H^+, *гідроксильні групи* OH^-, однозаряджені іони металів, двозаряджені моноатомні іони (Ca^{2+}, Mg^{2+}), поліатомні неорганічні іони (SO_4^{2-}, PO_4^{3-}), а також органічні основи (NR_2H^+) і кислоти ($RCOO^-$).

Як відомо, N-кінцеві аміно- та С-кінцеві карбоксильні групи, а також бічні ланцюги амінокислотних залишків білків здатні до іонізації, тобто білки є зарядженими молекулами. Ця властивість білків використовується в іонообмінній хроматографії для розділення різних білків (рис. 5.3).



А **Б**

Рис. 5.3. Зовнішній вигляд колонок (**А**) та сорбентів (**Б**)
в іоннообмінній хроматографії

Залежно від типів розділюваних іонів застосовують різні смоли (табл. 5.1).

Іонообмінні смоли можуть бути сильними або слабкими. Сильна іонообмінна смола заряджається в широкому діапазоні pH, тоді як слабка іонообмінна смола іонізується у вузькому діапазоні pH. Заряджені функціональні групи можуть бути зшиті до полістиролу, сефадексу, сефарози, целюлози або поліакрилових кульок.

Таблиця 5.1

Смоли в іоннообмінній хроматографії

Тип	Функціональні групи	pH	Приклади
Сильнокислотні катіонообмінники	Сульфонові кислоти	4–13	$-SO_3^-$, $-CH_2CH_2SO_3^-$
Слабкокислотні аніонообмінники	Карбонові кислоти	6–10	$-COO^-$, $-CH_2COO^-$
Сильнолужні аніонообмінники	Четвертинні аміни	2–12	$-CH_2N(CH_3)_3^+$, $-CH_2CH_2N(CH_2CH_3)_3^+$
Слабколужні аніонообмінники	Аміни	2–9	$-NH_3^+$, $-CH_2CH_2NH(CH_2CH_3)_2^+$

Основні властивості іонітів: нерозчинність у воді та органічних розчинниках; механічна міцність; хімічна стійкість до кислот, лугів, окисно-відновних речовин; висока іонообмінна ємність; здатність іонообмінників легко *регенеруватись*; кінетичні властивості — достатня *швидкість іонного обміну*. Якості іоніту визначаються *сорбційною ємністю, хімічною стійкістю* та *фізичними властивостями*. До показників фізичних властивостей іонообмінних сорбентів відносять вологовміст у сухому стані, стійкість до розчинників, здатність до набухання, теплостійкість, механічну міцність.

Основною характеристикою іонітів є їх *обмінна ємність*. Повна обмінна ємність іоніту визначається кількістю фіксованих іонів, залежить від деяких факторів, зокрема pH розчину. Ця характеристика має важливе значення, оскільки у разі перевантаження колонки іони зразка, який аналізується, будуть проходити через колонку без зв'язування.

5.2. ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ РОЗДІЛЕННЯ

В іонообмінній хроматографії розділення компонентів суміші досягається завдяки оборотній взаємодії іонізувальних речовин з іонними групами сорбенту. Для збереження електронейтральності сорбенту використовуються здатні до іонного обміну протиіони, що розташовуються в безпосередній близькості до поверхні. Іон уведеного зразка, взаємодіючи з фіксованим зарядом сорбенту, обмінюється з протиіоном.

Речовини з різною спорідненістю до фіксованого заряду сорбенту розділяються на аніонітах або катіонітах. Аніоніти мають на поверхні позитивно заряджені групи і сорбують аніони з рухомої фази. Катіоніти, відповідно, містять групи з негативним зарядом, що взаємодіють з катіонами.

Як рухому фазу використовують водні розчини солей, кислот, основ і розчинники типу рідкого аміаку, тобто системи розчинників з високим значенням діелектричної проникності і великою тенденцією до іонізації сполук. Зазвичай використовують буферні розчини, що дозволяють регулювати значення pH.

Під час хроматографічного розділення іони аналізованої речовини конкурують з іонами, що містяться в елюенті, за взаємодію з протилежно зарядженими групами сорбенту. Це означає, що іонообмінну хроматографію можна використовувати для розділення будь-яких сполук, які можуть бути іонізовані. Можна провести аналіз навіть нейтральних молекул цукрів у вигляді їх комплексів з борат-іоном:

$$\text{Цукор} + BO_3^{2-} \leftrightarrow \text{Цукор}\cdot БO_3$$

Механізм іонного обміну можна уявити за допомогою таких рівнянь:

Для аніонного обміну: $X^- + R^+Y^- \leftrightarrow Y^- + R^+X^-$.

Для катіонного обміну: $X^+ + R^-Y^+ \leftrightarrow Y^+ + R^-X^+$.

У першому випадку іон зразка X^- конкурує з іоном рухомої фази Y^- за іонні центри R^+ іонообмінника, а в другому — катіони зразка X^+ конкурують з іонами рухомої фази Y^+ за іонні центри R^-. Іони зразка, які слабко взаємодіють з іонообмінником, будуть слабко утримуватися в колонці і першими вимиватимуться з неї, а навпаки, сильніше утримувані іони будуть елюювати з колонки останніми. Зазвичай виникають вторинні взаємодії неіонної природи завдяки адсорбції або водневим зв'язкам зразка з неіонною частиною матриці, або через обмежену розчинність зразка в рухомій фазі.

5.3. ОБЛАДНАННЯ ТА УСТАТКУВАННЯ МЕТОДУ ІОННООБМІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ. КОМПОНЕНТИ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Прилади іоннообмінної хроматографії дуже схожі на звичайні інструменти для ВЕРХ. Типові компоненти містять автоматичний пробовідбірник, насос високого тиску, інжекційний клапан з петлею зразка відповідного розміру (зазвичай від 10 до 250 мкл), захисну колонку, аналітичну колонку, додатковий супресор, проточний детектор і реєстратор або комп'ютеризовані системи даних (рис. 5.4).

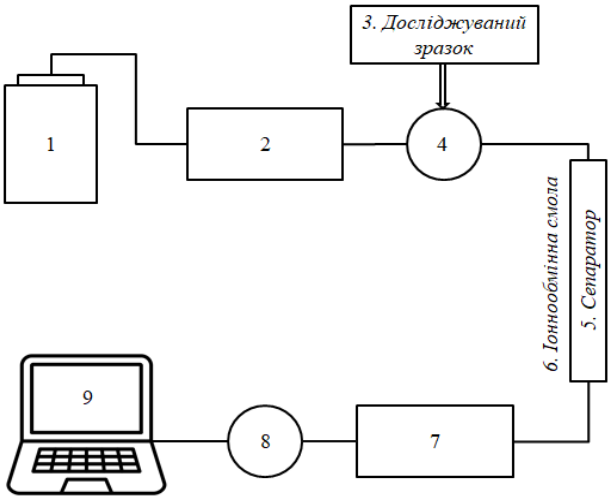


Рис. 5.4. Схема типового приладдя для іонообмінної хроматографії: 1 — рухома фаза; 2 — насос; 3 — досліджуваний зразок; 4 — інжектор; 5 — сепаратор; 6 — іоннообмінна смола; 7 — супресор; 8 — детектор; 9 — пристрій для оброблення даних

Насос ІХ вважається одним із найважливіших компонентів у системі, який має забезпечити безперервний постійний потік елюенту через інжектор ІХ, колонку та детектор.

Інжектор. Уведення проби можна здійснити різними способами. Найпростіший спосіб — використання інжекторного клапана. Рідкі зразки можна вводити безпосередньо, а тверді зразки потрібно лише розчинити у відповідному розчиннику. Інжектори повинні забезпечувати можливість впорскування рідкого зразка в діапазоні від 0,1 до 100 мл об'єму з високою відтворюваністю та під високим тиском (до 4000 psi).

Колонки. Залежно від кінцевого використання та сфери застосування матеріал колонки може бути неіржавна сталь, титан, скло або інертний пластик, наприклад PEEK. Колонка може варіюватися в діаметрі від приблизно 2 мм до 5 см і в довжині від 3 до 50 см залежно від того, чи буде вона використовуватися для звичайних аналітичних цілей, мікроаналізу, високошвидкісного аналізу або підготовчої роботи (рис. 5.5).



Рис. 5.5. Аналітичні колонки для іонообмінної хроматографії

Захисна колонка розміщується попереду аналітичної (розділової) колонки. Що служить захисним фактором, який подовжує термін служби та корисність аналітичної колонки. Захисна колонка, призначена для фільтрації або видалення часток, які засмічують аналітичну колонку.

Супресор. Уведення у систему іонообмінної хроматографії приладу хімічного пригнічення розглядають як модифікований метод детекції та позначають як «пригнічену іонообмінну хроматографію»* (suppressed IC). У пригніченій ІХ фонова провідність іонної рухомої фази значно зменшується, коли вона протікає через супресор.

Розміщення між колонкою та детектором другої пригнічуваної колонки (супресора) дозволяє селективно видалити з розчину іони елюенту, залишаючи розділювані іони. Наприклад, під час використання як елюенту хлоридної кислоти в розчині будуть іони H^+ та Cl^-, які видаляються смолою із закріпленими гідроксильними групами.

Супресор (або пригнічувальна колонка) зменшує фонову провідність хімічних речовин, які використовуються для елюювання зразків з іонообмінної колонки, що покращує вимірювання провідності досліджуваних іонів.

Важливою перевагою двоколонкової іонної хроматографії є низькі межі виявлення іонів і лінійність градуювального графіка в широкому інтервалі їх концентрацій. Це дає змогу використовувати метод стандартів у кількісному аналізі без обов'язкової побудови градуювального графіка.

Примітка. *Для фармацевтичного аналізу використовують пригнічену кондуктометричну детекцію для виявлення слідів іонів у водах високої чистоти. Зазвичай використовувані рухомі фази для розділення аніонів за допомогою пригніченої ІХ містять гідроксид-іони або суміш бікарбонатних і карбонатних іонів. Фармацевтичні аналізи можна виконувати в режимі без пригнічення.*

Детектори. Найпоширенішим детектором іонів на виході з колонки є *кондуктометричний*, що реєструє *електропровідність* розчину під час проходження повз нього іонів.

Однак за високої іонної сили елюенту детектор втрачає свою чутливість.

Також у іонообмінній хроматографії широко використовують режим імпульсного амперометричного (PAD) виявлення, що зазвичай використовується для виявлення електроактивних речовин, наприклад, таких органічних сполук, як вуглеводи, цукрові спирти, амінокислоти та органічні види сірки.

Пряме УФ-виявлення або дериватизація після колонки з подальшим виявленням УФ/ВІД використовується для неорганічних і органічних іонів, які мають УФ-хромофор. До них належать органічні кислоти, бромід, йодид, нітрат, нітрит, тіосульфат і комплекси ціанометалів.

Фотометричне виявлення передбачає хелатування іонів металів у водах колонки та подальше визначення за видимої довжини хвилі. Наприклад, виявлення іона металу, який хелатується 4-(2-піридилазо)-резорцином, визначається за довжини хвилі 510–530 нм.

Система даних. У звичайному аналізі, де автоматизація не потрібна, попередньо запрограмований обчислювальний інтегратор може бути достатнім. Для більш високих рівнів контролю потрібен такий більш інтелектуальний пристрій, як система даних або мінікомп'ютер.

5.4. УМОВИ ТА МЕТОДИ АНАЛІЗУ В ІОНООБМІННІЙ ХРОМАТОГРАФІЇ

Іонний обмін може здійснюватися як у статичних, так і у динамічних умовах. Відповідно до цього іонообмінна хроматографія поділяється на:

- ✓ адсорбційну іонообмінну хроматографію (статична);
- ✓ елюентну іонообмінну хроматографію (динамічна).

Найбільш широко для поділу та концентрування речовин використовується динамічний варіант рідинної колонкової хроматографії. Розділення компонентів проводять на хроматографічних колонках.

Колонка — це металева, скляна або полімерна трубка довжиною 10–30 см та діаметром 1 см і більше, заповнена твердим адсорбентом (адсорбційна хроматографія) або рідиною, нанесеною на твердий носій (рідинно-рідинна хроматографія). Через таку колонку пропускають розчин суміші іонів, які поглинаються сорбентом. Поглинені іони потім можуть бути окремо і послідовно вимиті з колонки відповідними реагентами.

Порівняно зі статичним динамічний метод відрізняється значно більш високою ефективністю за рахунок багаторазового повторення процесів сорбції і десорбції іонів, що розділяються, в процесі пропускання розчину через колонку. Досягненно рівноважного стану сприяють малі розміри зерен іоніту, низька швидкість перебігу розчину, підвищена температура.

Поділ компонентів сумішей на хроматографічних колонках можна проводити трьома способами: фронтальним, витісненням, елюентним аналізом.

Фронтальний аналіз передбачає безперервне введення в колонку суміші, що розділяється. При цьому першим з колонки виходить компонент, що має найменшу спорідненість до нерухомої фази і тому слабше на ньому утримується.

Під час проведення аналізу *витісненням* спочатку в колонку вводять суміш, що розділяється, а потім подають розчин речовини, що володіє найбільшою спорідненістю до нерухомої фазі порівняно з компонентами суміші. У міру просування суміші через колонку компоненти витісняють один одного з нерухомої фази відповідно до їх спорідненості і по черзі виходять з колонки.

Найчастіше застосовують *елюентний аналіз*, тому що він не має недоліків попередніх різновидів, які не завжди дозволяють отримати повний поділ компонентів суміші. У цьому методі порцію розчину зразка рухомої рідини вводять у верхню частину

колонки, а потім пропускають через колонку чисту рухому фазу. Розділення цим способом засноване на тому, що окремі компоненти зразка мають різну спорідненість з рухомою та нерухомою фазами і в міру просування розчинника по колонці відбувається розподіл та перерозподіл компонентів між фазами.

5.5. ПРОЦЕДУРА ХРОМАТОГРАФУВАННЯ ТА ЇЇ РЕЗУЛЬТАТ

Іонний обмін є фізико-хімічним процесом, тому на його перебіг впливають як хімічні, так і фізичні чинники, що треба враховувати під час хроматографування:

✓ До хімічних факторів належать: pH розчину, природа іонів, що розділяються, їх концентрація в розчині, схильність до гідратації, хімічний склад іоніту і т.д. Наприклад, зі збільшенням pH катіоніт збільшує обмінну ємність, а аніоніт — зменшує.

✓ До фізичних факторів належать: швидкість протікання розчину через колонку, розмір зерен іоніту, висота колонки, температура розчину тощо.

Примітка! Розчинник, що проходить через колонку, називається елюентом, процес вимивання з колонки адсорбованої речовини — елююванням. Розчин, що виходить із колонки — елюат.

Процедура хроматографування відбувається таким чином:

1. Перед аналізом іонообмінну колонку регенерують, тобто переводять іоніт, що її заповнює, у певну іонообмінну форму. «Зарядження» катіоніту H^+ іонами, а аніоніту OH^- іонами проводиться шляхом пропускання через колонку певної кількості кислоти або основи.

2. Потім іоніт промивають водою від надлишку кислоти або основи і пропускають через нього з певною швидкістю аналізований розчин.

3. Колонку промивають водою або іншим елюентом, збираючи елюат повністю або фракціями. Іони, поглинені іонітом, можуть бути елюйовані відповідним розчинником. Катіони, як правило, елююють кислотою, а аніони — лугом.

4. У результаті компоненти переміщаються колонкою з різною швидкістю і поділяються на смуги, які просуваються до виходу з колонки.

5. Окремі порції елюату збирають у колби, проводять кількісне визначення розділених компонентів і будують хроматограму — графічне зображення розподілу концентрації речовин, що розділяються в послідовних порціях елюату.

Основні кроки хроматографування

I. Попередня обробка зразка. Концентрація солі має бути менше 0,1 М. Розведіть досліджуваний зразок 1:1 буфером відповідного pH, щоб забезпечити іонізацію функціональних груп аналіта.

Наприклад, *основні сполуки*: розбавити 10–25 мМ буфером (наприклад, фосфатом калію або ацетатом амонію), pH 3–6; *кислі сполуки*: розвести 10–50 мМ буфером (наприклад, ацетатним буфером), pH 7–9.

II. Завантаження зразка.

III. Промивання. Необхідно підтримувати адекватний контроль pH та іонної сили, щоб запобігти передчасному вимиванню досліджуваних аналітів.

IV. Елюювання. Елюють з постійною та зниженою швидкістю потоку ~1–2 краплі/секунду, щоб забезпечити оптимальну десорбцію сполуки. Найпоширенішою стратегією є зміна pH.

Наприклад, *основні сполуки: елюють* 2–5 % гідроксидом амонію в 50–100 % метанолі; *кислі сполуки: елюють* 2–5 % оцтовою кислотою в 50–100 % метанолі.

V. Постоброблення елюату. Застосування відповідної стратегій елюції (пряме визначення аналіту або після відповідної дериватизації). Необхідно протестувати та оптимізувати різні стратегії елюювання, щоб звести до мінімуму подальше оброблення елюату.

VI. Детектування. Аналіз аналітів з використанням відповідного детектора. Отримання хроматограми.

VII. Оформлення результатів за даними хроматограми.

5.6. НАЙВАЖЛИВІШІ ГАЛУЗІ ЗАСТОСУВАННЯ ІОНООБМІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Іонообмінну хроматографію застосовують з аналітичною метою для поділу компонентів аналізованої суміші, відділення катіонів та аніонів, поділу катіонів, поділу аніонів тощо; одержання аналітичних концентратів. У разі пропуску великих об'ємів розведених розчинів крізь шар іоніту та подальшого вилучення поглиненої речовини малим об'ємом розчинника можливе підвищення концентрації речовини у 200–500 разів; ідентифікації окремих іонів.

У фармацевтичній промисловості для очищення речовин та їх сумішей, наприклад, для знесолювання води; одержання антибіотиків; очищення білків та ферментів, нуклеїнових кислот; кількісного та якісного визначення амінокислот.

Застосування іонообмінної хроматографії для очищення та розділення білків. Можливість розділення білків в іонообмінній колонці визначається головним чином різницею в їх заряді.

Вибір іонообмінного сорбенту (іоніту) для очищення білків значною мірою залежить від ізоелектричної точки білка — pHi.

1. За значень pH, що перевищують pHi білка, його молекули набувають у цілому від'ємного заряду, тому здатні адсорбуватись аніонним обмінником.

2. За pH, що нижче за pHi білка, макромолекули будуть адсорбуватись катіонним обмінником:

1) наприклад, якщо pHi = 4, то здебільшого доцільно підбирати сорбент, який здатний зв'язувати білок за pH > 4. Оскільки за pH > 4 такий білок заряджений від'ємно, то сорбент має бути аніонообмінником (наприклад, з діетиламіноетильною функціональною групою (ДЕАЕ));

2) якщо білок, який ми очищуємо, має pHi = 10, то він буде заряджений позитивно в умовах, що придатні для іонообмінної хроматографії, тобто за pH близько 7. Тобто для білка такого типу ми маємо обрати катіонообмінний сорбент (наприклад, з карбоксильною функціональною групою (КМ), яка за нейтральних pH заряджена від'ємно).

Елюювання адсорбованого білка. 2 способи для білків:

1) зміна pH буфера до величини, за якої зв'язування білка з адсорбентом послаблюється (для аніонообмінників використовують більш низькі значення pH, а для катіонообмінників — більш високі);

2) підвищення іонної сили, що викликає ослаблення електростатичної взаємодії між білком та адсорбентом.

Для першого способу недолік полягає у тому, що білки теж мають буферні властивості, а іноді й адсорбент. Більш поширений спосіб елюювання — сольові градієнти (ступінчасті і лінійні). Як правило, використовують хлориди калію або натрію.

Для адсорбційної хроматографії характерне проведення вимивання речовин з колонки чистим розчинником, а в іонообмінній хроматографії — розчинами електролітів.

Елюювання можна здійснювати за допомогою градієнта або поступовою зміною розчинів. *Ступінчасте елюювання* проводиться послідовно різними розчинами, що відрізняються за величиною pH або за концентрацією солі, можливо двома параметрами одночасно. Для проведення *градієнтного елюювання* використовується один розчин, у якому змінюється якийсь параметр, наприклад, збільшується концентрація.

5.7. ПЕРЕВАГИ ІОННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Наявні аналізи забирають багато часу, трудомісткі, містять небезпечні хімічні речовини, вимагають тривалої підготовки аналітиків і можуть давати значні похибки вимірювань. Іонообмінна хроматографія пропонує значне удосконалення цих аналізів, пропонуючи такі переваги:

Швидкість: іонообмінна хроматографія може одночасно визначати кілька аніонів або катіонів за одну ін'єкцію.

Відтворюваність: іонообмінна хроматографія часто використовує електролітично генеровані рухомі фази (тобто відсутність ручної підготовки рухомої фази), що спрощує метод і підвищує відтворюваність методу в лабораторіях і між лабораторіями.

Точність: іонообмінна хроматографія часто демонструє межі виявлення значно нижчі за межі, встановлені в монографії USP.

Безпека: іонообмінна хроматографія може надійно вимірювати кілька аналітів без використання небезпечних реагентів.

Економічна ефективність: іонообмінна хроматографія використовує рухомі фази, які не потребують дорогих реагентів або регулювання pH.

Отже, іонообмінна хроматографія використовується для розділення макромолекул за їх зарядом. Його можна підрозділити на катіонообмінний та аніонообмінний залежно від типу аналітів, які вони обмінюють. Доступний широкий спектр слабких і сильних аніонних і катіонообмінних середовищ на вибір відповідно до потреб. До факторів, що впливають на розділення та роздільну здатність, можуть належати буфер, середовище, швидкість потоку тощо. Іонообмінна хроматографія широко використовується на водоочисних устатковинах, харчовій і хімічній промисловості, у фармацевтиці тощо.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Які особливості та принцип методу іоннообмінної хроматографії? Які переваги та недоліки методу?
2. Охарактеризуйте види іонообмінної хроматографії та їх аналітичні можливості: катіонообмінна та аніонообмінна хроматографія.

3. Види буферних розчинів і типи іонообмінних полімерів в іонообмінній хроматографії.

4. Які особливості іонної хроматографії? Які переваги та недоліки одноколонкового та двоколонкового варіанта іонної хроматографії?

5. Які особливості та принцип методу ексклюзійної хроматографії? Які закономірності утримування і типи застосовуваних сорбентів? Що таке гель-хроматографія та які вимоги до гелів? Зазначте, які найбільш поширені сорбенти у методі та охарактеризуйте їх властивості.

6. Зазначте галузі застосування різних видів хроматографії.

7. Теоретичні основи хроматографічного розділення. Поняття іонний обмін, катіоніти, аніоніти, амфоліти. Принцип функціонування іонообмінника.

8. Селективність протиіонів та ефективність іонного обміну, якість хроматографічного розділення. Іонообмінні смоли. Буферні розчини.

9. Застосування іонообмінної хроматографії для розділення та визначення катіонів (натрій, калій, кальцій та магній) і аніонів (хлоридів, сульфатів, карбонових кислот) та інших біологічно активних речовин (антибіотиків, гліканів).

10. Застосування іонообмінної хроматографії для очищення та розділення білків, ферментів, цукрів/вуглеводів.

Тема 6. МЕТОД ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

ГЛОСАРІЙ

Елюент — це розчинник або фіксатор розчинника, який використовується в елюційній хроматографії та є синонімом *рухомої фази.*

Елюат — це суміш *розчиненої речовини* і *розчинника*, що виходить з колонки.

Ефлюент — це потік, що витікає з хроматографічної колонки. На практиці він використовується як синонім *елюату*, але більш точно цей термін стосується потоку незалежно від того, чи відбувається розділення.

Елюція, елюювання — це вилучення речовини з твердого носія у ході хроматографічного розділення шляхом вимиванням його відповідним розчинником. Розрізняють ізократичну і градієнтну елюції.

Супресори (пристрої пригнічення) — це мембранні пристрої, призначені для перетворення іонного елюенту на воду для підвищення чутливості.

Газова хроматографія (ГХ) — це хроматографічний метод, що передбачає використання газів, як рухомої фази та рідких нерухомих фаз.

Газовий хроматограф — це прилад, що використовується для розділення сумішей та аналізу сполук методом ГХ.

Леткість — це властивість сполуки переходити у газоподібний стан за температури до 400 °С (верхня межа температури кипіння речовини) і переноситися газом-носієм через колонку.

Термічна стабільність — це здатність сполуки зберігати хімічну структуру під час нагрівання.

Дериватизація — це процес, за якого речовина хімічно модифікується, утворюючи нову сполуку, яка має необхідні властивості.

Газ-носій — це хімічно інертна рухома фаза, що використовується в газовій хроматографії.

Make-up газ — це газ, що додається до досліджуваних сполук на виході з хроматографічної колонки та дозволяє мінімізувати мертвий об'єм під час детектування і забезпечити ефективну передачу аналізованих сполук на детектор.

Додатковий газ — це газ, що додається у систему за необхідності. Наприклад, для роботи детектора іонізації полум'я слід підтримувати процес горіння, для чого в систему вводиться повітря або суміш водню та повітря.

Пристрій для введення зразка (аналіту) — служить для переведення зразка у газоподібний стан, змішування з газом-носієм (рухомою фазою) та передачу одержаної суміші до колонки. Також називають інжектор.

Колонка — це частина газового хроматографа, де відбувається розділення досліджуваної суміші. Для ГХ використовують два типи колонок — капілярні та насадкові. Матеріалом для виготовлення колонок є скло, неіржавна сталь, мідь, іноді фторопласт. Усередині колонки містять нерухому фазу.

Детектор — це частина газового хроматографа, яка фіксує компоненти досліджуваної суміші та їх кількість, реагуючи на фізико-хімічні властивості кожного компонента суміші та генеруючи електронний сигнал для подальшого створення хроматограми.

Чи спостерігали ви явище хроматографії у повсякденному житті? Так, якщо вам доводилось ненароком намочити водою папір з написами або малюнками, зробленими ручкою. Чорнило у такому разі розмазується або розмивається, а іноді утворює кольорові смуги, які нібито розповзаються сторінкою врізнобіч. Саме останній варіант — це хроматографія в дії, що в цьому разі є випадковістю, але взагалі дозволяє розділяти суміші речовин на окремі компоненти. Хроматографія сьогодні є одним з найбільш корисних та широко використовуваних аналітичних методів, що навіть допомагає шукати докази на місцях скоєння злочинів.

Розглядаючи попередні теми, ви знайомилися з хроматографічними методами, що передбачають використання рідких рухомих і твердих нерухомих фаз. Також як рухома фаза можуть бути використані гази, тоді метод будемо називати *газовою хроматографією.*

З часів розроблення газова хроматографія знайшла застосування у промислових, екологічних, фармацевтичних та біотехнологічних аналітичних лабораторіях.

6.1. ІСТОРІЯ ВИНИКНЕННЯ ТА РОЗВИТКУ МЕТОДУ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Розробленням методу займалися вчені А. Дж. Мартін та Р. Л. Сіндж (лауреати Нобелівської премії 1952 року), які ще у 1941 році запропонували використовувати газову хроматографію з аналітичною метою. Вивчаючи рідинну хроматографію, вони передбачили, що рухома фаза може бути не тільки рідкою, а й газоподібною. Окрім того, науковці стверджували, що розділення летких речовин у хроматографічних колонках, де газ пропускатиметься над гелем, обробленим нелетким розчинником, буде набагато швидшим та ефективнішим за наявні методи.

Незважаючи на це, хоча концепція газової хроматографії й була запропонована на початку сорокових років XX століття, в наукових колах їй одразу не приділили достатньо уваги. Проте А. Дж. Мартін продовжував дослідження разом з А. Джеймсом (NationalInstituteforMedicalResearch, London), й у 1951 році науковці опублікували першу статтю, в якій докладно описали новий пристрій для методу — газовий хроматограф. Водночас була продемонстрована методика, яка дозволила з його використанням розділити та кількісно визначити дванадцять компонентів суміші насичених карбонових кислот з довжиною ланцюга C1-C5. Після цієї публікації актуальність ГХ майже відразу визнали нафтохімічні лабораторії, які з допомогою методу вирішили аналізувати складні суміші вуглеводнів.

Перший комерційний газовий хроматограф був створений у 1955 році компанією «Perkin-Elmer» (США). З 1957 року серійне виробництво газових хроматографів налагодила японська компанія «Shimadzu». Перший прилад GC-1A був справжнім гігантом порівняно з набагато більш потужними та універсальними хроматографами наступних поколінь (рис. 6.1).



GC-1A (1956)



GC-2010 PlusTracera (2013)

Рис. 6.1. Газові хроматографи

6.2. ВИПАДКИ, ЗА ЯКИХ ОБИРАЮТЬ ГАЗОВУ ХРОМАТОГРАФІЮ. ПЕРЕВАГИ ТА НЕДОЛІКИ МЕТОДУ

Два хроматографічні методи, що найбільш часто застосовуються в сучасній аналітичній хімії, це газова хроматографія та ВЕРХ.

ВЕРХ використовує рідку рухому фазу для транспортування компонентів зразка (аналіту) через колонку, наповнену твердим нерухомим фазовим матеріалом.

Щодо ГХ, то цей метод передбачає використання газоподібної рухомої фази для транспортування компонентів зразка через хроматографічну колонку, що містить нерухому фазу. Здебільшого колонки для газової хроматографії мають менший внутрішній діаметр та більшу довжину, ніж колонки для ВЕРХ.

Від часу створення першого газового хроматографа та розробки методу, газова хроматографія перетворилася на складну методику, що здатна розділяти дуже складні суміші летких сполук. Водночас досліджувані сполуки мають *відповідати певним вимогам*, а саме:

- ✓ молекулярна маса до 500;
- ✓ леткість, тобто можливість переходити у газоподібний стан за температури до 400 °С (верхня межа температури кипіння речовини) і переноситися газом-носієм через колонку;
- ✓ термічна стабільність.

Ці властивості стосуються саме компонентів суміші. Щодо досліджуваного зразка, то він може перебувати у будь-якому з трьох *агрегатних станів*:

- ✓ газоподібному (природний газ, інертні гази, повітря);
- ✓ рідкому (органічні розчинники, нафта, спирти, пестициди);
- ✓ твердому (тверді лікарські форми: таблетки, частини рослин, досліджувані зразки для судової експертизи).

Щоб аналізувати твердий зразок, спочатку проводять екстракцію за допомогою органічних розчинників (тобто переводять сполуки у рідку фазу, застосовуючи той самий принцип, що і під час приготування кави), або нагрівають його у герметичній ємності (леткі сполуки при цьому переходять у газову фазу і спрямовуються на аналіз).

Якщо досліджувані сполуки не відповідають вимогам, що їх висуває газова хроматографія (є слаболеткими або термічно лабільними), можна провести їх *дериватизацію*. Це процес, за якого речовина хімічно модифікується, утворюючи нову сполуку,

що має необхідні властивості. Також дериватизацію здійснюють, щоб покращити виявлення досліджуваної речовини на детекторі певного типу, що є чутливим до окремих функціональних груп. Наприклад, уведення в молекулу атома хлору покращує визначення детектором захоплення електронів (ECD). Окрім підвищення придатності до аналізу методом газової хроматографії, дериватизація може покращити роздільну здатність між сполуками, що утворюють суміш, та піками, які перекриваються.

Дериватизувальний реагент і процедура мають сприяти бажаній хімічній модифікації, мають бути відтворюваними, ефективними та безпечними. У методі газової хроматографії використовуються три основні *типи дериватизації*:

- ✓ силілування: силілувальні реагенти є найбільш поширеним типом і реагують зі сполуками, що містять активний гідроген;
- ✓ ацилування: ацилувальні реагенти реагують з високополярними функціональними групами, що їх містять амінокислоти або вуглеводи;
- ✓ алкілування: мішенню для алкілувальних реагентів є атоми гідрогену амінів та кислих гідроксильних груп.

Для сполук, що містять кілька різних функціональних груп, може знадобитися використання кількох дериватизувальних реагентів та багатоетапна процедура дериватизації.

Переваги методу газової хроматографії:

- ✓ висока швидкість аналізу;
- ✓ висока ефективність, надійність;
- ✓ чутливі детектори;
- ✓ недеструктивний метод (не руйнують досліджувані сполуки, до таких належать TCD, ECD-детектори);
- ✓ висока кількісна точність;
- ✓ не потребує великої кількості аналіту (0,2-3 мкл).

Недоліки методу газової хроматографії:

- ✓ молекулярна маса сполук до 500;
- ✓ досліджувані речовини мають бути леткими;
- ✓ непридатний для сполук, які руйнуються за високої температури (термічно лабільних);
- ✓ для визначення структури речовини необхідно використовувати мас-детектор.

Загалом метод газової хроматографії придатний для експрес-аналізу завдяки високій ефективності розділення. Можна стверджувати, що сучасна газова хроматографія

є найбільш швидким з-поміж наявних хроматографічних методів. Так, створені колонки, що здатні розділяти до 1000 компонентів. З урахуванням можливості варіювання температурного режиму аналізу та природи нерухомої фази цим методом проводять досить складні розділення, включаючи суміші оптично активних ізомерів. Також газова хроматографія чудово підходить для кількісного аналізу сумішей сполук.

Обмеженням для газової хроматографії є можливість дослідження лише летких речовин. Деякі високополярні аналіти можуть бути дериватизовані для досягнення необхідного рівня леткості, але цей процес може бути складним і спричиняти кількісні помилки. Практична верхня межа температури для звичайних колонок для газової хроматографії становить близько 350–380 °C. Температури кипіння аналізованих речовин рідко перевищують 400 °C під час аналізу методом газової хроматографії, а максимальна молекулярна маса зазвичай становить близько 500.

6.3. ГАЗОВИЙ ХРОМАТОГРАФ: ДИЗАЙН ТА ПРИНЦИП РОБОТИ ПРИСТРОЮ

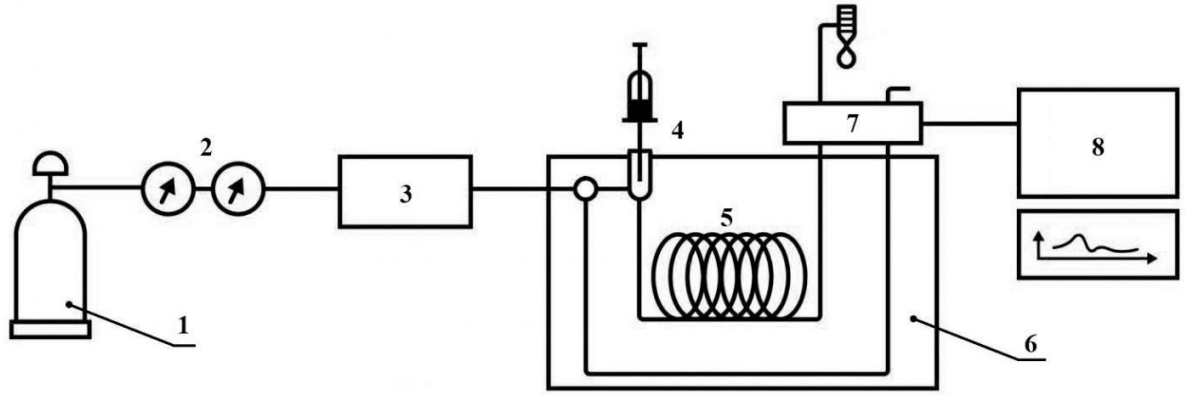


Рис. 6.2. Схема газового хроматографа: 1 — джерело газу-носія; 2 — регулятор тиску; 3 — регулятор потоку; 4 — інжектор; 5 — колонка; 6 — термостат; 7 — детектор; 8 — система збору та обробки даних

Газовий хроматограф складається з таких частин:

Газові впускні отвори, що забезпечують подачу до приладу газу-носія, make-up газу та додаткових газів.

Газ-носій — хімічно інертна рухома фаза, своєрідний «локомотив» для досліджуваного зразка, що використовується в газовій хроматографії. Газ-носій подається з балонів через трубопровід подачі до приладу. Перед цим він обов'язково фільтрується,

щоб забезпечити високу чистоту (в межах 99,995–99,9995 %). Допускається присутність кисню та вуглеводнів у кількості до 0,5 ppm, вода та інші домішки видаляються фільтрувальною системою, оскільки вони можуть пошкодити колонку. Окрім того, регулюється тиск подачі газу та контролюється швидкість потоку.

Як газ-носій найчастіше використовується гелій (He), оскільки він безпечний у застосуванні, ефективний (на одному рівні з воднем), має широкий діапазон швидкості потоку та придатний для багатьох детекторів. Азот (N_2), аргон (Ar) та водень (H_2) також можуть служити газами-носіями з урахуванням мети дослідження та детектора, що використовується.

Так, водень і гелій можуть бути застосовані разом з більшістю таких традиційних детекторів, як детектор іонізації полум'я (FID), термокондуктометричний детектор (TCD) і детектор захоплення електронів (ECD). Вони забезпечують швидкий аналіз за порівняно низьких температур, за рахунок високої швидкості та низької молекулярної маси. Інші детектори, такі, як мас-спектрометричний, потребують використання азоту або аргону, які мають більшу молекулярну масу.

Make-up газ — газ, що додається до досліджуваних сполук на виході з хроматографічної колонки та дозволяє мінімізувати мертвий об'єм у разі детектування і забезпечити ефективну передачу аналізованих сполук на детектор. Здебільшого застосовується той самий газ, що і газ-носій.

Додатковий газ — газ, що додається у систему за необхідності. Наприклад, для роботи детектора іонізації полум'я слід підтримувати процес горіння, для чого в систему вводиться повітря або суміш водню та повітря (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Типи детекторів у методі газової хроматографії

Детектор	Тип газу-носія	Тип make-up газу	Додаткові гази
FID	He (або H_2, N_2)	He (або N_2)	H_2 та повітря
TCD	He (або H_2, N_2)	Аналогічно газу-носію	Аналогічно газу-носію
ECD	He (або H_2, $ArCH_4$)	N_2 (або $ArCH_4$)	Аналогічно газу-носію
MD	N_2 (або Ar)	Не використовується	Не використовується

Пневматичне управління, що регулює процес подачі газів і тиск всередині пристрою. Сучасні прилади зазвичай мають електронні пневматичні регулятори тиску, раніше прилади були обладнані ручним регулюванням тиску.

Пристрій для введення зразка (аналіту) служить для переведення зразка у газоподібний стан, змішування з газом-носієм (рухомою фазою) та передачу одержаної суміші до колонки. Його називають інжектором.

Як уже зазначалося, методом газової хроматографії аналізують насамперед гази та рідини, а тверді зразки для аналізу попередньо переводять у рідкий або газоподібний стан. Найпоширеніший метод уведення зразка полягає у використанні мікрошприца, що вводиться крізь гумову перегородку у випарник, розташований на вході до колонки. Температура всередині випарника має бути приблизно на 50 °С вище за температуру кипіння найменш леткого компонента проби.

Пристрій для введення розрізняється залежно від типу використовуваної колонки:

- ✓ для насадкових колонок об'єм зразка становить від десятих частин мікролітра до 20 мкл. Тому в такому разі верхня частина колонки виконує функцію випарника, де зразок, уведений з допомогою мікрошприца, нагрівається до необхідної температури та змішується з газом-носієм. Це так званий режим програмованого теплового випаровування (Programmed Thermal Vaporizing, PTV);
- ✓ капілярні колонки потребують значно меншої кількості аналіту, як правило, приблизно 10^{-3} мл. Щоб їх не перенавантажувати застосовують уведення проб у режимі спліт/сплітлес (split/splitless) (рис. 6.3).

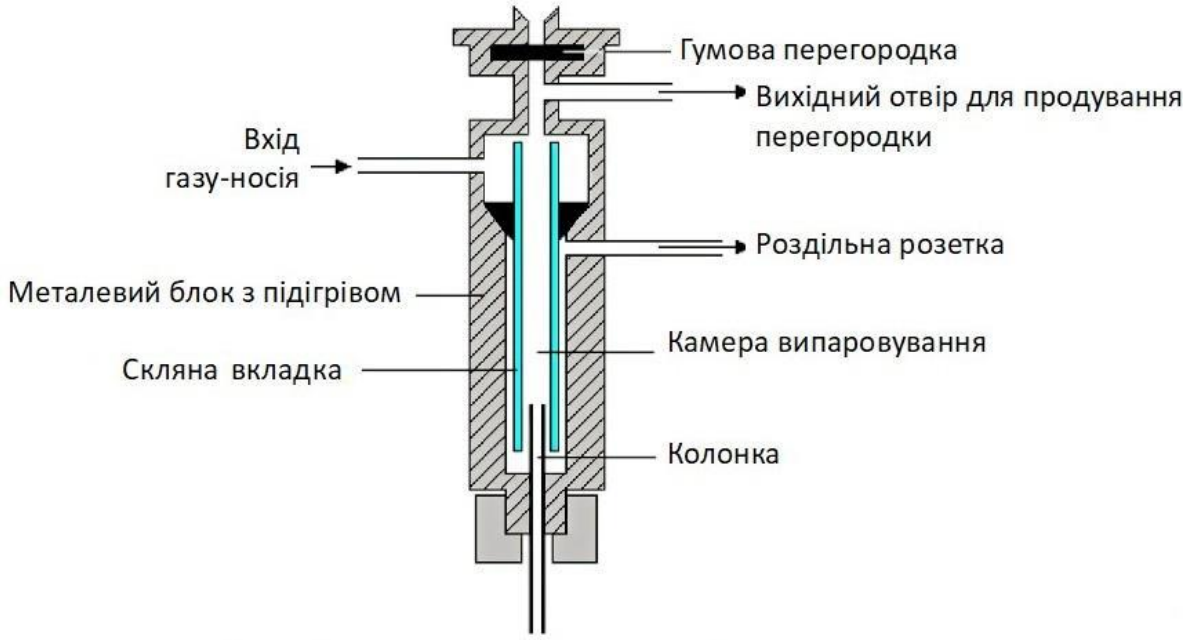


Рис. 6.3. Спліт/сплітлес інжектор

Пристрій для введення використовують в одному з двох режимів: спліт або сплітлес. Коли інжектор перебуває в режимі «спліт», газ-носій потрапляє у випарник, де змішується зі зразком. Частина цієї суміші переходить на колонку, але більшість виходить через спліт-отвір. Випускний отвір у верхній частині випарника запобігає потраплянню в колонку рідини. Тобто в процесі введення проби відбувається концентрування компонентів зразка і зменшення його загального об'єму за рахунок виведення через спліт-отвір, щоб не перевищити місткість колонки.

Режим уведення, впродовж якого спліт-отвір залишається закритим, називають сплітлес. У разі необхідності його відкривають через 10–30 с після введення проби, щоб запобігти потраплянню у колонку надлишкового об'єму газів. У цьому режимі весь об'єм аналізованого зразка потрапляє у колонку.

Для капілярних колонок також застосовується введення зразків методом «кул-он-колум» (CoolOn-ColumnInlet, COC). При цьому і впускний отвір, і термостат охолоджуються до температури кипіння розчинника або трохи нижче, після чого вводиться проба. Потім поступово підвищують температуру. Оскільки зразок не випаровується відразу на вході до колонки, можливі втрати зводяться до мінімуму та забезпечується більш точний результат.

Для оптимальної ефективності колонки кількість зразка не має бути занадто великою, його слід уводити швидко. Повільне введення об'ємних проб спричиняє розширення піків на хроматограмі та втрату роздільної здатності.

Колонка — «серце» хроматографа — частина приладу, де відбувається розділення досліджуваної суміші.

Зразок розділяється на складові компоненти у колонці. Колонки відрізняються за довжиною та внутрішнім діаметром. Для газової хроматографії використовують *два типи колонок* — капілярні та насадкові. Матеріалом для виготовлення колонок є скло, неіржавна сталь, мідь, іноді фторопласт. Усередині колонки містять нерухому фазу.

Залежно від природи останньої розрізняють:

1. Газоадсорбційну хроматографію, в якій нерухомою фазою є тверді сорбенти. Використовуються неорганічні (силікагель, графітована термічна сажа, молекулярні сита — алюмосилікати натрію та кальцію) та полімерні пористі сорбенти.

2. Газорідинну хроматографію, де нерухома фаза є рідиною, нанесеною на твердий носій:

✓ Носій — відносно інертний адсорбент з низькою питомою поверхнею, на якій нерухома фаза має утримуватися у вигляді плівки рівномірної товщини шару.

Застосовують мінеральні та полімерні носії. Більшість мінеральних носіїв є переробленими діатомітами. Зазвичай використовують носії з розмірами частинок від 125 до 150 мкм або від 150 до 180 мкм.

✓ Як рідку нерухому фазу в колонках використовують полярні та неполярні рідини відповідно до правила «подібне розчиняється у подібному». Неполярні нерухомі фази (полідиметилсилоксан, полі(фенілметилдиметил)силоксан, полі(фенілметил)силоксан) обирають для визначення неполярних сполук (вуглеводні, пестициди, аміни), а полярні (поліетиленгліколь, полі(диціаноалілдиметил)силоксан) — для полярних (спирти, гліколі) речовин.

Внутрішній діаметр капілярних колонок складає 0,15–0,53 мм, а довжина — 15–100 м. Розрізняють два типи:

✓ вкриті рідкою нерухомою фазою (wall-coatedopentubular, WCOT);

✓ вкриті шаром сорбенту (близько 30 мкм) з адсорбованою рідкою нерухомою фазою (support-coatedopentubular, SCOT).

Незважаючи на те, що колонки SCOT здатні утримувати більший об'єм нерухомої фази, колонки WCOT більш ефективні, але обидва різновиди ефективніші за насадкові колонки.

У 1979 році був розроблений новий тип колонок WCOT — колонки з розплавленого діоксиду кремнію (fused-silicawall-coated, FSWC), що сьогодні є одним із найбільш широко використовуваних різновидів. Стінки таких колонок виготовляють з очищеного діоксиду кремнію з мінімальною домішкою оксидів металів. Ці колонки набагато тонші, ніж скляні, з діаметром до 0,1 мм і довжиною до 100 м. Для захисту колонки на її зовнішню поверхню наносять поліамідне покриття, а потім скручують у котушки, щоб розмістити всередині термостата хроматографа. Колонки FSWC є комерційно доступними і набули попиту через високу хімічну інертність, більшу ефективність та менший об'єм досліджуваного зразка.

Насадкові колонки мають внутрішній діаметр від 2 до 4 мм і довжину від 1 до 10 метрів. Усередині вони містять тонкоподрібнений, інертний, твердий матеріал (сорбент, зазвичай на основі діатомової землі), покритий рідкою нерухомою фазою (табл. 6.2).

Через складність рівномірного заповнення насадкової колонки вони мають більший діаметр, ніж капілярні, і обмежений діапазон довжини. У результаті насадкові колонки дають лише приблизно 50 % ефективності порівняно з колонками WCOT. Крім того, сорбент з часом деактивується через часткову адсорбцію домішок, що не трапляється на відкритих капілярних FSWC колонках.

Таблиця 6.2

Порівняльна характеристика колонок для газової хроматографії

Порівняння колонок для ГХ		
Параметр	Насадкова колонка 	Капілярна колонка 
Довжина, м	1–6	5–150
Внутрішній діаметр, мм	0,53–4	0,1–0,53
Теоретичні тарілки	5000 (2 м)	120000 (30 м)
Кількість рідкої фази	1–30 %	0,1–7,0
Ціна, євро	100	400

Термостат, який забезпечує температурний режим аналізу. Температурний режим є важливим фактором перебігу аналізу методом ГХ. Тому прилад має бути обладнаний термостатом, який забезпечує постійну температуру всередині колонки. Термостат повинен швидко нагріватися, щоб забезпечити тепловий контроль у межах десятих градусів. Охолодження відбувається за допомогою вентилятора та вентиляційного отвору, як правило, розміщеного в задній частині термостата.

У процесі аналізу використовується одним із двох температурних режимів:

✓ ізотермічний — підтримання сталої температури впродовж усього часу дослідження. Оптимальна температура колонки залежить від температури кипіння досліджуваного зразка. Як правило, температура трохи вище середньої температури кипіння зразка спричиняє час елюювання від 2 до 30 хвилин. Мінімальні температури дають хорошу роздільну здатність, але збільшують час елюювання. Ізотермічний режим використовується, якщо діапазон температур кипіння зразка вузький;

✓ програмований — поступове збільшення температури відповідно до програми аналізу. Застосовується, якщо компоненти зразка мають широкий діапазон температур кипіння. Температура колонки збільшується (постійно або поетапно) у міру того, як відбувається розділення компонентів. Аналіз починається за низької температури для розділення компонентів з низькими температурами кипіння і збільшується для розділення менш летких, висококиплячих компонентів зразка. Темпи 5–7 °С/на хвилину є типовими для програмованого режиму.

Детектор, який фіксує компоненти досліджуваної суміші та їх кількість. Детектор реагує на фізико-хімічні властивості кожного компонента суміші та генерує електронний сигнал для подальшого створення хроматограми. Існує багато різних типів детекторів, які обирають залежно від хімічної природи досліджуваної суміші, необхідної чутливості, а також з урахуванням мети — кількісного чи якісного аналізу.

Так, існують неселективні детектори, які реагують на всі сполуки, крім газу-носія, та селективні детектори, які відповідають на низку сполук із загальними фізичними або хімічними властивостями, а специфічні детектори реагують лише на одну хімічну сполуку. Детектори також можуть бути класифіковані залежно від того, реагують вони на концентрацію сполуки (concentration) чи на масовий потік (massflow). Сигнал від детектора першого типу пов'язаний з концентрацією речовини і, як правило, не руйнує зразок. Розведення make-up газами знижує реакцію таких детекторів. Детектори, залежні від масового потоку, зазвичай руйнують зразок, а сигнал пов'язаний зі швидкістю, з якою молекули речовин потрапляють у детектор. На реакцію детектора, що залежить від масового потоку, не впливає make-up газ.

З-поміж універсальних детекторів слід зазначити (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

Типи детекторів у методі газової хроматографії

Детектор	Тип	Додаткові гази	Селективність	Виявлення
FID	Massflow	Водень та повітря	Більшість органічних сполук	100 pg
TCD	Concentration	Газ-носій	Універсальний	1 ng
ECD	Concentration	Make-up	Галогогенопохідні, нітрати, нітрили, пероксиди, ангідриди, органометалічні сполуки	50 fg
MD	Concentration	Не використовується	Будь-яка сполука, яка утворює іони в межах вибраного діапазону мас	1–10 ng

Детектор іонізації полум'я (FID) — один з найбільш часто використовуваних детекторів у методі ГХ. Він працює, іонізуючи (розкладаючи на іони) молекули у полум'ї та записуючи потенційні зміни. Основним елементом цього детектора є полум'я (зазвичай водень — повітря, водень — кисень), яке оточує електрод. Коли газ-носій

проходить через детектор, між цим електродом і поляризувальним електродом протікає невеликий струм, що визначається як базовий рівень. Коли до детектора потрапляє компонент досліджуваної суміші, то він згоряє, а отримані іони викликають збільшення струму між електродами. Ця зміна фіксується як сигнал. Відгук детектора залежить від кількості вуглецю в молекулі речовини, іони вуглецю утворюються під час спалювання.

Термокондуктометричний детектор (TCD) або детектор з теплопровідності (катарометр). Вимірювання концентрації базується на змінах електропровідності, що виникають внаслідок зміни теплопровідності залежно від концентрації досліджуваних речовин у потоці газу-носія.

Детектор захоплення електронів (ECD). Принцип дії ґрунтується на різній рухливості іонів та вільних електронів. У камері детектора розміщується джерело електронів (наприклад, ізотоп нікелю-63). У разі потрапляння у неї досліджуваної речовини, остання починає захоплювати електрони, зменшуючи їх кількість у камері. Утворені негативно заряджені іони набагато повільніше рухаються до протилежного електрода і тому на деякий час струм у детекторі зменшується. Ця зміна струму фіксується і відповідає появі сполуки в камері детектора.

Мас-спектрометричний детектор, що є специфічним типом мас-спектрометра, дозволяє ідентифікувати хімічну структуру досліджуваних сполук.

Аналізатор даних, що здійснює обробку інформації, отриманої детектором, та переводить її у графічний вигляд — хроматограму.

Система приймає аналоговий сигнал від детектора й оцифровує його для створення запису процесу хроматографічного розділення, який називають хроматограмою.

6.4. ПРОЦЕДУРА У МЕТОДІ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

1. Підготовка проби.

2. Елюент (газ-носій) уводиться у пристрій з газового балона (джерела). Газ називають носієм, тому що саме це він і робить — переносить зразок, що досліджується через хроматограф. У газовій хроматографії газ-носій є рухомою фазою. Швидкість потоку газу-носія ретельно контролюється, щоб забезпечити чітке розділення компонентів у зразку. Носій потрапляє у хроматограф через впускний отвір.

3. Досліджуваний зразок уводиться у газ-носій з допомогою інжектора і миттєво переходить у газоподібний стан.

4. Гази, що входять до складу зразка, розділяються, коли вони рухаються уздовж колонки, яка містить нерухому фазу (тверду або рідку). Розділення базується на спорідненості досліджуваної сполуки з нерухомою фазою, тобто її розчинності в ній, та залежить від температури кипіння сполуки і температури в колонці.

Під час руху уздовж колонки сполуки, що входять до складу зразка, адсорбуються та десорбуються нерухомою фазою. Кожна з таких взаємодій називається «теоретична тарілка». Відповідно до їх кількості кожна зі сполук утримується в колонці певний час, що відображається на хроматограмі.

5. Коли зразок розділяється на окремі компоненти і вони починають рухатися з різною швидкістю, детектор визначає кожен з них на виході з колонки.

6. Аналізатор даних, приєднаний до хроматографа, відображає хроматограму (діаграму) з піками, що відповідають відносній кількості сполук, які містилися у зразку.

Після проходження аналіту через колонку він розділяється на окремі компоненти, які потрапляють у детектор, де їх певні фізико-хімічні властивості спричиняють «відповідь» останнього. Зафіксований сигнал з урахуванням часу є основою для запису приладом хроматограми (рис. 6.4).

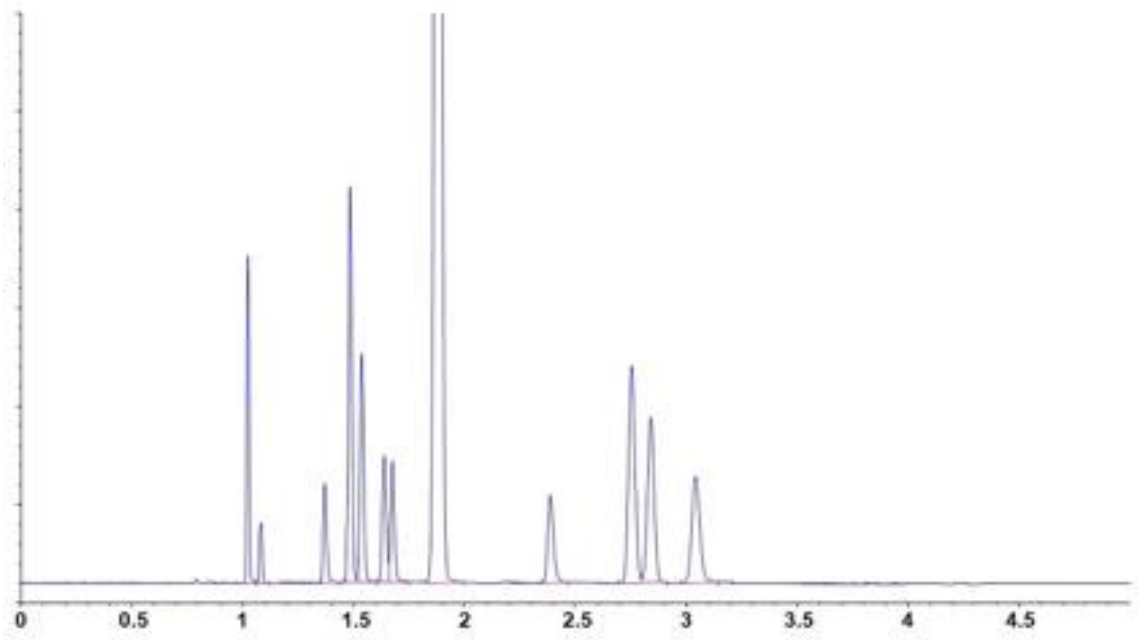


Рис. 6.4 Типова хроматограма у методі газової хроматографії

Компоненти, що не утримуються в колонці, елюються у так званий «мертвий час» t_0. Існують різні способи вимірювання цього параметра з використанням сполук типу метану або гексану. Сполуки, що утримуються в колонці, відображаються пізніше як піки на хроматограмі. Час їх утримування забезпечує якісний аспект хроматограми, тому що він завжди буде однаковим за однакових хроматографічних умов. Висота піка на хроматограмі та площа піка пов'язана з кількістю аналіту. Для визначення фактичної кількості сполуки площа або висота порівнюються з нормами для відомої концентрації.

6.5. НАЙВАЖЛИВІШІ ГАЛУЗІ ЗАСТОСУВАННЯ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

*У **фармації*** метод використовується для аналізу залишкових розчинників у вихідних речовинах та готових лікарських засобах. Біофармацевтичне застосування передбачає, наприклад, виявлення барбітуратів, амфетамінів, алкалоїдних препаратів у біологічних рідинах, аналізи на наявність допінгів перед спортивними змаганнями.

Екологічні програми використання газової хроматографії містять виявлення забруднювальних речовин, таких, як пестициди, фунгіциди, гербіциди, ароматичні сполуки тощо, аналіз стічних вод тощо.

У ***харчовій промисловості*** з допомогою газової хроматографії тестують розчинники та ароматизатори.

У ***хімічній промисловості*** з допомогою газової хроматографії визначають вміст речовин у сумішах, їх чистоту, проводять моніторинг виробничих процесів тощо.

Аналіз природного газу, бензину та кількісне визначення фракцій у ***нафтопереробній промисловості*** здійснюються з використанням газової хроматографії. Геохімічні програми містять картографування запасів нафти та відстеження шарів корисних копалин тощо.

Метод ГХ дозволяє досліджувати леткі та термостабільні сполуки. Цим вимогам відповідає близько 5 % відомих органічних сполук, але саме вони складають 70–80 % сполук, які широко використовуються у побуті та промисловості. Так, з допомогою методу газової хроматографії аналізують: ефірні олії, насичені та ненасичені органічні кислоти, естери, спирти, хлор- та фосфорорганічні пестициди, нафту та нафтопродукти, природний газ, лаки та фарби, повітря, ґрунти та воду.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Дайте визначення методу «Газова хроматографія» та наведіть приклади його застосування у фармації та інших сферах.
2. Назвіть вимоги, яким мають відповідати сполуки для аналізу методом ГХ.
3. Дайте визначення поняттю «дериватизація» та зазначте типи дериватизації, що застосовуються в аналізі сполук методом газової хроматографії.
4. Перелічіть типи та види газів, що використовуються для проведення ГХ, та вкажіть їх функції.
5. Поясніть, у чому полягає режим програмованого теплового випаровування під час уведення у газовий хроматограф досліджуваного зразка.
6. Поясніть принцип роботи режиму «спліт/сплітлес», що використовується для введення у газовий хроматограф досліджуваного зразка.
7. Поясність, з якою метою застосовується уведення зразків методом «кул-он-колум».
8. Які види колонок застосовуються в газовій хроматографії та в чому їх відмінності?
9. Назвіть полярні та неполярні нерухомі фази для аналізу методом газової хроматографії.
10. Опишіть температурні режими аналізу, що використовуються в газовій хроматографії.
11. Перелічіть детектори, які застосовуються у газових хроматографах.
12. Опишіть послідовність процесів, що відбуваються в процесі аналізу сполуки методом газової хроматографії.

ТЕСТИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ РОЗДІЛЕННЯ ТА АНАЛІЗУ

1. *Гідрофобність — це властивість речовини не змочуватися та відштовхувати:*

A. Воду
B. Ліпіди, жири
C. Повітря
D. Розчини неорганічних солей

2. *Гідрофільність — це властивість речовини змочуватися:*

A. Водою
B. Жирами
C. Повітрям
D. Розчинами неорганічних солей

3. *Здатність деяких сполук виявляти одночасно гідрофільні та гідрофобні (ліпофільні) властивості завдяки наявності в їхніх молекулах зарядженої або полярної і неполярної частин — це:*

A. Амфіфільність
B. Гідрофільність
C. Гідрофобність
D. Полярність

4. *Обов'язковими компонентами хроматографічної системи є:*

A. Нерухома, рухома фази, аналізована сполука
B. Тільки нерухома фаза
C. Тільки рухома фаза
D. Тільки аналізована сполука

5. *Розчинник або суміш розчинників, що рухається вздовж нерухомої фази під час хроматографічного процесу — це:*

A. Елюент або рухома фаза
B. Нерухома фаза
C. Сорбент
D. Реагент для виявлення

6. *Будь-який хроматографічний метод характеризується наявністю двох фаз (рухомої та нерухомої), що:*

A. Не змішуються

B. Змішуються

C. Розчинні

D. Формують евтектичну суміш

7. *Зазначте обов'язковий компонент хроматографічного процесу, основною функцією якого є сорбція та утримування речовини і який являє собою твердий адсорбент з розвиненою поверхнею або плівку рідини, що закріплена на твердому носії:*

A. Нерухома фаза

B. Рухома фаза

C. Аналізована сполука

D. Усі варіанти правильні

8. *Зазначте обов'язковий компонент хроматографічного процесу, основною функцією якого є переміщення аналізованих сполук і який являє собою потік газу або рідини, що проходить (фільтрується) крізь шар сорбенту:*

A. Рухома фаза

B. Нерухома фаза

C. Аналізована сполука

D. Усі варіанти правильні

9. *Як називають газ або рідину, яка є рухомою фазою і протікає через нерухому фазу у хроматографічних методах дослідження?*

A. Елюент

B. Елюат

C. Сорбент

D. Сорбат

10. *Як називають рухому фазу, що виходить з колонки і містить розділені компоненти аналізованої проби?*

A. Елюат

B. Елюент

C. Сорбент

D. Сорбат

11. *Офіційне відкриття хроматографічних методів дослідження та самого терміна «хроматографія» належить:*

A. М. С. Цвєту
B. М. А. Ізмайлову і М. С. Шрайберу
C. А. Мартіну та Р. Сінджу
D. Арістотелю

12. *Хроматографія — це сукупність методів виявлення, очищення і розділення компонентів суміші, що засновані на різниці:*

A. У спорідненості до рухомої і нерухомої фаз
B. У температурах плавлення
C. У температурах кипіння
D. В оптичній густині

13. *Наука про міжмолекулярні взаємодії і перенесення молекул або частинок у системі фаз, що не змішуються і рухаються одна відносно одної:*

A. Хроматографія
B. Титриметрія
C. Абсорбційна спектрофотометрія
D. Гравіметрія

14. *Зазначте основні механізми розділення у хроматографії:*

A. Усі відповіді правильні
B. Сорбція, розподіл
C. Іонний обмін
D. Утворення малорозчинних сполук
E. Міграція

15. *Фізико-хімічний процес поглинання речовини (сорбату), що перебуває у рідкій або газовій фазі, іншою речовиною — твердим або рідким поглиначем, що називається сорбентом, це:*

A. Сорбція
B. Десорбція
C. Міграція
D. Іонний обмін

16. *Фізико-хімічний процес вивільнення речовини (сорбату) з твердого або рідкого поглинача (сорбенту)*:

A. Десорбція
B. Сорбція
C. Міграція
D. Іонний обмін

17. *Речовина, яка поглинається під час процесу сорбції, це:*

A. Сорбат
B. Сорбент
C. Усі відповіді правильні
D. Немає правильної відповіді

18. *Тверда або рідка речовина, що в процесі сорбції поглинає речовини (сорбати), які перебувають у рідкій або газовій фазі, це:*

A. Сорбент
B. Сорбат
C. Усі відповіді правильні
D. Немає правильної відповіді

19. *Процес поглинання молекул з газового або рідкого середовища зовнішньою і внутрішньою поверхнею твердої речовини має назву:*

A. Адсорбція
B. Абсорбція (розподіл)
C. Десорбція
D. Усі відповіді правильні

20. *Процес поглинання речовини з рідкої або газової фази усім об'ємом твердого тіла або рідиною має назву:*

A. Абсорбція (розподіл)
B. Адсорбція
C. Десорбція
D. Усі відповіді правильні

21. *Речовину, на поверхні якої відбувається концентрування іншої речовини під час явища адсорбції, називають:*

A. Адсорбентом
B. Адсорбатом
C. Абсорбентом
D. Абсорбатом

22. *Речовину, яка в процесі адсорбції вилучається з газової або рідкої фази й утримується на поверхні, називають:*

A. Адсорбатом
B. Адсорбентом
C. Абсорбентом
D. Абсорбатом

23. *Речовина, яка поглинає (абсорбує) речовини, має назву:*

A. Абсорбент
B. Абсорбат
C. Адсорбат
D. Адсорбент

24. *Речовина, яка в процесі абсорбції поглинається з газової або рідкої рухомої фази, це*:

A. Абсорбат
B. Абсорбент
C. Адсорбат
D. Адсорбент

25. *За технікою (способом) проведення процесу розділення розрізняють такі види хроматографії:*

A. Колонкова та площинна (планарна)
B. Рідинна та газова
C. Адсорбційна, розподільна, іонообмінна, ексклюзійна, афінна, хеміхроматографія
D. Аналітична, препаративна, промислова (виробнича)

26. *У колонковому варіанті хроматографії розділення речовин проводять на хроматографічних колонках, що являють собою трубки, заповнені:*

A. Нерухомою фазою
B. Рухомою фазою
C. Усі відповіді правильні
D. Немає правильної відповіді

27. *За класифікацією до хроматографічних методів, залежно від механізму взаємодії сорбату та сорбенту, належать всі методи, окрім:*

A. Термічної хроматографії
B. Іонообмінної хроматографії

C. Адсорбційної хроматографії
D. Розподільної хроматографії
E. Ексклюзійної хроматографії

28. *У методі паперової хроматографії нерухомою фазою є:*

A. Спеціальний вид хроматографічного паперу
B. Суміш розчинників
C. Спеціальний тип хроматографічної пластини
D. Хроматографічна колонка

29. *У методі тонкошарової хроматографії нерухомою фазою є:*

A. Спеціальний тип хроматографічної пластини
B. Хроматографічна камера
C. Спеціальний вид хроматографічного паперу
D. Хроматографічна колонка

30. *Залежно від агрегатного стану рухомої фази хроматографія поділяється на:*

A. Рідинну і газову
B. Рідинну і твердофазну
C. Твердофазну і газову
D. Тільки рідинну
E. Тільки газову

31. *За механізмом взаємодії сорбенту і сорбату можна виділити такі види хроматографії:*

A. Адсорбційна, розподільна, іонообмінна, ексклюзійна, афінна, хеміхроматографія
B. Колонкова та площинна (планарна)
C. Рідинна та газова
D. Аналітична, препаративна, промислова (виробнича)

32. *Залежно від мети проведення хроматографічного процесу розрізняють такі види хроматографії:*

A. Аналітична, препаративна, промислова (виробнича)
B. Колонкова та площинна (планарна)
C. Рідинна та газова
D. Адсорбційна, розподільна, іонообмінна, ексклюзійна, афінна, хеміхроматографія

33. *Аналітичну хроматографію використовують для:*

A. Визначення якісного та кількісного складу зразка
B. Виділення та очищення речовин із суміші у чистому вигляді
C. Усі відповіді правильні
D. Немає правильної відповіді

34. *Препаративну хроматографію використовують для:*

A. Виділення та очищення речовин із суміші у чистому вигляді
B. Визначення якісного та кількісного складу зразка
C. Усі відповіді правильні
D. Немає правильної відповіді

35. *Вкажіть завдання, які можуть бути вирішені за допомогою хроматографічних методів дослідження:*

A. Якісний і кількісний аналіз, розділення складних сумішей речовин на індивідуальні компоненти
B. Концентрування речовин з їх дуже розбавлених розчинів
C. Очищення від домішок
D. Визначення молекулярної структури речовин
E. Усі відповіді правильні

МЕТОДИ ПАПЕРОВОЇ, ТОНКОШАРОВОЇ ТА ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

1. *Тонкошарова хроматографія (ТШХ) — це метод розділення й аналізу суміші речовин, що базується на тому, що:*

A. Нерухома фаза нанесена тонким шаром на скляну, пластикову або алюмінієву підкладку; рухома фаза — рідка, являє собою суміш розчинників
B. Використовується нерухома фаза, що являє собою спеціальні види паперу (хроматографічний папір), а рухома фаза — рідка, являє собою суміш розчинників
C. Нерухома фаза поміщена в хроматографічну колонку, рухома фаза — рідка, яка подається під тиском
D. Нерухома фаза поміщена в хроматографічну колонку, рухома фаза — газ, який подається під тиском

2. *Нерухомою фазою у методі тонкошарової хроматографії є:*

A. Шар сорбенту, нанесений на скляну, алюмінієву або пластикову підкладку
B. Розчинник або сума розчинників
C. Хроматографічна колонка
D. Спеціальні види паперу

3. *Який із сорбентів найчастіше використовується як нерухома фаза у методі тонкошарової хроматографії?*

A. Силікагель
B. Пластик
C. Скло
D. Поліетиленоксид

4. *Як називається скляна ємність з кришкою, в яку поміщають рухому фазу і проводять хроматографування у методі тонкошарової хроматографії?*

A. Хроматографічна камера
B. Хроматографічна колонка
C. УФ-кабінет
D. Мірна колба

5. *Розчинник або сума розчинників, які в методі тонкошарової хроматографії відповідають за переміщення аналізованого зразка вздовж нерухомої фази, це:*

A. Рухома фаза
B. Нерухома фаза
C. Сорбент
D. Закріплювальна речовина

6. *Для нанесення речовини на пластинку в методі тонкошарової хроматографії використовують:*

A. Мікропіпетки, калібровані капіляри, мікрошприци
B. Автосамплер
C. Хроматографічна камера
D. Аналітичні ваги

7. *Підкладки для пластин у методі тонкошарової хроматографії виготовляють:*

A. Зі скла, алюмінію, пластику
B. З дерева
C. З алюмінію оксиду, силікагелю
D. З картону

8. *Для нанесення речовини на хроматографічну пластинку в методі тонкошарової хроматографії використовують:*

A. Мікропіпетки, калібровані капіляри, мікрошприци
B. Автосамплер
C. Хроматографічну камеру
D. Аналітичні ваги

9. *Рухомою фазою у методі тонкошарової хроматографії є:*

A. Розчинник або суміш розчинників
B. Спеціальні види паперу
C. Спеціальні види хроматографічних пластин
D. Спеціальні види силікагелю

10. *Як називається лінія, на яку наносять випробовувані зразки у методі тонкошарової хроматографії:*

A. Лінія «старт»
B. Лінія «фініш»

11. *Як називається лінія, що показує, яку відстань пройшла рухома фаза у методі тонкошарової хроматографії:*

A. Лінія «фініш»
B. Лінія «старт»

12. *Перед використанням мікрошприца для нанесення речовини обов'язково:*

A. Тричі промивають чистим розчинником, а потім тричі випробовуваною речовиною
B. Нічим не промивають
C. Промивають рухомою фазою

13. *За технікою виконання аналізу хроматографія поділяються:*

A. На планарну (площинну) та колонкову
B. На рідинну, газову
C. На адсорбційну, ексклюзійну, осадову, афінну

14. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 1 % розчин анальгіну об'ємом 25 мл:*

A. 0,25 г
B. 0,10 г
C. 1,00 г
D. 0,20 г
E. 0,50 г

15. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 2,5 % розчин парацетамолу об'ємом 50 мл:*

A. 1,25 г

B. 2,50 г

C. 0,25 г

D. 0,10 г

E. 1,00 г

16. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 5 % розчин бісопрололу об'ємом 10 мл:*

A. 0,50 г

B. 2,50 г

C. 1,25 г

D. 0,10 г

E. 1,00 г

17. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 2 % розчин анальгіну об'ємом 20 мл:*

A. 0,40 г

B. 2,00 г

C. 0,20 г

D. 0,25 г

E. 0,50 г

18. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 3 % розчин парацетамолу об'ємом 200 мл:*

A. 6,00 г

B. 2,50 г

C. 1,25 г

D. 0,25 г

E. 3,00 г

19. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 2,0 % розчин фруктози об'ємом 100 мл:*

A. 2,00 г

B. 2,50 г

C. 1,25 г

D. 0,25 г

E. 1,00 г

20. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 1 % розчин глюкози об'ємом 100 мл:*

A. 1,00 г

B. 2,00 г

C. 0,20 г

D. 0,25 г

E. 0,50 г

21. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 0,2 % розчин стрептоциду об'ємом 10 мл:*

A. 0,02 г

B. 2,00 г

C. 0,20 г

D. 0,25 г

E. 0,50 г

22. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 2 % розчин парацетамолу об'ємом 200 мл:*

A. 4,00 г

B. 2,50 г

C. 1,25 г

D. 0,25 г

E. 2,00 г

23. *Розрахуйте масу наважки субстанції, яку необхідно зважити на аналітичних вагах для приготування розчинів заданої концентрації: 0,01 % розчин лізиноприлу об'ємом 200 мл*:

A. 0,02 г

B. 0,10 г

C. 1,00 г

D. 0,01 г

E. 0,50 г

24. *Розрахуйте об'єми компонентів рухомої фази, які необхідно змішати для отримання заданої кількості рухомої фази: етанол — вода (80:20), об'ємом 20 мл:*

A. Етанол — 16 мл, вода — 4 мл

B. Етанол — 12 мл, вода — 8 мл

C. Етанол — 10 мл, вода — 10 мл

D. Етанол — 80 мл, вода — 20 мл

25. *Розрахуйте об'єми компонентів рухомої фази, які необхідно змішати для отримання заданої кількості рухомої фази: оцтова кислота крижана — вода — діоксан (10:25:65), об'ємом 20 мл:*

A. Оцтова кислота крижана — 2 мл, вода — 5 мл, діоксан — 13

B. Оцтова кислота крижана — 3 мл, вода — 7 мл, діоксан — 10

C. Оцтова кислота крижана — 2 мл, вода — 2 мл, діоксан — 16

D. Оцтова кислота крижана — 5 мл, вода — 5 мл, діоксан — 10

26. *Розрахуйте об'єми компонентів рухомої фази, які необхідно змішати для отримання заданої кількості рухомої фази: вода — метанол — оцтова кислота крижана — етиленхлорид (10: 15: 25: 50), об'ємом 20 мл:*

A. Вода — 2 мл, метанол — 3 мл, оцтова кислота крижана — 5 мл, етиленхлорид — 10 мл

B. Вода — 2 мл, метанол — 2 мл, оцтова кислота крижана — 5 мл, етиленхлорид — 11 мл

C. Вода — 10 мл, метанол — 15 мл, оцтова кислота крижана — 25 мл, етиленхлорид — 50 мл

D. Вода — 4 мл, метанол — 12 мл, оцтова кислота крижана — 2 мл, етиленхлорид — 10 мл

27. *Розрахуйте об'єми компонентів рухомої фази, які необхідно змішати для отримання заданої кількості рухомої фази: оцтова кислота крижана — хлороформ — вода (70:60:10), об'ємом 28 мл:*

A. Оцтова кислота крижана — 14 мл, хлороформ — 12 мл, вода — 2 мл

B. Оцтова кислота крижана — 70 мл, хлороформ — 60 мл, вода — 10 мл

C. Оцтова кислота крижана — 7 мл, хлороформ — 6 мл, вода — 1 мл

D. Оцтова кислота крижана — 12 мл, хлороформ — 12 мл, вода — 4 мл

28. *Розрахуйте об'єми компонентів рухомої фази, які необхідно змішати для отримання заданої кількості рухомої фази: розчин аміаку концентрований — метанол — метиленхлорид (2:20:80), об'ємом 51 мл:*

A. Розчин аміаку концентрований — 1 мл, метанол — 10 мл, метиленхлорид — 40 мл

B. Розчин аміаку концентрований — 2 мл, метанол — 20 мл, метиленхлорид — 30 мл

C. Розчин аміаку концентрований — 2 мл, метанол — 20 мл, метиленхлорид — 80 мл

D. Розчин аміаку концентрований — 2 мл, метанол — 10 мл, метиленхлорид — 40 мл

29. *У методі паперової хроматографії нерухомою фазою є:*

A. Спеціальні види паперу

B. Хроматографічна камера

C. Пластинка для тонкошарової хроматографії

D. Папір канцелярський

30. *Паперова хроматографія — це метод поділу та аналізу суміші речовин, який заснований на тому, що:*

A. Використовується нерухома фаза, що являє собою спеціальні види паперу (хроматографічний папір), рухома фаза рідка і є сумішшю розчинників

B. Нерухома фаза нанесена тонким шаром на скляну, пластикову або алюмінієву підкладку (підкладку), рухома фаза рідка і є сумішшю розчинників

C. Нерухома фаза поміщена в хроматографічну колонку, рухома фаза рідка, подається під тиском

D. Нерухома фаза поміщена у хроматографічну колонку, а рухома фаза — газ, що подається під тиском

31. *Як називається спосіб виконання аналізу методом паперової хроматографії, де з хроматографічного паперу вирізають круг потрібного діаметра, в центр круга наносять розчин досліджуваної речовини, на крузі вирізають невелику смужку (гніт), смужку відгинають, поміщають у хроматографічну камеру з рухомою фазою?*

A. Кругове (радіальне) хроматографування

B. Одновимірне висхідне хроматографування

C. Одновимірне низхідне хроматографування

D. Двовимірне хроматографування

32. *Як називається спосіб виконання аналізу методом паперової хроматографії, де спочатку проводять аналіз в одному напрямку, потім перевертають папір на 90° проти годинникової стрілки та повторно проводять хроматографування?*

A. Кругове (радіальне) хроматографування
B. Одновимірне висхідне хроматографування
C. Одновимірне низхідне хроматографування
D. Двовимірне хроматографування

33. *Як називається спосіб виконання аналізу методом паперової хроматографії, де рухому фазу поміщають у спеціальну кювету, яка закріплена у верхній частині хроматографічної камери, хроматографічний папір занурюють у рухому фазу, розчинник переміщається донизу?*

A. Одновимірне низхідне хроматографування
B. Одновимірне висхідне хроматографування
C. Двовимірне хроматографування
D. Кругове (радіальне) хроматографування

34. *Як називається спосіб виконання аналізу методом паперової хроматографії, де рухому фазу поміщають у хроматографічну камеру, хроматографічний папір занурюють у рухому фазу, розчинник рухається вгору?*

A. Одновимірне висхідне хроматографування
B. Одновимірне низхідне хроматографування
C. Двовимірне хроматографування
D. Кругове (радіальне) хроматографування

35. *Для нанесення речовини на хроматографічний папір у методі паперової хроматографії використовують:*

A. Мікропіпетки, калібровані капіляри, мікрошприци
B. Автосамплер
C. Хроматографічну камеру
D. Аналітичні ваги

37. *Рухомою фазою у методі паперової хроматографії є:*

A. Розчинник або суміш розчинників
B. Спеціальні види паперу
C. Мікрошприц
D. Хроматографічна камера

МЕТОД ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

1. *Провізор під час дослідження компонентів лікарської субстанції як сорбент використовує іоніти. Який вид хроматографії застосовує аналітик?*

A. Тонкошарова
B. Газова
C. Паперова
D. Іонообмінна
E. Гель-фільтраційна

2. *Прилад, який використовують для контролю складу елюату, що витікає з колонки рідинного хроматографа, називається:*

A. Детектором
B. Насосом
C. Елюентом
D. Іонообмінником
E. Самописцем

3. *Детектор, який дозволяє визначати загальний показник заломлення системи проба — елюент, називається:*

A. Спектрофотометричний
B. Рефрактометричний
C. Кондуктометричний
D. Потенціометричний
E. Поляриметричний

4. *Для ідентифікації лікарського препарату в методі рідинної хроматографії використовують параметр:*

A. Час утримування
B. Периметр піка
C. Площа піка
D. Коефіцієнт утримування
E. Нічого із вищенаведеного

5. *Для ідентифікації лікарської субстанції аналітик використовує метод рідинної хроматографії. Як нерухома фаза у цьому методі виступає:*

A. Шар сорбенту, нанесений на пластину

B. Хроматографічний папір

C. Шар сорбенту, поміщений у колонку

D. Хлороформ

E. Активоване вугілля

6. *Для ідентифікації речовин у методі високоефективної рідинної хроматографії використовують такий параметр:*

A. Висота або площа піка

B. Час утримування речовини

C. Висота хроматографічного піка

D. Ширина хроматографічного піка

E. Коефіцієнт розподілу речовини

7. *Для реєстрації світлопоглинання аналітичної системи проба — елюент використовують детектор:*

A. Поляриметричний

B. Рефрактометричний

C. Флюорометричний

D. Електрохімічний

E. Фотометричний

8. *Графічне зображення роботи детектора у методі рідинної хроматографії називається:*

A. Схема

B. Спектр

C. Хроматограма

D. Діаграма

E. Хронограма

9. *У методі ВЕРХ з метою ідентифікації речовини використовують:*

A. Положення піка або час утримування

B. Висоту піка

C. Ширину піка

D. Швидкість рухомої фази

E. Площу піка

10. *У методі ВЕРХ на хроматограмі з метою кількісного визначення речовини використовують:*

A. Площу піка
B. Висоту піка
C. Швидкість рухомої фази
D. Положення піка

11. *Для ідентифікації лікарської речовини методом рідинної хроматографії визначають константу:*

A. Кут обертання
B. Показник заломлення
C. Електрорушійна сила
D. Час утримування речовини
E. Поглинання оптичної густини

12. *У методі ВЕРХ вміст речовини у досліджуваному лікарському засобі впливає:*

A. На кількість піків на хроматограмі
B. На час утримування
C. На площу хроматографічного піка
D. На форму піка
E. На об'єм утримування

13. *Обов'язковою частиною будь-якого хроматографа є інжектор. Його функції полягають:*

A. У сорбції компонентів проби
B. У детектуванні окремих компонентів проби
C. У випаровуванні компонентів проби
D. У розділенні речовин проби
E. У забезпеченні введення проби

14. *Для розділення сумішей речовин застосовують хроматографічний метод. Хроматографія — це метод аналізу, який базується на перерозподілі речовини між:*

A. Рухомою і нерухомою фазами
B. Рідкою і газовою фазами
C. Рідкою і твердою фазами
D. Двома рідкими фазами, які не змішуються між собою
E. Твердою і газовою фазами

15. *У ВЕРХ використовується ... нерухома фаза і ... рухома фаза*

A. Тверда, газоподібна
B. Тверда, рідка
C. Газоподібна, тверда
D. Рідка, газоподібна
E. Тверда, тверда

16. *За технікою виконання до колонкової хроматографії не належить:*

A. Адсорбційна хроматографія
B. ВЕРХ
C. Газова хроматографія
D. ТШХ
E. Іонообмінна хроматографія

17. *Якісною характеристикою речовини є:*

A. Число теоретичних тарілок
B. Час утримування або об'єм утримування
C. Ширина піка
D. Площа піка
E. Висота піка

18. *Час утримування — це …*

A. Відстань часу від моменту введення проби до моменту виходу максимуму піка
B. Відстань від моменту виходу компонента, який не сорбується, до моменту виходу досліджуваного компонента
C. Відстань від точки максимуму піка до нульової лінії
D. Відстань між точками піка на будь-якій висоті
E. Відстань між точками піка на половині висоти

19. *Висота хроматографічного піка — це …*

A. Відстань часу від момента введення проби до момента виходу максиму
B. Відстань від момента виходу компонента, який не сорбується, до момента виходу досліджуваного компонента
C. Відстань від точки максимуму піка до нульової лінії піка
D. Відстань між точками піка на будь-якій висоті
E. Відстань між точками піка на половині висоти

МЕТОДИ ІОННОЇ, ІОННООБМІННОЇ ТА ЕКСКЛЮЗІЙНОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

1. *Оберіть вид іонообмінної хроматографії, яка використовується для розділення позитивно заряджених іонів (катіонів):*

A. Катіонообмінна
B. Аніонообмінна
C. Афінна
D. Гідрофобна

2. *Що є основним компонентом у складі стаціонарної фази для катіонообмінної хроматографії?*

A. Полімерні матриці з негативно зарядженими групами
B. Полімерні матриці з позитивно зарядженими групами
C. Нейтральні полімери
D. Неорганічні сорбенти

3. *Який фактор найбільше впливає на селективність іонообмінної хроматографії*?

A. pH та іонна сила буферу
B. Температура колонки
C. В'язкість елюенту
D. Розчинність зразка

4. *Який тип зразків зазвичай аналізують за допомогою іонообмінної хроматографії?*

A. Іони металів та органічні кислоти
B. Полімерні матеріали
C. Нейтральні молекули
D. Газоподібні речовини

5. *Яка роль іонного обмінника в іонообмінній хроматографії?*

A. Розділення іонів зразка через взаємодію з іонними групами на поверхні
B. Підтримання постійної температури
C. Зниження тиску в колонці
D. Визначення складу елюенту

6. *Який тип іонообмінної хроматографії використовують для розділення аніонів?*

A. Аніонообмінна
B. Катіонообмінна
C. Афінна

D. Гель-фільтраційна

7. *Для зміни селективності іонообмінної хроматографії можна регулювати параметри:*

A. pH та концентрація елюенту
B. Розмір колонки
C. Молекулярна вага сорбенту
D. Тиск в колонці

8. *Яке завдання виконує супресор в іонообмінній хроматографії?*

A. Зниження шуму фонових сигналів та покращання чутливості детекції
B. Скорочення часу елюювання
C. Підвищення швидкості елюювання
D. Регулювання температури колонки

9. *Яка основна мета використання іонообмінної хроматографії в аналітичній хімії?*

A. Розділення іонів та молекул на основі їх заряду
B. Аналіз газів
C. Визначення молекулярної маси білків
D. Ідентифікація органічних сполук на основі їх властивостей

10. *Яка з нижченаведених речовин може бути елюентом в іонообмінній хроматографії?*

A. Буферний розчин
B. Етанол
C. Ацетон
D. Гексан

11. *Основний принцип роботи іонообмінної хроматографії полягає у використанні:*

A. Електростатичних взаємодій між іонами і сорбентом
B. Гравітаційних сил для розподілу компонентів
C. Відмінностей у гідрофобності молекул
D. Температурних градієнтів для розділення

12. *Найчастіше як носій у катіонному обміннику використовується:*

A. Полістирол
B. Целюлоза

C. Силікагель

D. Акрилат

13. *Найбільш важливим для ефективності іонообмінної хроматографії вважається показник:*

A. Кількість активних груп на сорбенті

B. Питома вага сорбенту

C. Розмір кульок сорбенту

D. Температурна стабільність сорбенту

14. *Зазвичай елюентом в іонообмінній хроматографії є:*

A. Водний буфер, в якому розчиняються вихідні речовини

B. Неполярний розчинник, який переносить зразок через колонку

C. Пластифікатор для полімерного носія

D. Полярний органічний розчинник, що сприяє поляризації вихідних речовин

15. *Для регенерації катіонної обмінної колонки зазвичай використовується речовина:*

A. Натрій хлорид

B. Етанол

C. Гліцерин

D. Азотна кислота

16. *Який тип іонів захоплюється на аніонообмінній колонці?*

A. Негативно заряджені іони (аніони)

B. Позитивно заряджені іони (катіони)

C. Нейтральні молекули

D. Полярні молекули

17. *Елюювання в іонообмінній хроматографії — це процес:*

A. Витіснення зв'язаних іонів з колонки

B. Заповнення колонки зразком

C. Регенерації сорбенту

D. Сушіння зразка

18. *Який фактор найменше впливає на ефективність іонообмінної хроматографії:*

A. Температура навколишнього середовища

B. Концентрація зразка

C. pH розчину

D. Іонна сила елюенту

19. *Який тип іонів захоплюється на катіонообмінній колонці:*

A. Позитивно заряджені іони (катіони)

B. Негативно заряджені іони (аніони)

C. Нейтральні молекули

D. Полярні молекули

20. *Який метод найчастіше використовується для детектування компонентів після іонообмінної хроматографії:*

A. Ультрафіолетова спектрофотометрія (UV)

B. Інфрачервона спектроскопія (IR)

C. Рентгенівська спектроскопія

D. Ядерний магнітний резонанс (NMR)

21. *Яка особливість іонообмінної хроматографії дозволяє ефективно розділяти органічні лікарські речовини?*

A. Здатність розділяти молекули за їх зарядом і полярністю

B. Використання високих температур для розділення

C. Здатність розділяти молекули за їх розміром

D. Використання органічних розчинників для елюювання

22. *Яка особливість іонообмінної хроматографії робить її корисною для аналізу білків?*

A. Можливість розділення білків за їх ізоелектричними точками (pI)

B. Використання органічних розчинників для елюювання

C. Розділення компонентів за розміром молекул

D. Висока температура колонок

23. *Який тип іонообмінної хроматографії найчастіше використовується для аналізу амінокислот?*

A. Катіонообмінна хроматографія

B. Аніонообмінна хроматографія

C. Афінна хроматографія

D. Гель-фільтраційна хроматографія

24. *Для аналізу білків іонообмінна хроматографія може бути поєднана з яким методом для більш точного визначення білкових компонентів:*

A. Мас-спектрометрією (MS)
B. Інфрачервоною спектроскопією (IR)
C. Ядерним магнітним резонансом (NMR)
D. Флуоресцентною спектроскопією

25. *Чому іонообмінна хроматографія є ефективною для аналізу антибіотиків?*

A. Здатність розділяти антибіотики за їх зарядом за різних pH
B. Використання високих температур для розділення
C. Здатність розділяти антибіотики за їх розміром
D. Використання неводних розчинників

26. *Який фактор найбільше впливає на розділення ензимів з допомогою іонообмінної хроматографії?*

A. Іонна сила буферу
B. Висока температура колонок
C. Використання органічних розчинників
D. Розмір сорбенту

27. *Для аналізу амінокислот іонообмінною хроматографією важливо використовувати:*

A. Буфер з відповідним pH для іонізації амінокислот
B. Високотемпературний елюент
C. Органічний розчинник для розчинення амінокислот
D. Полярний сорбент

28. *Який метод детекції найчастіше використовується після іонообмінної хроматографії для аналізу антибіотиків?*

A. Ультрафіолетова спектрофотометрія (UV)
B. Інфрачервона спектроскопія (IR)
C. Ядерний магнітний резонанс (NMR)
D. Рентгенівська спектроскопія

29. *Яка перевага використання іонообмінної хроматографії для аналізу ензимів?*

A. Висока селективність і здатність розділяти ензими з близькими ізоелектричними точками (pI)
B. Можливість аналізу за високих температур

C. Використання неводних розчинників

D. Швидкий час аналізу

30. *Для аналізу білків іонообмінною хроматографією важливо вибирати:*

A. Буфер з pH, близьким до ізоелектричної точки білка

B. Висококонцентровані органічні розчинники

C. Нейтральний буфер

D. Сорбент з високою температурною стабільністю

31. *Який тип іонообмінної хроматографії найчастіше використовується для аналізу ензимів?*

A. Аніонообмінна хроматографія

B. Катіонообмінна хроматографія

C. Афінна хроматографія

D. Гель-фільтраційна хроматографія

МЕТОД ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

1. *Розділення речовин методом газової хроматографії відбувається за рахунок різної швидкості руху речовин у колонці. Що є рухомою фазою у цьому методі аналізу?*

A. Газ-носій

B. Тверда речовина

C. Розчинник

D. Вода

2. *Методом газової хроматографії можна аналізувати речовини:*

A. Леткі

B. Термолабільні

C. З молекулярною масою понад 500

D. Будь-які

3. *Як газ-носій НЕ може бути використаний:*

A. Хлор

B. Гелій

C. Азот

D. Водень

4. *Оберіть помилкове твердження:*

A. Газова хроматографія потребує великої кількості досліджуваної сполуки
B. Газова хроматографія є швидким та ефективним методом
C. Газова хроматографія дозволяє аналізувати складні суміші
D. Газова хроматографія використовується для аналізу термостабільних сполук

5. *Оберіть твердження, що відповідає ізотермічному методу аналізу:*

A. Упродовж дослідження підтримується стала температура
B. Температура збільшується поступово
C. Аналіз починається за низької температури
D. Застосовується, якщо у компонентів зразка широкий діапазон температур кипіння

6. *Від чого не залежить розділення сполук методом газової хроматографії?*

A. Тип детектування
B. Спорідненість досліджуваної сполуки з нерухомою фазою
C. Температура кипіння сполуки
D. Температура в колонці

7. *Дериватизація — це:*

A. Процес, за якого речовина хімічно модифікується, утворюючи нову сполуку, яка має необхідні властивості
B. Процес розділення суміші сполук на окремі компоненти
C. Процес детектування в хроматографії
D. Процес руйнування речовини в ході аналізу

8. *У газовій хроматографії використовуються такі види колонок:*

A. Насадкові та капілярні
B. Лише насадкові
C. Лише капілярні
D. Немає правильної відповіді

9. *Програмований температурний режим — це:*

A. Поступове збільшення температури відповідно до програми аналізу
B. Підтримання сталої температури впродовж аналізу
C. Відсутність нагрівання
D. Різка зміна температури під час аналізу

10. *Температурний режим аналізу в газовому хроматографі забезпечує:*

A. Термостат
B. Колонка

C. Детектор
D. Інжектор

11. *Розділення речовин у газовому хроматографі відбувається:*

A. У колонці
B. В інжекторі
C. У детекторі
D. У термостаті

12. *Оберіть характеристики капілярної колонки для газової хроматографії:*

A. Внутрішній діаметр 0,15–0,53 мм, довжина 15–100 м
B. Внутрішній діаметр 2–4 мм, довжина 1–10 м
C. Внутрішній діаметр 10–15 мм, довжина 5–10 м
D. Внутрішній діаметр 2–4 мм, довжина 1–5 м

13. *До різновидів капілярних колонок не належать колонки:*

A. Насадкові
B. WCOT
C. SCOT
D. FSWC

14. *Make-up газ у газовій хроматографії — це:*

A. Газ, що додається до досліджуваних сполук на виході з хроматографічної колонки, та дозволяє мінімізувати мертвий об'єм під час детектування і забезпечити ефективну передачу аналізованих сполук на детектор, це:
B. Хімічно інертна рухома фаза
C. Газ, що додається у систему за необхідності
D. Газ-носій

15. *У газовій хроматографії не використовують такий тип дериватизації:*

A. Гетероциклізація
B. Ацилювання
C. Алкілювання
D. Силілування

16. *Газова хроматографія — це хроматографічний метод аналізу, в якому:*

A. Рухомою фазою є газ
B. Рухомою фазою є рідина
C. Рухомою фазою є тверда речовина
D. Нерухомою фазою є газ

РОЗДІЛ 2

ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ У НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Тема 7. ФАРМАКОПЕЙНІ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ ДЛЯ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

7.1. МЕТОДИКА ІДЕНТИФІКАЦІЇ СУБСТАНЦІЇ ВАНІЛІНУ МЕТОДОМ ТШХ

Випробовуваний розчин. 10 мг субстанції розчиняють у розчині 10,3 г/л *хлористоводневої кислоти Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчином до 50 мл.

Розчин порівняння. 10 мг ФСЗ валіну розчиняють у розчині 10,3 г/л *хлористоводневої кислоти Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчином до 50 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: *оцтова кислота льодяна Р — вода Р — бутанол Р* (20:20:60).

Об'єм проб: 5 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 2/3 довжини пластинки.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обприскують *нінгідрину розчином Р* і нагрівають за температури 105 °С протягом 15 хв.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину має проявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром і забарвленням.

7.2. МЕТОДИКА ІДЕНТИФІКАЦІЇ СУБСТАНЦІЇ ГІДРОКОРТИЗОНУ АЦЕТАТУ МЕТОДОМ ТШХ

Випробовуваний розчин (a). 25 мг субстанції розчиняють у *метанолі Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл (розчин А). 2 мл одержаного розчину доводять *метиленхлоридом Р* до об'єму 10 мл.

Випробовуваний розчин (b). 2 мл розчину А переносять у пробірку місткістю 15 мл із притертою скляною пробкою або політетрафторетиленовою кришкою, додають 10 мл *калію гідрокарбонату розчину насиченого метанольного Р* і відразу пропускають крізь розчин потік *азоту Р* протягом 5 хв. Пробірку закривають, нагрівають у водяній бані за температури 45 °С, у захищеному від світла місці протягом 2 год 30 хв та охолоджують.

Розчин порівняння (a). 25 мг ФСЗ гідрокортизону ацетату розчиняють у *метанолі Р* доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл (розчин В). 2 мл одержаного розчину доводять *метиленхлоридом Р* до об'єму 10 мл.

Розчин порівняння (*b*). 2 мл розчину В переносять у пробірку місткістю 15 мл із притертою скляною пробкою або політетрафторетиленовою кришкою. Додають 10 мл калію гідрокарбонату розчину насиченого *метанольного Р* і відразу пропускають крізь розчин потік *азоту Р* протягом 5 хв. Пробірку закривають, нагрівають у водяній бані за температури 45 °С у захищеному від світла місці протягом 2 год 30 хв і охолоджують.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю F254 Р.

Рухома фаза: до суміші *вода Р — метанол Р* (1.2:8) додають суміш *ефір Р* — метиленхлорид (15:77).

Об'єм проб: 5 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 3/4 довжини пластинки.

Висушування: на повітрі.

Виявлення А: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Результати А: на хроматограмах *випробовуваних розчинів (a) і (b)* має проявлятися основна пляма нарівні основної плями на хроматограмах *розчинів порівняння (a) і (b),* відповідна їй за розміром.

Виявлення В: обприскують *сірчаної кислоти розчином спиртовим Р,* нагрівають за температури 120 °С протягом 10 хв або до появи плям. Пластинку охолоджують і переглядають у денному світлі та в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати В: на хроматограмах *випробовуваних розчинів (a) і (b)* має проявлятися основна пляма нарівні основної плями на хроматограмах *розчинів порівняння (a) і (b),* відповідна їй за забарвленням у денному світлі та за флуоресценцією в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм і розміром. R_f основних плям на хроматограмах *випробовуваного розчину (b)* і *розчину порівняння (b)* мають бути значно менше R_f основних плям на хроматограмах *випробовуваного розчину (a)* і *розчину порівняння (a).*

7.3. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСТОТИ СУБСТАНЦІЇ ГЛІЦИНУ МЕТОДОМ ТШХ (РЕЧОВИНИ, ЩО ВИЯВЛЯЮТЬСЯ НІНГІДРИНОМ)

Випробовуваний розчин (a). 0,10 г субстанції розчиняють у *воді Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл.

Випробовуваний розчин (b). 1,0 мл *випробовуваного розчину (a)* доводять *водою Р* до об'єму 10,0 мл.

Розчин порівняння (a). 10 мг ФСЗ гліцину розчиняють у *воді Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл.

Розчин порівняння (b). 1,0 мл *випробовуваного розчину (a)* доводять *водою Р* до об'єму 200 мл.

Розчин порівняння (c). 10 мг ФСЗ гліцину та 10 мг ФСЗ аланіну розчиняють у *воді Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25 мл.

Пластинка: целюлоза для хроматографії Р як тонкий шар.

Рухома фаза: *оцтова кислота льодяна Р — вода Р — бутанол Р (20:20:60).*

Об'єм проб: 5 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 2/3 довжини пластинки.

Висушування: за температури 80 °С протягом 30 хв.

Виявлення: обприскують *нінгідрину розчином Р* і витримують за температури від 100 до 105 °С протягом 15 хв.

Придатність хроматографічної системи: на хроматограмі розчину порівняння (c) проявляються дві чітко розділені плями.

Нормування: хроматограма *випробовуваного розчину(a):* будь-яка домішка: будь-яка пляма, крім основної, має бути не інтенсивнішою за пляму на хроматограмі *розчину порівняння (b)* (0.5 %).

7.4. МЕТОДИКА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСТОТИ СУБСТАНЦІЇ ІНУЛІНУ МЕТОДОМ ТШХ

Випробовуваний розчин (a). До 0,2 г субстанції додають 0,8 г *щавлевої кислоти Р,* додають 10 мл гарячої води Р, розчиняють, перемішуючи. Нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджують, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

Випробовуваний розчин (b). До 0,2 г субстанції додають 10 мл *гарячої води Р,* розчиняють, перемішуючи, охолоджують, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

Розчин порівняння (a). 0,1 г *ФСЗ ДФУ фруктози* розчиняють у 10 мл *води Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 20 мл.

Розчин порівняння (b). 0,1 г *ФСЗ ДФУ глюкози моногідрату* розчиняють у 10 мл *води Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 20 мл.

Розчин порівняння (c). 0,1 г *ФСЗ ДФУ сахарози* розчиняють у 10 мл *води Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 20 мл.

Розчин порівняння (d). 0,1 г *ФСЗ ДФУ лактози моногідрату* розчиняють у *10 мл води Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 20 мл.

Розчин порівняння (e). По 0,1 г *ФСЗ ДФУ фруктози, ФСЗ ДФУ глюкози моногідрату, ФСЗ ДФУ сахарози і ФСЗ ДФУ лактози моногідрату* розчиняють у 10 мл води Р і доводять об'єм розчину *водою Р* до 20 мл.

Розчин порівняння (f). 0,2 г ФСЗ ДФУ мальтодекстрину розчиняють у 10 мл *води Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 20 мл.

Пластинка: *ТШХ-пластинка із шаром силікагелю Р.* Пластинку занурюють (у разі алюмінієвої підкладки пластинки) або обприскують (у разі скляної підкладки пластинки) розчином *3 г/л натрію ацетату Р,* висушують у потоці теплого повітря. Активують у сушильній шафі за температури від 100 до 105 °С протягом 15 хв.

Рухома фаза: *вода Р — хлороформ Р — оцтова кислота льодяна Р (10:60:70).* Точно відмірюють об'єми компонентів суміші, тому що невеликий надлишок води призводить до помутніння.

Нанесення: 5 мкл, смугами 10 мм, ретельно висушуючи зони на лінії старту.

Відстань А, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування А: у потоці теплого повітря протягом декількох хвилин. Відстань В, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту, використовуючи ту саму рухому фазу.

Висушування В: у потоці теплого повітря протягом декількох хвилин.

Виявлення: обприскують сумішшю, приготованою так: 2 мл *аніліну Р* і 2 мл *дифеніламіну Р* розчиняють у 100 мл *метанолу Р*, додають 15 мл *фосфорної кислоти Р* і перемішують; пластинку нагрівають за температури 130 °С протягом 10 хв.

Придатність хроматографічної системи: *розчин порівняння (e):* на хроматограмі мають проявлятися 4 чітко розділені зони.

Результати:

— на хроматограмі *випробовуваного розчину (a)* мають проявлятися дві зони на рівні основних зон на хроматограмах *розчинів порівняння (a) і (b);*

— на хроматограмі *випробовуваного розчину (b)* має проявлятися зона коричневого кольору на лінії старту, можуть проявлятися й інші хроматографічні зони, зокрема зони, що відповідають зонам на хроматограмі *розчинів порівняння (c) і (d),* але не мають проявлятися зони, що відповідають зонам на хроматограмі *розчину порівняння (f).*

7.5. МЕТОДИКА ІДЕНТИФІКАЦІЇ МАРКЕРНИХ РЕЧОВИН ГЛОДУ КВІТКИ ТА ЛИСТЯ МЕТОДОМ ТШХ

Випробовуваний розчин. До 1,0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл *метанолу Р,* нагрівають у водяній бані за температури 65 °С зі зворотним холодильником протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 1,0 мг *хлорогенової кислоти Р* і 2,5 мг *гіперозиду Р* розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: мурашина кислота безводна Р — вода Р — метилетилкетон Р — етилацетат Р (10:10:30:50).

Об'єм проб: 20 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: за температури (100–105) °С.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л *дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р у метанолі Р,* потім обприскують розчином 50 г/л *макроголу 400 Р у метанолі Р,* сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: на рис. 7.1 наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть проявлятися також інші флуоресційні зони.



Рис. 7.1. Послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину

7.6. МЕТОДИКА ІДЕНТИФІКАЦІЇ МАРКЕРНИХ РЕЧОВИН ГЛОДУ ПЛОДИ МЕТОДОМ ВЕТШХ

Високоефективна тонкошарова хроматографія (2.8.25)

Випробовуваний розчин. До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 5.0 мл *метанолу Р,* обробляють ультразвуком протягом 15 хв, фільтрують або центрифугують і використовують фільтрат або надосадову рідину.

Розчин порівняння (a). 2.5 мг *гіперозиду Р* і 3.5 мг *рутозиду тригідрату Р* розчиняють у *метанолі Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

Розчин порівняння (b). 2.5 мл *розчину порівняння (a)* доводять *метанолом Р* до об'єму 10.0 мл.

Розчин порівняння (c). 2.5 мг *гіперозиду Р* і 3 мг *хлорогенової кислоти Р* розчиняють у *метанолі Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Маркер інтенсивності: гіперозид.

Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силікагелю F_{254} Р (2–10 мкм).

Рухома фаза: мурашина кислота безводна Р — вода Р — етилацетат Р (10:10:80).

Нанесення: 4 мкл, смугами 8 мм.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 70 мм від нижнього краю пластинки.

Висушування: у потоці повітря за кімнатної температури протягом 5 хв.

Виявлення: нагрівають за температури від 100 до 105 °С протягом 5 хв, теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л *дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р* у *метанолі Р,* потім розчином 50 г/л *макроголу 400 Р* у *метанолі Р* або, як альтернатива, занурюють теплу пластинку в розчин 5 г/л *дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р в етилацетаті Р*, потім у розчин 50 г/л *макроголу 400 Р у метиленхлориді Р.* Пластинку сушать на повітрі протягом 1 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (с):

— на хроматограмі проявляються дві чіткі зони в середній третині хроматограми, які можуть стикатися; нижня зона (хлорогенова кислота) проявляється як блакитна флуоресційна зона, верхня зона (гіперозид);

— як жовта або оранжева флуоресційна зона.

Результати: нижче наведена послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння (а) та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину також можуть проявлятися інші слабкі сині, зеленуваті, жовті або оранжеві флуоресційні зони.

Верхня частина пластинки	
	1 або 2 сині зони, від дуже слабких до слабких
гіперозид: жовта або оранжева зона	жовта або оранжева зона, від дуже слабкої до слабкої жовта або оранжева зона, від слабкої до еквівалентної (гіперозид) блакитна зона, слабка (хлорогенова кислота)
рутозид: жовта або оранжева зона	жовта або оранжева зона, дуже слабка (рутозид)
Розчин порівняння (а)	**Випробовуваний розчин**

Рис. 7.2. Послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину

7.7. МЕТОДИКА ІДЕНТИФІКАЦІЇ МАРКЕРНИХ РЕЧОВИН КАСІЇ ПЛОДИ МЕТОДОМ ВЕТШХ

Високоефективна тонкошарова хроматографія (2.8.25)

Суміш розчинників. Етанол (96 %) P — вода P (50:50).

Випробовуваний розчин. До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 5.0 мл суміші розчинників, обробляють ультразвуком протягом 10 хв, фільтрують або центрифугують і використовують фільтрат або над осадову рідину.

Розчин порівняння (a). 3 мг *сенозиду A P* і 3 мг *сенозиду B P* розчиняють у суміші рівних об'ємів *етанолу (96 %) P* і розчину 1 г/л *натрію гідрокарбонату P*, доводять тією самою сумішшю до об'єму 20.0 мл.

Розчин порівняння (b). 2.5 мл розчину порівняння (a) доводять сумішшю розчинників до об'єму 10.0 мл.

Розчин порівняння (c). 10 мг ФСЗ касії екстракту розчиняють в 1 мл суміші розчинників (залишається невелика кількість не розчинених частинок).

Маркер інтенсивності: сенозид A.

Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силікагелю F254 P (2–10 мкм).

Рухома фаза: вода P — етилацетат P — пропанол P (30:40:40).

Нанесення: 1 мкл випробовуваного розчину і 2 мкл *розчинів порівняння (a), (b) і (c),* смугами 8 мм.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 70 мм від нижнього краю пластинки.

Висушування: у потоці повітря за кімнатної температури протягом 5 хв.

Виявлення: нагрівають за температури 110 °C протягом 10 хв, теплу пластинку обробляють розчином 50 г/л *калію гідроксиду P* у суміші розчинників, нагрівають за температури 110 °C протягом 10 хв і відразу переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (c):

— на хроматограмі проявляються дві чіткі зони на межі між нижньою та середньою третиною хроматограми, які можуть стикатися; нижня зона (сенозид A) проявляється як світло-жовта флуоресційна зона, верхня зона (сенозид D);

— як слабка коричнювато-жовта флуоресційна зона.

Результати: нижче наведена послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння (a) та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину

також можуть проявлятися інші сині й/або червонуваті зони, переважно над зоною сенозиду А. Для сенозидів значення R_f незначно варіює і зони можуть бути вигнуті залежно від концентрації.

Верхня частина пластинки	
	світло-жовта зона, від дуже слабкої до слабкої (сенозид С) коричнювато-жовта зона, слабка (сенозид D)
сенозид А: світло-жовта зона	світло-жовта зона, від еквівалентної до інтенсивної (сенозид А)
сенозид В: коричнювато-жовта зона	коричнювато-жовта зона, інтенсивна (сенозид В)
Розчин порівняння (а)	**Випробовуваний розчин**

Рис. 7.3. Послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину

7.8. МЕТОДИКА ІДЕНТИФІКАЦІЇ МАРКЕРНИХ РЕЧОВИН КУЛЬБАБИ ЛІКАРСЬКОЇ КОРЕНІВ МЕТОДАМИ ТШХ ТА ВЕТШХ

Примітка. Умови проведення методики методом високоефективної тонкошарової хроматографії наводяться у дужках.

Випробовуваний розчин. До 2,0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл *метанолу Р,* нагрівають у водяній бані за температури 60 °С або обробляють ультразвуком протягом 10 хв, охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 2 мг *хлорогенової кислоти Р* і 2 мг *рутину Р* розчиняють у *метанолі Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

Пластинка: *ТШХ пластинка із шаром силікагелю F_{254} Р* ((5–40) мкм) (або *ТШХ пластинка із шаром силікагелю F_{254} Р* (2–10) мкм)).

Рухома фаза: мурашина кислота безводна Р — вода Р — етилацетат Р (10:10:80).

Об'єм проб: 20 мкл (або 5 мкл), смугами 10 мм (або 8 мм).

Відстань, що має пройти рухома фаза: 12 см (або 7 см) від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: нагрівають за температури 100 °С протягом 5 хв; обприскують або занурюють на короткий час у розчин 10 г/л *дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р у метанолі Р,* висушують за температури 100 °С протягом 5 хв; обприскують або занурюють на короткий час у розчин 50 г/л *макроголу 400 Р у метанолі Р,* нагрівають за температури 100 °С протягом 5 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: на рис. 7.4 наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть проявлятися також інші слабкі зони.

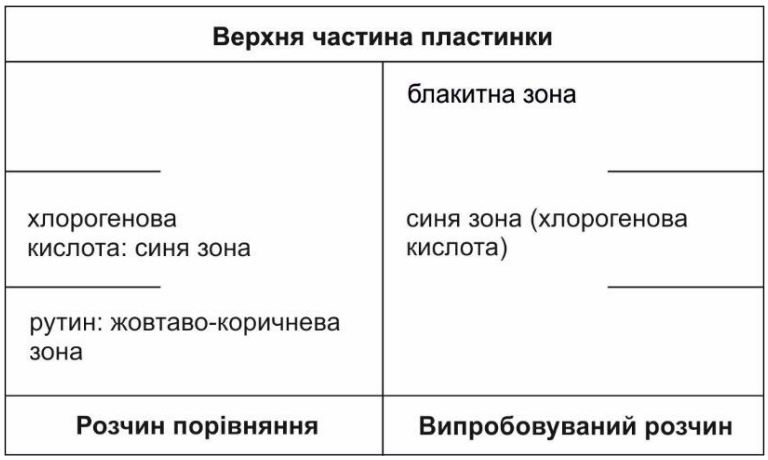


Рис. 7.4. Послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину

7.9. МЕТОДИКА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУБСТАНЦІЇ АЗИТРОМІЦИНУ МЕТОДОМ ВЕРХ

Розчин А. Суміш *ацетонітрил Р1 — розчин 6,7 г/л дикалію гідрофосфату Р* (60:40), pH якої доводять до 8,0 *фосфорною кислотою Р.*

Випробовуваний розчин. 53,0 мг субстанції розчиняють у 2 мл *ацетонітрилу Р1* і доводять *розчином А* до об'єму 100,0 мл.

Розчин порівняння (a). 53,0 мг ФСЗ азитроміцину розчиняють у 2 мл *ацетонітрилу Р1* і доводять *розчином А* до об'єму 100,0 мл.

Розчин порівняння (b). 5 мг субстанції і 5 мг ФСЗ азитроміцину домішки А розчиняють у 0,5 мл *ацетонітрилу Р1* і доводять розчином А до об'єму 10 мл.

Колонка:

— розмір: 0,25 м × 4,6 мм;

— нерухома фаза: *вінілполімер для хроматографії, октадецилсилільний Р* (5 мкм);

— температура: 40 °С.

Рухома фаза: суміш *ацетонітрил Р1 — розчин 6,7 г/л дикалію гідрофосфату Р (60:40),* pH якої доводять до 11,0 розчином 560 г/л *калію гідроксиду Р.*

Швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 210 нм.

Інжекції: 10 мкл.

Час хроматографування: у 1,5 разу більший за час утримування азитроміцину.

Час утримування: азитроміцину — близько 10 хв.

Придатність хроматографічної системи: *розчин порівняння (b):* ступінь розділення: не менше 3,0 між піками домішки А й азитроміцину. Вміст $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, у відсотках, розраховують, використовуючи зазначений вміст азитроміцину у ФСЗ азитроміцину.

7.10. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ СУПРОВІДНИХ ДОМІШОК СУБСТАНЦІЇ АМПІЦИЛІНУ БЕЗВОДНОГО МЕТОДОМ ВЕРХ

Випробовуваний розчин (a). 27,0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50,0 мл.

Випробовуваний розчин (b). 27,0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 10,0 мл. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин порівняння (a). 27,0 мг ФСЗ ампіциліну безводного розчиняють у *рухомій фазі А* та доводять об'єм розчину *рухомою фазою А* до 50,0 мл.

Розчин порівняння (b). 2,0 мг ФСЗ цефрадину розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину *рухомою фазою А* до 50 мл. До 5,0 мл одержаного розчину додають 5,0 мл розчину порівняння (а).

Розчин порівняння (c). 1,0 мл розчину порівняння (a) доводять *рухомою фазою A* до об'єму 20,0 мл.

Колонка:

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: *силікагель для хроматографії, октадецилсилільний P (5 мкм).*

Рухома фаза:

— рухома фаза A: суміш 0,5 мл *оцтової кислоти розведеної P,* 50 мл *калію дигідрофосфату 0,2 M розчину P* і 50 мл *ацетонітрилу P,* доведена *водою P* до об'єму 1000 мл;

— рухома фаза B: суміш 0,5 мл *оцтової кислоти розведеної P,* 50 мл калію дигідрофосфату 0,2 M *розчину P* і 400 мл *ацетонітрилу P,* доведена *водою P* до об'єму 1000 мл.

Час (хв)	Рухома фаза A *(% об/об)*	Рухома фаза B *(% об/об)*
0–t_R	85	15
t_R–(t_R + 30)	85 → 0	15 → 100
(t_R + 30)–(t_R + 45)	0	100
(t_R + 45)–(t_R + 60)	85	15

Примітка. t_R — час утримування ампіциліну, визначений під час хроматографування *розчину порівняння (c).*

Якщо склад рухомої фази було змінено для досягнення необхідного розділення, змінений склад використовують за нульового часу в градієнті та кількісному визначенні.

Швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

Інжекції: 50 мкл *розчину порівняння (b)* і 50 мкл *розчину порівняння (c)* в ізократичному режимі за вихідного складу рухомої фази, 50 мкл *випробовуваного розчину (b)* в градієнті як описано для рухомої фази; як контрольний дослід хроматографують рухому фазу A у градієнті.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (b): ступінь розділення: не менше 3,0 між піками ампіциліну та цефрадину; якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз A і B.

Нормування: будь-яка домішка: площа піка домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі *розчину порівняння (c)* (1,0 %).

7.11. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ОРГАНІЧНИХ РОЗЧИННИКІВ (АЦЕТОНІТРИЛУ) В СУБСТАНЦІЇ ФЛУОКСЕТИНУ ГІДРОХЛОРИДУ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Випробовуваний розчин. 50 мг субстанції розчиняють у *диметилформаміді Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5,0 мл.

Розчин порівняння. До 1,0 г *ацетонітрилу Р* додають *диметилформамід Р*, перемішують і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 1,0 мл одержаного розчину доводять *диметилформамідом Р* до об'єму 1000,0 мл.

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: 30 м × 0,53 мм;

— нерухома фаза: макрогол 20000 Р (товщина шару 1 мкм).

Газ-носій: *гелій для хроматографії Р.*

Швидкість газу-носія: 10 мл/хв.

Температура:

	Час (хв)	Температура (°С)
Колонка	0–2	35
	2–14,33	35–220
	14,33–24,33	220
Блок вводу проб		250
Детектор		250

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Інжекції: 1 мкл; хроматографують *диметилформамід Р* як холостий розчин.

На хроматограмі *диметилформаміду Р* не має проявлятися пік із часом утримування ацетонітрилу.

Нормування: ацетонітрил: площа піка не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі *розчину порівняння* (0,1 %).

7.12. МЕТОДИКА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ІЗОПРОПІЛМІРИСТАТУ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Розчин внутрішнього стандарту. 50,0 мг *трикозану Р* розчиняють у *гептані Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 250,0 мл.

Випробовуваний розчин. 20,0 мг субстанції розчиняють у розчині внутрішнього стандарту та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл.

Розчин порівняння. 20,0 мг *ФСЗ ізопропілтетрадеканоату* розчиняють у розчині внутрішнього стандарту та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл.

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: 50 м × 0,2 мм;

— *нерухома фаза; полі(ціанопропіл)силоксан Р* (товщина шару 0,2 мкм).

Газ-носій: *гелій для хроматографії Р.*

Лінійна швидкість газу-носія: 1 мл/хв.

Поділ потоку: 1:40.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 2 мкл.

Вміст субстанції обчислюють у відсотках.

7.13. МЕТОДИКА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕФІРНИХ ОЛІЙ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Хроматографічний профіль. Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція цитронелової олії.

Розчин порівняння. 25 мкл *лимонену Р*, 100 мкл *цитронелалю Р*, 25 мкл *цитронелілацетату Р*, 25 мкл *цитралю Р*, 25 мкл *геранілацетату Р*, 25 мкл *цитронелолу Р* і 100 мкл *гераніолу Р* розчиняють у 5 мл *гексану Р.*

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: 60 м × 0,25 мм,

— нерухома фаза: *макрогол 20000 Р* (0,2 мкм).

Газ-носій: гелій для хроматографії Р.

Швидкість газу-носія: 1,0 мл/хв.

Поділ потоку: 1:100.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм інжекції: 1 мкл розчину порівняння, 0,2 мкл випробовуваного розчину.

Порядок виходу піків: має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Відмічають часи утримування цих субстанцій.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння: коефіцієнт розділення: не менше 1,2 для піків геранілацетату та цитронелолу.

Використовуючи часи утримування, визначені з хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів на хроматограмі випробовуваного розчину.

Визначають вміст кожного компонента, у %.

Вміст компонентів, у %, має лежати у таких межах:

— лимонен: від 1,0 до 5,0 %
— цитронелол: від 30,0 до 45,0 %
— цитронелілацетат: від 2,0 до 4,0 %
— нерал: менше 2,0 %
— гераніол: менше 2,0 %
— гераніалацетат: від 3,0 до 8,0 %
— цитронелол: від 9,0 до 15,0 %
— гераніол: від 20,0 до 25,0 %.

7.14. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСТОТИ АНІСОВОЇ ОЛІЇ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Фенхон. Газова хроматографія (2.2.28). Хроматографування проводять за умов, описаних у випробуванні на хроматографічний профіль, з такими змінами.

Випробовуваний розчин. 400 мкл субстанції розчиняють у 2.0 мл *гексану Р.*

Розчин порівняння (а). 10 мкл *Фенхону Р* доводять *гексаном Р* 1.2 г.

Розчин порівняння (б). 100 мкл розчину порівняння (а) доводять *гексаном Р* до об'єму 100 мл.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (б):

— співвідношення сигнал/шум; не менше 10 для основного піка.

Нормування:

— фенхон: не більше 0.01 %.

Фенікулін. Газова хроматографія (2.2.28). Хроматографування проводять за умов, описаних у випробуванні на хроматографічний профіль, з такими змінами.

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція.

Розчин порівняння (а). 10 мг випробовуваного розчину доводять *гексаном Р* до 1.000 г. 0.5 мл одержаного розчину доводять *гексаном Р* до об'єму 100 мл.

Розчин порівняння (б). ФСЗ фенікуліну для ідентифікації піка.

Придатність хроматографічної системи:

— хроматограма розчину порівняння (б) має відповідати хроматограмі, що прикладається до ФСЗ фенікуліну для ідентифікації піка;

— співвідношення сигнал/шум: не менше 10 для основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а).

Нормування: положення піка фенікуліну має відповідати хроматограмі, що прикладається до ФСЗ фенікуліну для ідентифікації піка.

— фенікулін: не більше 0.01 %.

Хроматографічний профіль. Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.

Випробовуваний розчин. 200 мкл субстанції розчиняють в 1.0 мл *гексану Р.*

Розчин порівняння. До 1.0 мл *гексану Р* додають 20 мкл *ліналолу Р*, 20 мкл *естраголу Р*, 20 мкл *α-терпінеолу Р*, 60 мкл *анетолу Р* і 30 мкл *анісового альдегіду Р.*

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: 30 м х 0.25 мм;

— нерухома фаза: макрогол 20000 Р (товщина шару 0.25 мкм).

Газ-носій: гелій для хроматографії Р.

Лінійна швидкість газу-носія: 1.0 мл/хв.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 0.2 мкл.

Порядок виходу піків: має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Відмічають години утримування цих субстанцій.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

— коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для піків естраголу та а-терпінеолу.

Використовуючи години утримування, визначені з хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину та положення цис-анетолу та псевдоізоевгеніл 2-метилбутирату на хроматограмі (не враховують пік гексану).

Вміст компонентів у відсотках має знаходитись у таких межах:

— ліналол; менше 1.5 %;

— естрагол: від 0.5 % до 5.0 %;

— а-терпінеол: менше 1.2 %;

— цис-анетол: від 0.1 % до 0.4 %;

— транс-анетол: від 87 % до 94 %;

— анісовий альдегід: від 0.1 % до 1.4 %;

— псевдоізоевгеніл 2-метилбутират: від 0.3 до 2.0 %.

7.15. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ СУПРОВІДНИХ ДОМІШОК АЦЕТОНУ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Супровідні домішки. (2.2.28). Газова хроматографія.

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція.

Розчин порівняння (а). До 0.5 мл *метанолу Р* додають 0.5 мл *2-пропанолу Р* і доводять об'єм розчину випробовуваним розчином до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять випробовуваним розчином до об'єму 10.0 мл.

Розчин порівняння (б). 100 мкл *бензолу Р* доводять випробовуваним розчином до 100.0 мл. 0.20 мл одержаного розчину доводять випробовуваним розчином до 100.0 мл.

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: 50 м х 0.3 мм;

— нерухома фаза: макрогол 20000 Р (товщина шару 1 мкм).

Газ-носій: гелій для хроматографії Р.

Лінійна швидкість газу-носія: 21 см/с.

Поділ потоку: 50:1.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 1 мкл.

Час утримування домішки С: близько 7.5 хв.

Придатність хроматографічної системи:

— коефіцієнт розділення: не менше 5.0 для піків домішки А (2 пік) і домішки В (3 пік) на хроматограмі розчину порівняння (а);

— співвідношення сигнал/шум; не менше 5 для піка домішки С на хроматограмі розчину порівняння (б).

Нормування:

— домішки А, В: площа піка кожної домішки не має перевищувати різницю між площею відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) і площею відповідного піка на хроматограмі випробовуваного розчину (0.05 % об/об);

— домішка С. площа піка не має перевищувати різницю між площею домішки С на хроматограмі розчину порівняння (б) і площею відповідного піка на хроматограмі випробовуваного розчину;

— будь-яка інша домішка: площа піка не має перевищувати різницю між площею піка домішки А на хроматограмі розчину порівняння (а) і площею відповідного піка на хроматограмі випробовуваного розчину (0.05 % об/об).

7.16. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ДОМІШКИ А ТА СУПРОВІДНИХ ДОМІШОК ГЛІЦЕРИНУ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Домішка А та супровідні домішки. Газова хроматографія (2.2.28).

Випробовуваний розчин. 10.0 мл розчину S доводять *водою Р* до об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння (а). 10.0 *гліцерину Р1* доводять *водою Р* до об'єму 20.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять *водою Р* об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння (б). 1.000 г *діетиленгліколю Р* розчиняють у *воді Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

Розчин порівняння (с). 1.0 мл розчину порівняння (б) доводять розчином порівняння (а) до об'єму 10.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять розчином порівняння (а) до об'єму 20.0 мл.

Розчин порівняння (д). 1.0 мл випробовуваного розчину змішують 35.0 мл розчину порівняння (б) і доводять об’єм розчину *водою Р* до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять *водою Р* до об'єму 10.0 мл.

Розчин порівняння (е). 5.0 мл розчину порівняння (б) доводять *водою Р* до об'єму 100.0 мл.

Колонка:

— розмір: 30 м х 0.53 мм;

— нерухома фаза: суміш поліціанопропілфенілсилоксану (6 %) та полідиметилсилоксану (94 %);

— газ-носій: гелій для хроматографії Р.

Поділ потоку: l:10.

Лінійна швидкість газу-носія: 38 см/с.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 0,5 мкл.

Порядок виходу піків: домішка А, гліцерин.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (d):

— коефіцієнт розділення; не менше 7.0 для піків домішки А та гліцерину.

Нормування:

— домішка А. площа піка не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.1 %);

— будь-яка інша домішка з часом утримування менше часу утримування гліцерину: площа піка не має перевищувати площу піка домішки А на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.1 %);

— сума всіх домішок з часом утримування більше часу утримування гліцерину: сума площ піків не має перевищувати 5 площ піка домішки А на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.5 %);

— не враховують: домішки, площа піка яких менше 0.05 площі піка домішки А на хроматограмі розчину порівняння (e) (0.05 %).

7.17. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ПРОФІЛЮ ЛАВАНДОВОЇ ОЛІЇ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Хроматографічний профіль. Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція.

Розчин порівняння (a). 0.1 г *лімонену Р,* 0.2 г *цинеолу Р,* 0.2 г *3-октанону Р,* 0.05 г *камфори Р*, 0.4 г *ліналолу Р*, 0.6 *ліналілу ацетату Р*, 0.2 г *терпінен-4-олу Р,* 0.1 *лавандололу ацетату Р,* 0.2 г *лавандололу Р* і 0.2 г *а-терпінеолу Р* розчиняють у 5 мл *гексану Р.*

Розчин порівняння (б). 5 мг *3-октанону Р* розчиняють у *гексані Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: 60 м х 0.25 мм;

— нерухома фаза: макрогол 20000 Р (0.25 мкм).

Газ-носій: гелій для хроматографії Р.

Лінійна швидкість газу-носія: 1.5 мл/хв.

Поділ потоку: 1:100.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 0.2 мкл.

Порядок виходу піків: має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння (а).

Відмічають часи утримування цих субстанцій.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (а):

— коефіцієнт розділення: не менше 1.4 для піків терпінен-4-олу та лавандололу ацетату.

Використовуючи часи утримування, визначені з хроматограми розчину порівняння (а), визначають положення компонентів розчину порівняння (а) на хроматограмі випробовуваного розчину.

Вміст компонентів у відсотках має перебувати у таких межах:

— лімонен: менше 1.0 %;

— цинеол: менше 2.5 %;

— 3-октанон: від 0.1 до 2.5 %;

— камфора: менше 1.2 %;

— ліналол: від 20.0 до 45.0 %;

— ліналілу ацетат: від 25.0 до 46.0 %;

— терпінен-4-ол: від 0.1 до 6.0 %;

— лавандололу ацетат: більше 0.2 %;

— лавандолол: більше 0.1 %;

— а-терпінеол: менше 2.0 %;

— не враховують: компоненти з площею піка, що відповідає площі піка на хроматограмі розчину порівняння (б) (0.05 %).

Домішки оптичних ізомерів. Газова хроматографія (2.2.28).

Випробовуваний розчин. 0.02 г субстанції розчиняють у *пентані Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння. 10 мкл *ліналолу Р* розчиняють у *пентані Р* і додають 10 мкл *ліналілу ацетату Р,* 5 мг *борнеолу Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: 25 м х 0.25 мм;

— нерухома фаза: циклодекстрин модифікований для хіральної хроматографії Р (товщина шару 0.25 мкм).

Газ-носій: гелій для хроматографії Р.

Лінійна швидкість газу-носія: 1.3 мл/хв.

Поділ потоку: 1:30.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 1 мкл.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

— коефіцієнт розділення: не менше 5.5 для піків ліналолу, не менше 2.9 для піків ліналолу та борнеолу, не менше 2.7 для піків ліналілу ацетату.

7.18. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ПРОФІЛЮ РОЗМАРИНОВОЇ ОЛІЇ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Хроматографічний профіль. Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.

Випробовуваний розчин. 0.20 мл субстанції розчиняють у *гексані Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

Розчин порівняння. 20 мкл *α-пінену Р*, 10 мг *камфену Р*, 20 мкл *β-пінену Р,* 10 мкл *β-мірцену Р,* 20 мкл *лімонену Р*, 50 мкл *цинеолу Р*, 10 мкл *цимену Р*, 50 мг *камфори Р,* 30 мг *борнілацетату,*10 мг *α-терпінеолу Р,* 10 мг *борнеолу* і 10 мкл *вербененону Р* розчиняють у *гексані Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: довжина від 30 м (при цьому товщина шару нерухомої фази може становити 1 мкм) до 60 м (при цьому товщина шару нерухомої фази може становити 0.2 мкм); діаметр від 0.25 до 0.53 мм;

— нерухома фаза: макрогол 20000 Р.

Газ-носій: гелій для хроматографії Р.

Швидкість газу-носія: 1 мл/хв.

Поділ потоку: 1:50.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 1 мкл.

Порядок виходу піків: має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Відмічають години утримування цих субстанцій.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

— коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для піків лімонену та цинеолу і не менше 1.5 для піків терпінеолу та борнеолу.

Використовуючи часи утримування, визначені з хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину.

Визначають вміст кожного компонента, у відсотках.

Для розмаринової олії іспанського типу вміст компонентів у відсотках має бути у таких межах:

— а-пінен: від 18 до 26 %;

— камфен: від 8.0 до 12.0 %;

— б-пінен: від 2.0 до 6.0 %;

— мірцен: від 1.5 до 5.0 %;

— лімонен: від 2.5 до 5.0 %;

— цинеол: від 16.0 до 25.0 %;

— цимен: від 1.0 до 2.2 %;

— камфора: від 13.0 до 21.0 %;

— борнілацетат: від 0.5 до 2.5 %;

— а-терпінеол: від 1.0 до 3.5 %;

— борнеол: від 2.0 до 4.5 %;

— вербенон: від 0.7 до 2.5 %.

7.19. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ПРОФІЛЮ ОЛІЇ ЧАЙНОГО ДЕРЕВА МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Хроматографічний профіль. Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.

Випробовуваний розчин. 0.15 мл субстанції розчиняють у 10 мл *гексану Р.*

Розчин порівняння. 5 мкл *пінену Р,* 5 мкл *сабінену Р*, 15 мкл *а-терпінену Р*, 5 мкл *лімонену Р*, 5 мкл *цинеолу Р*, 30 мкл *γ-терпінену Р*, 5 мкл *цимену Р*, 5 мкл *терпінолену Р,*

60 мкл *терпінен-4-олу Р,* 5 мкл *аромадендрену Р* і 5 мг *а-терпінеолу Р* розчиняють в 10 мл *гексану Р.*

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: довжина від 30 м (товщина шару нерухомої фази може становити 1 мкм) до 60 м (товщина шару нерухомої фази може становити 0.2 мкм); діаметр від 0.25 до 0.53 мм;

— нерухома фаза: макрогол 20000 Р.

Газ-носій: гелій для хроматографії Р.

Швидкість газу-носія: 1.3 мл/хв.

Поділ потоку: 1:50.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 1 мкл.

Порядок виходу піків: має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Відмічають години утримування цих субстанцій.

Придатність хроматографічної системи; розчин порівняння:

— коефіцієнт розділення: не менше 2.7 для піків терпінен-4-олу та аромадендрену.

Використовуючи години утримування, визначені з хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину. Не враховують пік гексану.

Визначають вміст кожного компонента, у відсотках.

Вміст компонентів у відсотках має лежати у таких межах:

— а-пінен: від 1.0 до 6.0 %;

— сабінен: менше 3.5 %;

— а-терпінен: від 5.0 до 13.0 %;

— лімонен: від 0.5 до 4.0 %;

— цинеол; менше 15.0 96;

— у-терпінен: від 10.0 до 28.0 %;

— р-цимен: від 0.5 до 12.0 %;

— терпінолен: від 1.5 до 5.0 %;

— терпінен-4-ол: не менше 30.0 %;

— аромадендрен: менше 7.0 %;

— а-терпінеол: від 1.5 до 8.0 %.

7.20. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ ОЛІЇ МИГДАЛЬНОЇ НЕРАФІНОВАНОЇ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Жирнокислотний склад. Газова хроматографія (2.4.22, метод А). Використовують суміш речовин, застосовуваних для калібрування.

Склад фракції жирних кислот має бути таким:

— насичені жирні кислоти з довжиною ланцюга менше С16 не більше 0.1 %;

— пальмітинова кислота: від 4.0 до 9.0 %;

— пальмітолеїнова кислота (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколь-адипінаті 16.3): не більше 0.8 %;

— маргаринова кислота: не більше 0.2 %;

— стеаринова кислота: не більше 3.0 %;

— олеїнова кислота (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколь-адипінаті 18.3): від 62.0 до 86.0 %;

— лінолева кислота (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколь-адипінаті 18.9): від 20.0 до 30.0 %;

— ліноленова кислота (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколь-адипінаті 19.7): не більше 0.4 %;

— арахідонова кислота: не більше 0.2 %;

— ейкозанова кислота: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколь-адипінаті 20.3): не більше 0.3 %;

— бегенова кислота: не більше 0.2 %;

— ерукова кислота (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколь-адипінаті 22.3): не більше 0.1 %.

7.21. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ МЕНІНГОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ (ПОЛІСАХАРИДНА)

ОЧИЩЕНІ ПОЛІСАХАРИДИ

Молекулярно-масовий розподіл. Визначення проводять методом ексклюзійної хроматографії (2.2.30), використовуючи *агарозу для хроматографії Р* або *агарозу для хроматографії поперечно зшиту Р.* Використовують колонку розміром 0.9 м × 16 мм,

урівноважену розчином, що має іонну силу 0.2 моль/кг і pH 7.0-7.5. На колонку наносять близько 2.5 мг полісахариду в об'ємі близько 1.5 мл й елюють зі швидкістю близько 20 мл/год. Збирають фракції по 2.5 мл і визначають вміст полісахариду підхожим методом.

Не менше 65 % полісахариду групи A, 75 % полісахариду групи C, 80 % полісахариду групи Y і 80 % полісахариду групи W_{135} елюються до досягнення коефіцієнта розподілу (K_0) 0.50. Крім того, відсотковий вміст полісахаридів, елюйованих до цього коефіцієнта розподілу, має бути в межах, установлених для конкретного препарату.

ВИПРОБУВАННЯ

Молекулярно-масовий розподіл. Визначення проводять методом ексклюзійної хроматографії (2.2.30).

Використовують колонку розміром 0.9 м x 16 мм, урівноважену розчином, що має іонну силу 0.2 моль/кг і pH 7.0-7.5. На колонку наносять близько 2.5 мг полісахариду в об'ємі близько 1.5 мл і елюють зі швидкістю близько 20 мл/год. Збирають фракції по 2.5 мл і визначають вміст полісахариду підхожим методом. Для дивалентної вакцини (група A + група C) використовують *агарозу для хроматографії поперечно зшиту P.* Вакцина витримує випробування, якщо:

— 65 % полісахариду групи A елююється до $K_0 = 0.50$;

— 75 % полісахариду групи C елююється до $K_0 = 0.50$.

Для тетравалентної вакцини (група A + група C + група Y + група W_{135}) використовують *агарозу для хроматографії поперечно зшиту P1* і застосовують підхожий імунохімічний метод (2.7.1) для встановлення профілю елюації різних полісахаридів.

Вакцина витримує випробування, якщо K_0 для основних піків становить:

— не більше 0.70 для полісахаридів групи A і групи C;

— не більше 0.57 для полісахаридів групи Y;

— не більше 0.68 для полісахаридів групи W_{135}.

7.22. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПНЕВМОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ (ПОЛІСАХАРИДНА)

Молекулярно-масовий розподіл. Визначення проводять методом ексклюзійної хроматографії (2.2.30), використовуючи *агарозу для хроматографії поперечно зшиту P* або *агарозу для хроматографії поперечно зшиту P1.*

7.23. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПНЕВМОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ (ПОЛІСАХАРИДНА, КОН'ЮГОВАНА, АДСОРБОВАНА)

ПОЛІСАХАРИДИ ПНЕВМОКОКА

Молекулярно-масовий розподіл. Визначення проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29) з мультикутовим лазерним світлорозсіювальним детектором (MALLS) або іншими підхожими методами, такими, як ексклюзійна хроматографія (2.2.30), використовуючи *агарозу для хроматографії поперечно зшиту P* або *агарозу для хроматографії поперечно зшиту P1*. Значення має бути в межах, установлених для кожного серотипу. Замість визначення молекулярно-масового розподілу можна використовувати валідоване визначення ступеня полімеризації або середню (за масою) відносну молекулярну масу та дисперсії молекулярних мас.

МОДИФІКОВАНІ ПОЛІСАХАРИДИ ПНЕВМОКОКІВ

Перед кон'югацією полісахариди можуть бути деполімеризовані хімічними або механічними методами, потім концентровані для отримання полісахаридів з бажаним діапазоном молекулярних мас. Полісахариди або деполімеризовані полісахариди модифікують процесами активації. Тільки полісахариди, що витримують наведені нижче вимоги, можуть використовуватися для приготування кон'югата. Молекулярно-масовий розподіл. Для полісахаридів, модифікованих шляхом зменшення молекулярної маси, проводять визначення молекулярної маси методом рідинної хроматографії (2.2.29) з мультикутовим лазерним світлорозсіювальним детектором (MALLS) або такими іншими підхожими методами, як ексклюзійна хроматографія (2.2.30), використовуючи *агарозу для хроматографії поперечно зшиту P* або *агарозу для хроматографії поперечно зшиту P1*. Значення має бути в межах, установлених для кожного серотипу.

МОНОВАЛЕНТНИЙ НЕРОЗФАСОВАНИЙ КОН'ЮГАТ

Вільні сахариди. Незв'язані сахариди визначають після видалення кон'югата, наприклад, іонообмінною рідинною хроматографією, ексклюзійною або гідрофобною хроматографією, ультрафільтрацією або іншими підхожими валідованими методами. Для кожного серотипу з клінічних випробувань встановлюють значення, що відповідають адекватній імуногенності, слід підтвердити, що кожна серія витримує встановлену вимогу.

АДСОРБОВАНИЙ МОНОВАЛЕНТНИЙ НЕРОЗФАСОВАНИЙ КОН'ЮГАТ

Вільні сахариди. Адсорбований моновалентний нерозфасований кон'югат центрифугують. У надосадовій рідині визначають незв'язані сахариди після видалення кон'югата, наприклад, іонообмінною рідинною хроматографією, ексклюзійною або гідрофобною хроматографією, ультрафільтрацією або іншими підхожими валідованими методами. Для кожного серотипу з клінічних випробувань встановлюють значення, що відповідають адекватній імуногенності, і слід підтвердити, що кожна серія витримує встановлену вимогу.

7.24. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТИФУ (ЖИВА, ОРАЛЬНА, ШТАМУ ТУ 21А)

Біосинтез ліпополісахаридів. Ліпополісахариди екстрагують методом із використанням гарячого фенолу і досліджують ексклюзійною хроматографією. Штам ТУ 21А, вирощений на середовищі, вільному від галактози, містить ліпополісахарид тільки в «шорсткому» (rough-R) типі.

7.25. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТИФУ (ПОЛІСАХАРИДНА)

ОЧИЩЕНІ V_i-ПОЛІСАХАРИДИ

Молекулярно-масовий розподіл. Визначення проводять методом ексклюзійної хроматографії (2.2.30), використовуючи *агарозу для хроматографії поперечно зшиту P.* Використовують колонку розміром 0.9 м х 16 мм, урівноважену розчином, що має іонну силу 0.2 моль/кг і pH 7.0-7.5. На колонку наносять близько 5 мг полісахариду в об'ємі близько 1 мл і елююють зі швидкістю близько 20 мл/год. Збирають фракції по 2.5 мл. Визначають точку, відповідну $K_0 = 0.25$, і утворюють 2 пули, що складаються з фракцій, елюйованих до цієї точки і після неї. Визначають 0-ацетил групи в обох пулах (2.5.19).

Не менше 50 % полісахариду має виявлятися в пулі, елюйованому до $K_0 = 0.25$.

7.26. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЕКСТРАНУ 40 ТА НАТРІЮ ХЛОРИДУ РОЗЧИН ДЛЯ ІНФУЗІЙ

Молекулярно-масовий розподіл декстрану (2.2.39). Ексклюзійна хроматографія (2.2.30). Розчини готують безпосередньо перед використанням.

Випробовуваний розчин. До 0.25 мл розчину для інфузій додають 1.0 мг *глюкози Р* і розчиняють у 10.0 мл рухомої фази.

Маркерний розчин. 1.0 г глюкози Р 5.0 мг *ФСЗ декстрану 410 (ФСЗ декстрану V_0)* розчиняють у 2.0 мл рухомої фази.

Калібрувальні розчини. 5.0 мг кожного із зазначених стандартних зразків: *ФСЗ декстрану 5* для калібрування, *ФСЗ декстрану 12* для калібрування, *ФСЗ декстрану 25* для калібрування, *ФСЗ декстрану 50* для калібрування, *ФСЗ декстрану 80* для калібрування, *ФСЗ декстрану 150* для калібрування і *ФСЗ декстрану 270* для калібрування, окремо розчиняють у 2.0 мл рухомої фази.

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. 5.0 мг *ФСЗ декстрану 40* для перевірки придатності хроматографічної системи розчиняють у 2.0 мл рухомої фази.

Колонка:

— дві з'єднані послідовно аналітичні колонки, кожна заповнена *поперечно зшитою агарозою для хроматографії Р* (від 7 до 10 мкм);

— розмір: 0.3 м х 8.0 мм, кожна.

Рухома фаза: розчин 9 г/л *натрію хлориду Р,* що містить 0.05 % *натрію азиду Р*, фільтрують крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0.45 мкм і дегазують.

Швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв.

Детектор: диференціальний рефрактометричний.

Температура:

— колонки: (30 + 0.1) °С;

— термостата кювети: (40 + 0.1) °С.

Інжекції: 50 мкл.

Кількість хроматограм для кожного розчину, не менше 2.

Придатність хроматографічної системи, розчин для перевірки придатності хроматографічної системи:

— співвідношення сигнал/шум: не менше 200 для піка декстрану;

— для висот над базовою лінією, проведених у максимумі піка декстрану (H_1) і в точці, що має мінімальну висоту між піками декстрану і низькомолекулярних речовин (H_2), має виконуватися нерівність:

$$H_1 > H_2 \bullet 100.$$

Базову лінію проводять у вигляді прямої, загальної для піків декстрану і низькомолекулярних речовин.

Нормування:

— середня молекулярна маса декстрану від 35000 до 45000;

— середня молекулярна маса для 10 % високомолекулярної фракції декстрану: не більше 110000;

— середня молекулярна маса для 10 % низькомолекулярної фракції декстрану: не менше 7000.

7.27. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ДИФТЕРІЇ, ПРАВЦЯ, КАШЛЮКУ (АЦЕЛЮЛЯРНА, КОМПОНЕНТНА) ТА ІНФЕКЦІЙ, ВИКЛИКАНИХ HAEMOPHILUS INFLUENZAE ТИПУ B (КОН'ЮГОВАНА), (АДСОРБОВАНА)

КІНЦЕВА СЕРІЯ

Вільний PRP. Визначають для гемофільного компонента після розділення PRP від кон'югата, використовуючи, наприклад, гель-фільтрацію, ексклюзійну або гідрофобну, аніонообмінну хроматографії, ультрафільтрацію або інші валідовані методи. Кількість вільного PRP має бути не більше встановленої для конкретного продукту.

7.28. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ІНФЕКЦІЙ, ВИКЛИКАНИХ HAEMOPHILUS INFLUENZAE ТИПУ b (КОН'ЮГОВАНА)

Молекулярно-масовий розподіл. Молекулярно-масовий розподіл визначають ексклюзійною хроматографією (2.2.30).

Вільний PRP. Використовують безліч методів для розділення PRP від кон'югата, включаючи преципітацію, гель-фільтрацію, ексклюзійну, аніонообмінну і гідрофобну

хроматографії, ультрафільтрацію й ультрацентрифугування. Далі кількість вільного PRP можна визначати декількома методами, зокрема високоефективною аніонообмінною хроматографією з імпульсним амперометричним детектором (HPAEC-PAD) та імуноаналізом з анти-PRP-антитілами.

7.29. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АЛЬБУМІНУ ЛЮДИНИ РОЗЧИН

Розподіл молекул за розміром. Ексклюзійна хроматографія (2.2.30).

Випробовуваний розчин. Лікарський засіб розводять розчином 9 г/л *натрію хлориду Р* до концентрації, підхожої для використовуваної хроматографічної системи. Звичайно підхожими є концентрація в межах 4-12 г/л та інжекція 50-600 мкг білка.

Колонка:

— розмір: 0.6 м х 7.5 мм або 0.3 м х 7.8 мм;

— нерухома фаза: силікагель для хроматографії, *гідрофільний Р,* підхожий для фракціонування глобулярних білків із відносними молекулярними масами від 10000 до 500000.

Рухома фаза: 4.873 г *динатрію гідрофосфату дигідрату Р*, 1.741 г *натрію дигідрофосфату моногідрату Р*, 11.688 г натрію хлориду і 5 і 50 мг *натрію азиду Р* розчиняють в 1 л *води Р.*

Швидкість рухомої фази: 0.5 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 280 нм.

Пік, відповідний полімерам і агрегатам, проявляється у частині хроматограми, що представлена «мертвим об'ємом». Не враховують пік стабілізатора. Площа піка, відповідного полімерам і агрегатам, має становити не більше 10 % площі усіх піків на хроматограмі. Їх вміст не має перевищувати 5 %, у перерахунку на білок, з урахуванням різниці у факторі відгуку між альбуміну мономером і полімерами та агрегатами.

7.30. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ГЕПАРИНІВ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ С

Ексклюзійна хроматографія (2.2.30). Випробовуваний розчин. 20 мг субстанції розчиняють у 2 мл рухомої фази. Розчин порівняння. 20 мг *ФСЗ гепарину низькомолекулярного* для калібрування розчиняють у 2 мл рухомої фази.

Колонка:

— розмір: 0.30 м х 7.5 мм;

— *нерухома фаза:* підхожий пористий силікагель (5 мкм) з діапазоном фракціонування для білків близько від 15000 до 100000;

— число теоретичних тарілок: не менше 20000 на метр.

Рухома фаза: розчин 28.4 г/л *натрію сульфату безводного Р*, pH якого доводять до 5.0 *сірчаною кислотою розведеною Р.*

Швидкість рухомої фази: 0.5 мл/хв.

Детектор: диференціальний рефрактометричний.

Інжекції: 25 мкл.

Калібрування. Використовують диференціальний рефрактометричний детектор (RI), з'єднаний із УФ-спектрофотометром (UV). Вимірювання проводять за довжини хвилі 234 нм. UV-монітор приєднаний до виходу з колонки, RI-детектор приєднаний до виходу з UV-монітора.

Якщо необхідно, для зіставлення одержаних хроматограм точно вимірюють час затримки між 2 детекторами. Години утримування, використані для калібрування, мають бути такими самими, як і для RI-детектора.

Фактор нормалізації, що використовують для розрахунку відносної молекулярної маси зі співвідношення RI/UV, обчислюють таким чином: розраховують загальну площу піків UV_{234}-хроматограми (ΣUV_{234}) і RI-хроматограми (ΣRI) шляхом чисельного інтегрування в досліджуваному діапазоні (тобто виключають піки солі та розчинника у кінці хроматограми). Співвідношення *r* обчислюють за формулою:

$$\frac{\Sigma RI}{\Sigma UV_{234}}.$$

Фактор *f* обчислюють за формулою:

$$\frac{M_{na}}{r},$$

де M_{na} — середньочислова відносна молекулярна маса *ФСЗ гепарину низькомолекулярного для калібрування*, зазначена у супровідній документації.

Після того, як UV_{234} і RI відклики вирівняні, відносну молекулярну масу (M) у будь-якій точці обчислюють за формулою:

$$f\frac{RI}{UV_{234}}.$$

Кінцева таблиця годин утримування та відносних молекулярних мас може бути використана для калібрування хроматографічної системи шляхом підбору підхожої математичної залежності до експериментальних даних. Рекомендовано використовувати поліном 3 ступеня.

Слід зазначити, що екстраполяція одержаної калібрувальної залежності на більш високі значення молекулярної маси не є коректною.

Хроматографують 25 мкл випробовуваного розчину протягом часу, необхідного для повного виходу піків зразка та розчинника. Середню (за масою) відносну молекулярну масу обчислюють за формулою:

$$\frac{\sum(RI_i M_i)}{\sum RI_i},$$

де RI_i — маса субстанції, що елююється у фракції *i*; M_i — відносна молекулярна маса, що відповідає фракції *i*.

Будь-який низькомолекулярний гепарин, описаний в окремій статті, має відповідати вимогам ідентифікації С, зазначеним у відповідній монографії. Якщо окрема стаття на низькомолекулярний гепарин відсутня, середня (за масою) відносна молекулярна маса має становити не більше 8000, і не менше 60 % загальної маси повинні мати відносну молекулярну масу менше 8000. Крім того, параметри молекулярної маси (середня (за масою) відносна молекулярна маса та масова частка ланцюгів, для яких встановлено межі) мають відповідати відповідним показникам препарату порівняння виробника.

7.31. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ДЕКСТРАНУ 1 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Молекулярно-масовий розподіл. Ексклюзійна хроматографія (2.2.30).

Випробовуваний розчин. (6.0-6.5) мг субстанції розчиняють в 1.0 мл рухомої фази.

Розчин порівняння (a). (6.0-6.5) мг *ФСЗ декстрану 1* розчиняють в 1.0 мл рухомої фази.

Розчин порівняння (b). Вміст ампули *ФСЗ ізомальтоолігосахариду* розчиняють в 1 мл рухомої фази та перемішують. Це відповідає близько 45 мкг *ізомальтотриози* (3 одиниці глюкози), близько 45 мкг *ізомальтонанози* (9 одиниць глюкози) і близько 60 мкг *натрію хлориду* у 100 мкл.

Колонка: 2 послідовно з'єднані колонки:

— розмір: 0.30 м х 10 мм;

— *нерухома фаза:* декстран, ковалентно прищеплений до високопористих, поперечнозшитих агарозних кульок, що дозволяє розділити олігосахариди у діапазоні молекулярних мас від 180 до 3000;

— температура: 20-25 °С.

Рухома фаза: розчин 2.92 г/л *натрію хлориду Р.*

Швидкість рухомої фази: 0.07-0.08 мл/хв із точністю ± 1 %.

Детектор: диференційний рефрактометр.

Інжекції: 100 мкл.

Ідентифікація піків: використовують хроматограму *розчину порівняння (b)* для ідентифікації піків ізомальтотриози, ізомальтонанози та натрію хлориду.

Визначають площі піків. Не враховують пік натрію хлориду. Обчислюють середню відносну молекулярну масу M_w, розмір фракцій менше 3 і більше 9 одиниць глюкози у ФСЗ декстрану 1 і випробовуваній субстанції за формулою:

$$M_w = \sum w_i \cdot m_i,$$

де M_w — середня молекулярна маса декстрану; m_i — молекулярна маса олігосахариду *i*; w_i — масова частка олігосахариду *i*.

Для розрахунку використовують такі значення m_i:

Олігосахарид *i*	m_i
Глюкоза	180
Ізомальтоза	342
Ізомальтотріоза	504
Ізомальтотетраоза	666
Ізомальтопентоза	828
Ізомальтогексоза	990
Ізомальтогептоза	1152
Ізомальтооктоза	1314
Ізомальтонаноза	1476
Ізомальтодекоза	1638
Ізомальтоундекоза	1800
Ізомальтододекоза	1962

Олігосахарид *i*	m_i
Ізомальтотридекоза	2124
Ізомальтотетрадекоза	2286
Ізомальтопенталекоза	2448
Ізомальтогексадекоза	2610
Ізомальтогентадекоза	2772
Ізомальтооктадекоза	2934
Ізомальтононадекоза	3096

Придатність хроматографічної системи: значення, одержане для *ФСЗ декстрану 1*, має лежати в межах, зазначених на етикетці.

Нормування:

— середня молекулярна маса (M_w: від 850 до 1150);

— фракція менше 3 одиниць глюкози: менше 15 %;

— фракція більше 9 одиниць глюкози: менше 20 %.

7.32. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ОРГАНІЧНИХ РОЗЧИННИКІВ У ДЕКСТРАНІ 40 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Залишкові кількості органічних розчинників. Газова хроматографія (2.2.28).

Внутрішній стандарт: *пропанол* Р.

Випробовуваний розчин. 5 г субстанції розчиняють у 100 мл *води Р* і переганяють. До перших 45 мл відгону додають 1 мл розчину 25 г/л *пропанолу Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 50 мл.

Розчин порівняння. До 0.5 мл розчину 25 г/л *етанолу Р* додають 0.5 мл розчину 25 г/л *пропанолу Р* і 0.5 мл розчину 2.5 г/л *метанолу Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 25.0 мл.

Колонка:

— матеріал: невржавна сталь;

— розмір: 1.8 м х 2 мм;

— нерухома фаза: *співполімер етилвінілбензол-дивініл-бензол Р* (125-150 мкм).

Газ-носій: азот для хроматографії Р.

Швидкість газу-носія: 25 мл/хв.

Температура:

— колонки: 190 °C;

— блока вводу проб: 240 °C;

— детектора: 210 °C.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Інжекції: обраний об'єм кожного розчину.

Нормування:

— етанол: площа піка не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.5 %);

— метанол: площа піка не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.05 %);

— сума розчинників, відмінних від етанолу, метанолу та пропанолу: сума площ піків не має перевищувати площу піка внутрішнього стандарту на хроматограмі розчину порівняння (0.5 %, у перерахунку на пропанол).

7.33. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ДЕКСТРАНУ 40 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Молекулярно-масовий розподіл (2.2.39). Середня молекулярна маса (M_w) має бути від 35 000 до 45 000.

Середня молекулярна маса 10 % високомолекулярної фракції не має перевищувати 110000. Середня молекулярна маса 10 % низькомолекулярної фракції має бути не менше 7000.

7.34. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ МЕТАНОЛУ Й 2-ПРОПАНОЛУ (МЕТОД А)

Метод парафазної газової хроматографії (2.2.28).

Розчин внутрішнього стандарту. 1.0 мл *пропанолу Р1* доводять водою Р до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл отриманого розчину доводять *водою Р* до об'єму 20.0 мл.

Випробовуваний розчин. Змішують 1.0 мл розчину внутрішнього стандарту та 4.0 мл випробовуваного препарату і доводять *водою Р* до об'єму 20.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину поміщають у віалу для інжекції.

Розчин порівняння (a). Змішують 1.0 мл *метанолу Р2* та 1.0 мл *2-пропанолу Р2* і доводять водою Р до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл отриманого розчину доводять водою Р до об'єму 20.0 мл.

Розчин порівняння (b). 5.0 мл *етанолу безводного Р* доводять *водою Р* до об'єму 100.0 мл. 25.0 мл отриманого розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.1.0 мл отриманого розчину доводять *водою Р* до об'єму 20.0 мл.

Розчин порівняння (c). Змішують 1.0 мл розчину внутрішнього стандарту, 2.0 мл *розчину порівняння (a)* і 2.0 мл розчину *порівняння (b)* і доводять *водою Р* до об'єму 20.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину поміщають у віалу для інжекції.

Віали для інжекцій негайно закривають щільними гумовими пробками з мембранами, покритими політетрафторетиленом, і обжимають алюмінієвими кришками.

Колонка:

— матеріал: кварц;

— розмір: 30 м Å~ 0.53 мм;

— нерухома фаза: *ціанопропіл(3)феніл(3)метил(94) полісилоксан Р* (товщина плівки 3 мкм).

Газ-носій: гелій для хроматографії Р.

Швидкість газу-носія: 3 мл/хв.

Поділ потоку: 1:50.

Статичні парафазні умови, які можуть бути використані:

— температура урівноваження: 85 °С;

— час урівноваження: 20 хв.

Температура:

Час (хв)	Час (хв)	Температура (°С)
Колонка	0–1.6 1.6–9.9 9.9–13.6 13.6–20	40 40 → 65 65 → 175 175
Блок введення проби		200
Детектор		200

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Інжекція: 1.0 мл газової фази випробовуваного розчину і розчину порівняння (с) не менше, ніж по 3 рази.

Порядок виходу піків: метанол, етанол, 2-пропанол, пропанол.

Відносне утримування до етанолу (час утримування етанолу — приблизно 5.3 хв): метанолу — приблизно 0.8; 2-пропанолу — приблизно 1.2, пропанолу — приблизно 1.6.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (с):

— ступінь розділення: не менше 5 між піками метанолу й етанолу.

Вміст метанолу, у відсотках (об/об), обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \cdot I_2}{A_2 \cdot I_1 \cdot 40},$$

де A_1 — площа піка метанолу на хроматограмі випробовуваного розчину; A_2 — площа піка метанолу на хроматограмі розчину порівняння (с); I_1 — площа піка внутрішнього стандарту на хроматограмі випробовуваного розчину; I_2 — площа піка внутрішнього стандарту на хроматограмі розчину порівняння (с).

Вміст 2-пропанолу, у відсотках (об/об), обчислюють за формулою:

$$\frac{A_3 \cdot I_2}{A_4 \cdot I_1 \cdot 40},$$

де A_3 — площа піка 2-пропанолу на хроматограмі *випробовуваного розчину;* A_4 — площа піка 2-пропанолу на хроматограмі розчину *порівняння (с);* I_1 — площа піка внутрішнього стандарту на хроматограмі *випробовуваного розчину;* I_2 — площа піка внутрішнього стандарту на хроматограмі *розчину порівняння (с).*

7.35. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВІНІЛХЛОРИДУ В МАТЕРІАЛАХ НА ОСНОВІ ПЛАСТИФІКОВАНОГО ПОЛІВІНІЛХЛОРИДУ ДЛЯ КОНТЕЙНЕРІВ ДЛЯ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ДЛЯ ВНУТРІШНЬОВЕННИХ ІНФУЗІЙ

Парофазна газова хроматографія (2.2.28).

Розчин внутрішнього стандарту. 10 мкл *ефіру Р* уводять у 20.0 мл *диметилацетаміду Р* за допомогою мікрошприца, занурюючи кінчик голки в розчинник. Безпосередньо перед використанням одержаний розчин розводять *диметилацетамідом Р* у 1000 разів.

Випробовуваний розчин. 1.000 г випробовуваного матеріалу поміщають у флакон місткістю 50 мл і додають 10.0 мл розчину внутрішнього стандарту. Флакон герметично закривають пробкою. Струшують, уникаючи контакту між пробкою і рідиною.

Флакон поміщають на водяну баню за температури (60 ± 1) °С і витримують протягом 2 год. Основний розчин вінілхлориду. Готують у витяжній шафі. 50.0 мл диметилацетаміду Р поміщають у флакон місткістю 50 мл, герметично закривають пробкою і зважують з точністю до 0.1 мг. Наповнюють поліетиленовий або поліпропіленовий шприц місткістю 50 мл газоподібним вінілхлоридом Р, залишають газ у контакті зі шприцом приблизно 3 хв, спорожняють шприц і знову наповнюють 50 мл газоподібного вінілхлориду Р. Приєднують до шприца гіподермальну голку й знижують об'єм газу в шприці з 50 до 25 мл. Повільно вводять 25 мл вінілхлориду, що залишились, у флакон, обережно струшуючи й уникаючи контакту між рідиною і голкою. Знову зважують флакон; збільшення маси має становити приблизно 60 мг (1 мкл одержаного розчину містить приблизно 1.2 мкг вінілхлориду). Залишають на 2 год. Основний розчин зберігають у холодильнику.

Еталонний розчин вінілхлориду. До 1 об'єму основного розчину вінілхлориду додають 3 об'єми диметилацетаміду Р.

Розчини порівняння. 10.0 мл розчину внутрішнього стандарту поміщають у кожний із шести флаконів місткістю 50 мл, флакони герметично закривають пробками. У п'ять флаконів уводять за допомогою мікрошприца 1, 2, 3, 5 і 10 мкл еталонного розчину вінілхлориду відповідно. Одержані в такий спосіб шість розчинів містять відповідно 0, приблизно 0.3, 0.6, 0.9, 1.5 і 3 мкг вінілхлориду. Флакони струшують, уникаючи контакту між пробкою і рідиною. Флакони поміщають на водяну баню за температури (60 ± 1) °С і витримують протягом 2 год.

Колонка:

— матеріал: неіржавна сталь;

— розмір: 3 м Å~ 3 мм;

— *нерухома* фаза: *діатоміт для газової хроматографії силанізований Р* з нанесеними 5 % (м/м) диметилстеариламіду Р і 5 % (м/м) *макроголу 400 Р.*

Газ-носій: азот для хроматографії Р.

Лінійна швидкість газу-носія: 30 мл/хв.

Температура:

— колонка: 45 °С;

— блок вводу проб: 100 °С;

— детектор: 150 °С.

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм інжекції: 1 мл парової фази.

Нормування:

— вінілхлорид: не більше 0.0001 % (1 ppm).

Тема 8. ПРИКЛАДИ ВИКОРИСТАННЯ ТА ОФОРМЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. ВАЛІДАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДИК

Валідація аналітичних методик проводиться відповідно до вимог ICH Q2 та ДФУ за такими критеріями: специфічність, лінійність, межі виявлення та кількісного визначення, прецизійність, правильність, робасність.

Специфічність (specificity) — здатність методики однозначно визначати аналізовану речовину в присутності інших компонентів, які можуть бути присутніми у пробі. Як правило, це можуть бути домішки, продукти розкладу, плацебо тощо.

Лінійність (linearity) аналітичної методиким — здатність методики (у межах визначеного діапазону) давати результати, прямо пропорційні концентрації (кількості) аналізованої речовини у пробі.

Межа виявлення (detection limit) окремої аналітичної методики являє собою найменшу кількість аналіту в пробі, яку можна визначити, але яка не обов'язково виражена точним значенням.

Межа кількісного визначення (quantitation limit) окремої аналітичної методики являє собою найменшу кількість аналіту в пробі, яку можна оцінити кількісно з прийнятною правильністю та прецизійністю.

Прецизійність (precision) аналітичної методики виражає ступінь близькості (або ступінь дисперсії) для серіями вимірювань, отриманих під час паралельних вимірювань одного однорідного зразка, у визначених умовах. Дослідження прецизійності проводять за такими характеристиками: повторюваність, проміжна прецизійність та відтворюваність.

Повторюваність (repeatability) виражає прецизійність методики під час її виконання в одних і тих самих умовах протягом короткого інтервалу часу.

Проміжна (внутрішньолабораторна) прецизійність (intermediate precision) виражає вплив зміни умов аналізу всередині лабораторії: різні дні, обладнання, аналітики тощо.

Відтворюваність (reproducebility) виражає міжлабораторну прецизійність.

Правильність (accuracy) аналітичної методики визначає ступінь близькості між відомим істинним значенням або прийнятою довідковою величиною і значенням, одержаним за цієї методики.

Діапазон використання (range) аналітичної методики — інтервал між верхнім та нижнім значеннями концентрації аналіту в пробі, в межах якого доведені прийнятні прецизійність, правильність та лінійність методики.

Робасність (robustness) аналітичної методики — її здатність залишатися незмінною за невеликих, умисних змін умов проведення аналізу, характеризує надійність методики за звичайних умов.

ПРИКЛАДИ

8.1. ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСТОТИ СУБСТАНЦІЙ ІНУЛІНУ МЕТОДОМ ТШХ

(*за матеріалами дисертаційної роботи Н. М. Смєлової [12]*)

Визначення проводять відповідно до вимог ДФУ, *2.2.27,* Тонкошарова хроматографія.

Пластинка: ТШХ-пластинка із *шаром силікагелю Р*. Пластинку занурюють (якщо підкладка пластинки алюмінієва) чи обприскують (підкладка пластинки скляна) 0,3 % *розчином натрію ацетату*, висушують у потоці теплого повітря. Активують у сушильній шафі протягом 10–15 хвилин за температури 100–105 °С.

Випробовуваний розчин (а). 0,2 г субстанції інуліну поміщають у мірну колбу місткістю 20 мл, додають 10 мл *гарячої води Р*, розчиняють, перемішуючи. Після охолодження доводять об'єм колби *водою Р* до позначки та перемішують.

Випробовуваний розчин (б). 0,2 г субстанції інуліну поміщають у мірну колбу місткістю 20 мл, додають 0,8 г *щавлевої кислоти Р*, розчиняють у 10 мл *гарячої води Р*, перемішуючи. Доводять об'єм колби *водою Р* до позначки та перемішують. Нагрівають протягом 10 хвилин на водяній бані зі зворотним холодильником. Охолоджують.

Розчин порівняння (а). По 0,1 г *ФСЗ ДФУ фруктози, ФСЗ ДФУ глюкози, ФСЗ ДФУ сахарози, ФСЗ ДФУ лактози* поміщають у мірну колбу місткістю 20 мл, розчиняють у 10 мл *води Р*, доводять об'єм до позначки *водою Р* та перемішують.

Розчин порівняння (б). 0,1 г мальтодекстрину поміщають у мірну колбу на 20 мл, розчиняють у 10 мл *води Р* і до позначки *водою Р*.

Рухома фаза: оцтова кислота льодяна Р — хлороформ Р — вода Р (70:60:10); точно вимірюють об'єми компонентів суміші.

Об'єм проб: по 5 мкл випробовуваних розчинів (а, б) та розчинів порівняння (а, б), добре висушуючи між кожним нанесенням. Наносять смугами довжиною 10 мм.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: у потоці теплого повітря.

Двократне елюювання з висушуванням пластини у теплому повітрі між кожним занурювання.

Суміш для виявлення: 2 мл *аніліну Р* і 2 г *дифеніламіну Р* розчиняють у 100 мл *метанолу Р*, додають 15 мл *фосфорної кислоти Р* і перемішують.

Виявлення: обприскують сумішшю для виявлення і нагрівають за температури 130 °С протягом 10 хвилин. Результати оцінюють у денному світлі.

Придатність хроматографічної системи: на хроматограмі розчину порівняння мають проявлятися чотири чітко розділені хроматографічні зони фруктози, глюкози, сахарози та лактози.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину (а) має проявлятися зона інуліну на лінії старту. На хроматограмі випробовуваного розчину (б) мають проявлятися дві зони на рівні відповідних зон фруктози та глюкози. На хроматограмі розчинів порівняння (а) мають проявлятися чотири чітко розділені зони, на хроматограмі розчину порівняння (б) мають проявлятися чотири зони мальтодекстрину.

Визначення валідаційних характеристик ТШХ-методики.

Специфічність. Валідацію методики аналізу розпочали з визначення специфічності, що робили на одній пластинці порівняно зі стандартними речовинами для випробовуваного розчину інуліну до та після гідролізу.

У наведеній рухомій фазі *льодяна оцтова кислота — хлороформ — вода (70:60:10)* для зразку інуліну після гідролізу (ВР-2) проявляються хроматографічні зони на рівні зон стандартних речовин фруктози та глюкози (РП-1), що підтверджує структурний склад полісахариду (рис. 8.1).

Визначали специфічність порівняно з можливими домішками інуліну та сполуками, що застосовуються для фальсифікації фруктану. Паралельно наносили на одну ТШХ-пластину розчин АФІ інуліну серії 01 до гідролізу (ВР-1), розчин маркерів фруктози, глюкози, сахарози, лактози (РП-1) та розчин маркера мальтодекстрину (РП-2). Результати визначення специфічності наведено на рис. 8.2.

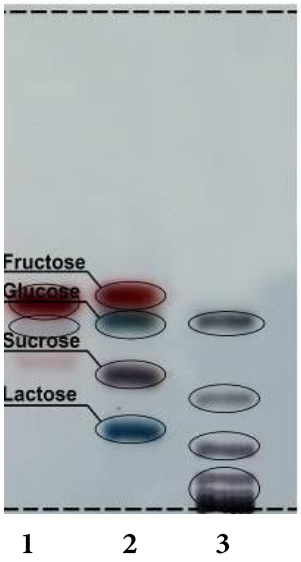


Рис. 8.1. Хроматограма випробовуваного АФІ інуліну серії 01 після гідролізу, ВР-2 (1); розчин стандартних речовин фруктози, глюкози, сахарози та лактози, РП-1 (2); розчин стандартної речовини мальтодекстрину, РП-2 (3) на ТШХ-пластині Silica gel 60 (Merck) з алюмінієвою підкладкою

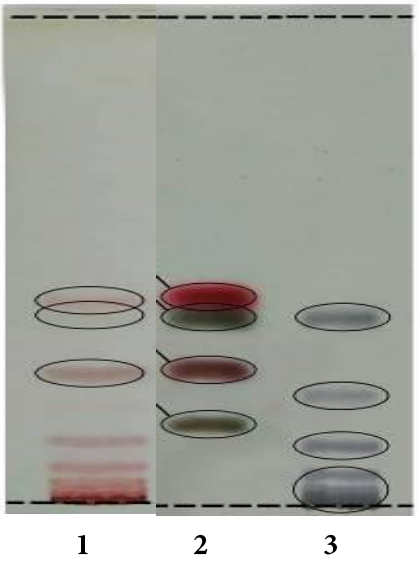


Рис. 8.2. Хроматограма випробовуваного АФІ інуліну до гідролізу, ВР-1 (1); розчин стандартних речовин фруктози, глюкози, сахарози та лактози, РП-1 (2), розчин стандартної речовини мальтодекстрину, РП-2 (3) на ТШХ-пластині Silica gel 60 (Merck) з алюмінієвою підкладкою

Як видно з рис. 8.2, на хроматограмі субстанції інуліну без гідролізу проявляються хроматографічні зони на рівні стандартних речовин фруктози, глюкози, сахарози та лактози, є й інші хроматографічні зони. Зони маркерних речовин і випробовуваних розчинів мали повне розділення, збігаються за забарвленням та розташуванням, що вказує на специфічність розділення компонентів сумішей .

Згідно з результатами хроматограм (рис. 8.1, 8.2), наведена методика може застосовуватися не лише для ідентифікації (за продуктами гідролізу інуліну), а також для визначення чистоти аналізованих субстанцій інуліну (за розчинами інуліну до гідролізу).

Робасність. Наступним етапом дослідження стало визначення робасності, для чого оцінювали вплив умов проведення хроматографування на кінцевий результат (вплив типу нерухомої фази, насиченість камери, об'єму нанесення, відстань від лінії старту до фінішу, кратність елюювання, тривалості гідролізу, вплив проявника, стабільність розчинів для нанесення).

Стабільність розчинів до хроматографування. Стабільність досліджуваних розчинів оцінювали паралельно на одній ТШХ-пластинці. Наносили розчин АФІ інуліну серії 01 до (ВР-1) та після гідролізу (ВР-2) за 3 години (рис. 8.3, зони 1, 3) та безпосередньо перед хроматографуванням (рис. 8.3, зони 2, 4). Одержані індивідуальні зони не відрізнялися між собою за розташуванням, кольором, інтенсивністю та формою, що свідчить про стабільність аналізованих розчинів упродовж зазначеного проміжку часу.

Вплив типу підкладки. Для аналізу використовувались ТШХ-пластинки різних виробників («Supelco», «Merck»), покриті шаром *силікагелю Р*, на алюмінієвій та скляній підкладках. Оцінювали вплив типу підкладки на результат розділювальної здатності компонентів суміші та на коливання значень R_f для відповідних зон. На всіх пластинках досягається розділення компонентів суміші (рис. 8.4). З погляду економічності та зручності у використанні перевагу одержали пластинки Silica gel on TLC (Supelco) та TLC Silica gel 60 (Merck) з алюмінієвою підкладкою.

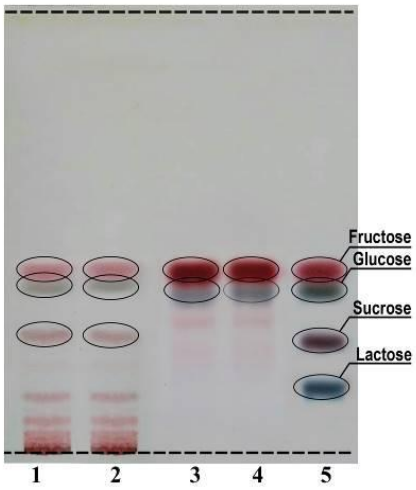


Рис. 8.3. Стабільність випробовуваних розчинів АФІ інуліну до гідролізу, ВР-1 (1, 2); після гідролізу, ВР-2 (3, 4): 1, 3 — зразки нанесені за 3 год до хроматографування; 2, 4 — зразки, нанесені безпосередньо перед хроматографуванням на ТШХ-пластині Silica gel 60 (Merck)

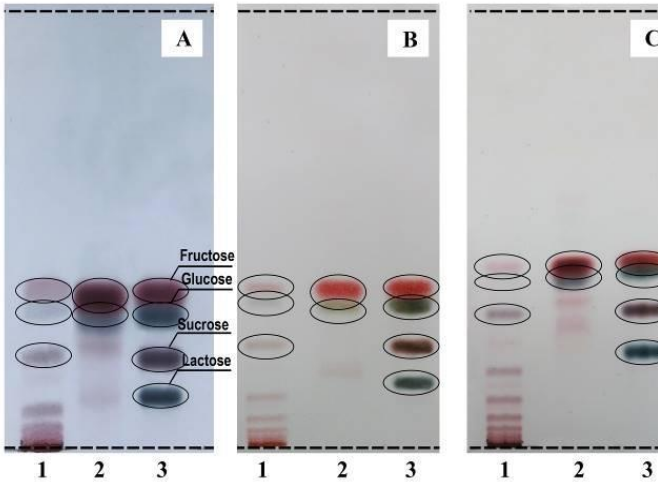


Рис. 8.4. Вплив типу підкладки: А — пластина TLC Silica gel 60 (Merck) на скляній підкладці; В — пластина TLC Silica gel 60 (Merck) на алюмінієвій підкладці; С — пластина Silica gel on TLC (Supelco) на алюмінієвій підкладці; 1 — ВР-1; 2 — ВР-2; 3 — РП-1

Вплив об'єму розчину для нанесення. У ході дослідження порівнювалися результати, одержані під час нанесення випробовуваних розчинів та розчинів порівняння, об'єми проб яких склали 5, 6, 7, 8 мкл. Зразки наносили смугами за допомогою мікрошприца Hamilton, розмір яких склав 10 × 2 мм (рис. 8.5).

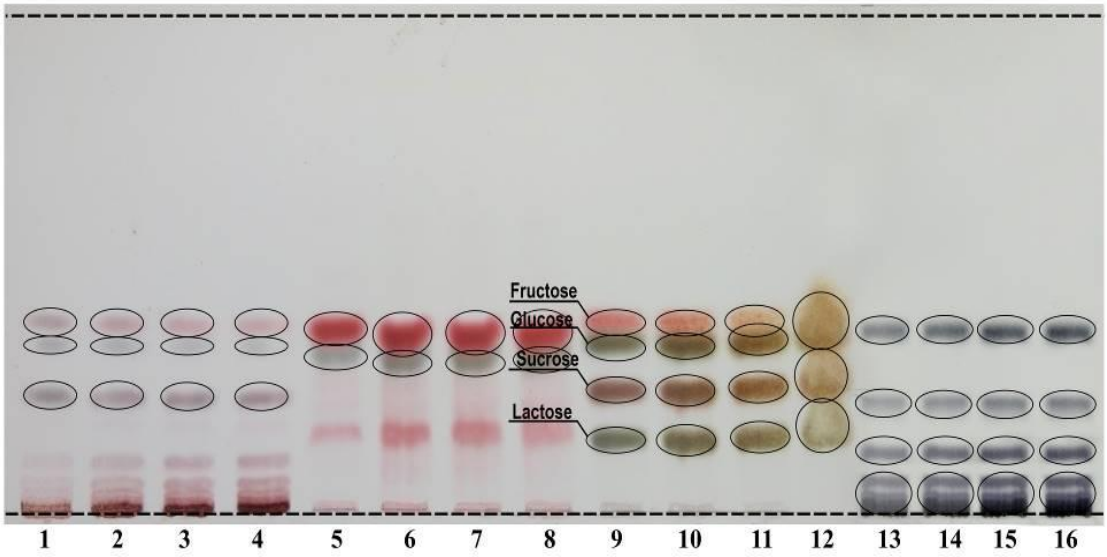


Рис. 8.5. Вплив об'єму розчину для нанесення: 1–4 — розчин АФІ інуліну до гідролізу, ВР-1; 5–8 — розчин АФІ інуліну після гідролізу, ВР-2; 9–12 — розчин стандартних речовин фруктози, глюкози, сахарози та лактози, РП-1; 13–16 — розчин стандартної речовини мальтодекстрину, РП-6: 1, 5, 9, 13 — **5 мкл**; 2, 6, 10, 14 — **6 мкл**; 3, 7, 11,14 — **7 мкл**; 4, 8, 12, 16 — **8 мкл** на ТШХ-пластині Silica gel 60 (Merck) з алюмінієвою підкладкою

Як бачимо, за низьких величин кількості речовини, які наносяться на пластину, зони ледве проявляються, а за великих об'ємів спостерігаємо розмиття хроматографічних зон та зміну їх форми. Тому оптимальні об'єми для нанесення склали: 5,0 мкл для ВР-1 (50 мкг), ВР-2 (50 мкг), РП-2 (50 мкг), РП-3 (50 мкг), РП-4 (50 мкг), РП-5 (50 мкг), РП-1 (по 25,0 мкг кожного маркера фруктози, глюкози, сахарози та лактози), РП-6 (25 мкг). Ширина хроматографічної зони зразків, яка дозволяє отримувати відтворювані результати, складає 10 × 2 мм.

Вплив активації пластинки. Аналіз проводили як з попередньою активацією пластин 0,3 % розчином *натрію ацетату Р* з подальшим висушуванням у потоці теплого повітря, так і без занурювання у відповідний розчин. Було зроблено висновок, що найбільш ефективне та повне розділення аналізованих сполук досягається на пластинах, що попередньо імпрегновані натрій-ацетатним розчином. Це пояснюється здатністю вуглеводів утворювати комплекси з неорганічними компонентами та кращим фіксуванням до нерухомої фази.

Також було встановлено, що для пластин з алюмінієвою підкладкою імпрегнування доречно проводити шляхом занурення пластини у відповідний розчин, а для пластин зі скляною підкладкою — шляхом обприскування. Це пояснюється тим, що під

час занурення пластин зі скляною підкладкою спостерігається порушення шару сорбенту та виникнення у ньому тріщин, що унеможливлює подальше проведення дослідження.

Перед використанням пластини також активували шляхом нагрівання протягом 15–20 хвилин за температури 100–105 °С для видалення залишкової вологи, яка може знизити активність сорбенту.

Вплив насичення камери. Проводили дослідження у насиченій та ненасиченій елюентом хроматографічній камері. Було встановлено, що завдяки насиченню камери процес елюювання проходить швидше, тобто скорочується час хроматографування.

Вплив відстані, що має пройти рухома фаза. Порівнювалися такі відстані фронту розчинника, як 10, 12 і 15 см (рис. 8.6). Оптимальним є значення 10 см, оскільки збільшення відстані, що має пройти рухома фаза, суттєво не впливає на розділювальну здатність, однак збільшує тривалість та вартість аналізу.

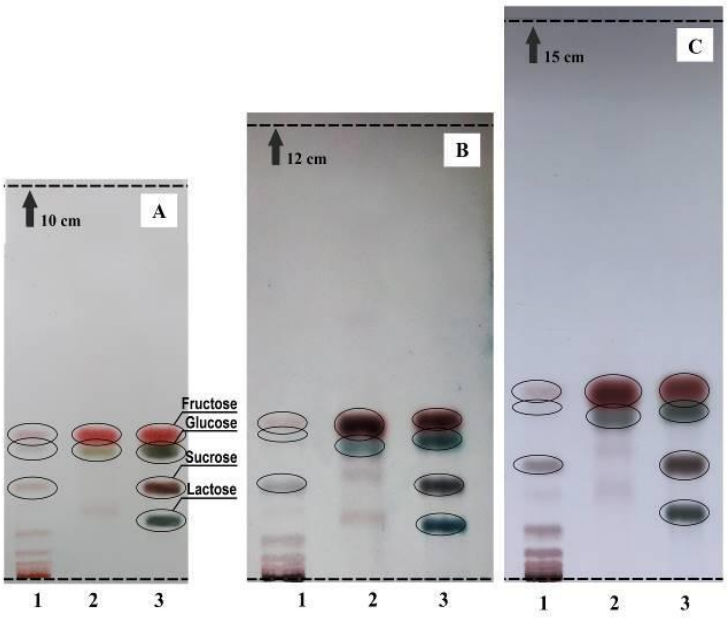


Рис. 8.6. Вплив відстані, що має пройти рухома фаза: А — 10 см; В — 12 см; С — 15 см; 1 — розчин АФІ інуліну до гідролізу, ВР-1; 2 — розчин АФІ інуліну після гідролізу, ВР-2; 3 — розчин стандартних речовин фруктози, глюкози, сахарози та лактози, РП-1 на ТШХ-пластині Silica gel 60 (Merck)

Кратність елюювання. Порівнювався хроматографічний профіль розділення зон речовин залежно від кратності елюювання на різних пластинах. Було встановлено, що за двократного проходження елюенту, з висушуванням пластинки у потоці теплого повітря між кожним зануренням у суміш рухомої фази, досягається оптимальне та повне розділення компонентів випробовуваних розчинів та розчинів порівняння. Це підтверджується відповідними значеннями R_f для розчинів маркерів (табл. 8.1).

Таблиця 8.1

Залежність значень R_f для стандартних на пластинках різних типів залежно від кратності елюювання

Аналізована зона	Кратність елюювання	
	1 раз	2 рази
Зона, відповідна фруктозі	0,35 ± 0,05	0,44 ± 0,05
Зона, відповідна глюкозі	0,30 ± 0,05	0,38 ± 0,05
Зона, відповідна сахарозі	0,21 ± 0,03	0,27 ± 0,03
Зона, відповідна лактози	0,14 ± 0,03	0,17 ± 0,02

Визначення оптимального часу гідролізу. Для підтвердження структурного складу інуліну необхідною умовою є гідроліз субстанції до складових моносахаридів. Визначення оптимального часу деструкції інуліну з розчином кислоти щавлевої проводили шляхом порівняння хроматографічних профілів через 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 хвилин після нагрівання на водяній бані зі зворотним холодильником (рис. 8.7). Як бачимо, оптимальний час гідролізу складає 10 хвилин, подальше нагрівання призводить до появи побічних продуктів, кількість яких зростає пропорційно збільшенню тривалості гідролізу.

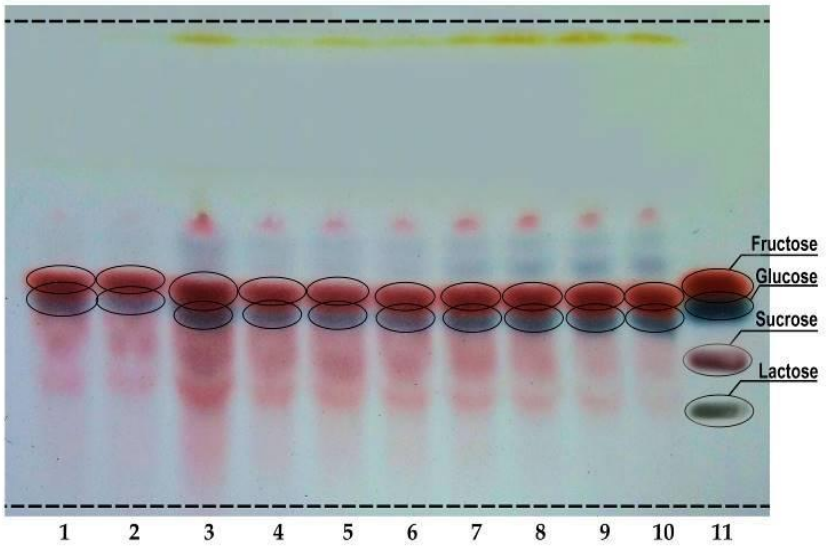


Рис. 8.7. Хроматограма розчину АФІ інуліну після гідролізу (ВР-2) на водяній бані зі зворотним холодильним пристроєм протягом 5 (1), 10 (2), 15 (3), 20 (4), 25 (5), 30 (6), 60 (7), 90 (8), 120 (9) та 150 хв (10) нагрівання; розчин стандартних речовин фруктози, глюкози, сахарози та лактози, РП-1 (11) на ТШХ-пластині Silica gel 60 (Merck)

Стабільність результатів дериватизації. На рис. 8.8 наведені результати дослідження впливу умов нагрівання пластинки у діапазоні температур (130 ± 10) °С протягом 5–15 хвилин. Як бачимо, забарвлення хроматографічних зон та їх інтенсивність послаблюється за температури нижче 130 °С. Також встановлено, що нагрівання пластини протягом 10 хвилин є достатнім для процесу дериватизації.

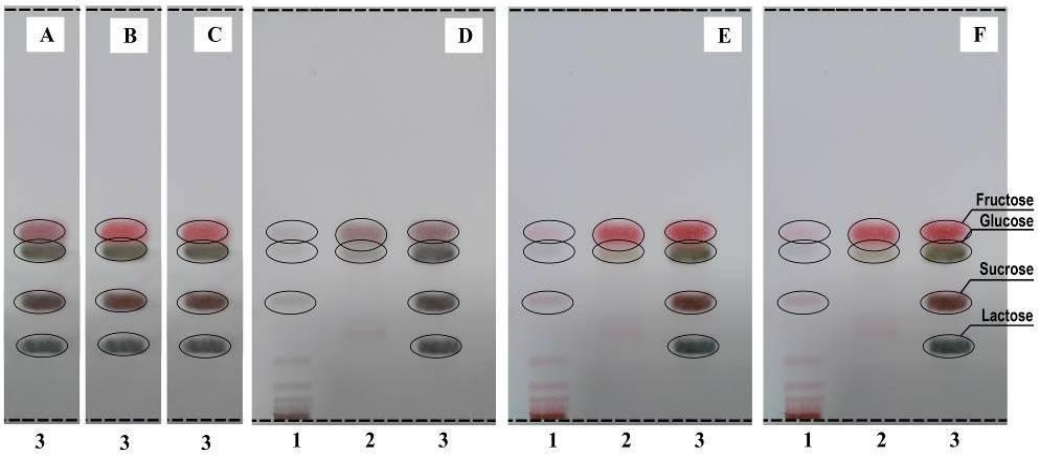


Рис. 8.8. Нагрівання пластини протягом 10 хвилин за 120 °С (A), 130 °С (B), 140 °С (C); тривалість нагрівання 5 (D), 10 (E), 15 (F) хв; 1 — розчин АФІ інуліну до гідролізу, ВР-1; 2 — розчин АФІ інуліну після гідролізу, ВР-2; 3 — розчин стандартних речовин фруктози, глюкози, сахарози та лактози, РП-1, на ТШХ-пластині Silica gel 60 (Merck)

Стабільність результатів хроматографування. Оцінювали стабільність результатів через 5, 15, 30 та 60 хвилин після проведення хроматографування. Упродовж зазначеного часу різниці між досліджуваними зонами виявлено не було.

Прецизійність. У дослідженні прецизійності методики розраховували значення R_f для зон маркерів фруктози та глюкози (ВР-2) у разі дослідження на одній ТШХ пластинці, на різних пластинках та в різні дні, різними аналітиками. Метрологічні характеристики значень R_f для зон фруктози та глюкози, наведені в табл. 8.2.

Таблиця 8.2

Прецизійність значень R_f для зон, що відповідають стандартним речовинам

Аналізована зона	$R_{f\ середнє}$	RSD, %	$R_{f\ максимум}$–$R_{f\ мінімум}$
1	2	3	4
Прецизійність на пластинках одного типу, 1 доба			
TLC Silica gel 60 (Merck) на алюмінієвій підкладці			
Зона, відповідна фруктозі	0,39	0,93	0,01
Зона, відповідна глюкозі	0,34	0,98	0,01
Зона, відповідна сахарозі	0,25	0,89	0,01
Зона, відповідна лактозі	0,15	1,11	0,01

Продовження табл. 8.2

1	2	3	4
TLC Silica gel 60 (Merck) на скляній підкладці			
Зона, відповідна фруктозі	0,49	0,90	0,01
Зона, відповідна глюкозі	0,43	0,77	0,01
Зона, відповідна сахарозі	0,30	1,11	0,01
Зона, відповідна лактозі	0,19	0,87	0,01
Silica gel on TLC (Supelco) на алюмінієвій підкладці			
Зона, відповідна фруктозі	0,43	0,91	0,01
Зона, відповідна глюкозі	0,37	0,98	0,01
Зона, відповідна сахарозі	0,27	0,92	0,01
Зона, відповідна лактозі	0,15	1,08	0,01
Прецизійність на 3 пластинках одного типу, одна доба			
TLC Silica gel 60 (Merck) на алюмінієвій підкладці			
Зона, відповідна фруктозі	0,41	2,27	0,02
Зона, відповідна глюкозі	0,36	2,84	0,02
Зона, відповідна сахарозі	0,26	2,06	0,02
Зона, відповідна лактозі	0,16	2,79	0,01
TLC Silica gel 60 (Merck) на скляній підкладці			
Зона, відповідна фруктозі	0,50	1,47	0,02
Зона, відповідна глюкозі	0,44	2,11	0,02
Зона, відповідна сахарозі	0,30	1,98	0,02
Зона, відповідна лактозі	0,19	2,29	0,01
Silica gel on TLC (Supelco) на алюмінієвій підкладці			
Зона, відповідна фруктозі	0,43	1,96	0,02
Зона, відповідна глюкозі	0,37	2,36	0,02
Зона, відповідна сахарозі	0,28	1,92	0,02
Зона, відповідна лактозі	0,16	1,93	0,01
Внутрішньолабораторна прецизійність			
TLC Silica gel 60 (Merck) на алюмінієвій підкладці			
Зона, відповідна фруктозі	0,41	4,69	0,04
Зона, відповідна глюкозі	0,37	4,92	0,04
Зона, відповідна сахарозі	0,26	4,63	0,03
Зона, відповідна лактозі	0,16	4,84	0,02
TLC Silica gel 60 (Merck) на скляній підкладці			
Зона, відповідна фруктозі	0,49	2,64	0,04
Зона, відповідна глюкозі	0,45	3,12	0,04
Зона, відповідна сахарозі	0,31	3,06	0,03
Зона, відповідна лактозі	0,20	3,36	0,02
Silica gel on TLC (Supelco) на алюмінієвій підкладці			
Зона, відповідна фруктозі	0,50	3,62	0,04
Зона, відповідна глюкозі	0,38	2,52	0,04
Зона, відповідна сахарозі	0,16	3,39	0,02
Зона, відповідна лактозі	0,16	3,39	0,02

8.2. ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ СУПРОВІДНИХ ДОМІШОК МЕТОДОМ ВЕРХ

(*за матеріалами дисертаційної роботи В. А. Чорного [16]*)

Випробовуваний розчин. 10 мл препарату доводять розчинником до 100 мл та перемішують.

Розчин порівняння (a). 1,0 мл випробовуваного розчину доводять розчинником до об'єму 100,0 мл та перемішують. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин порівняння (b). 150 мг СЗ 1-бензил-1Н-індазол-3-ол (бензидаміну домішки С) (BP CRS або каталог «LGC» або аналогічної якості) розчиняють у 50 мл розчинника, за необхідності витримують на УЗ-бані протягом 5 хвилин, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл та перемішують. 1 мл приготованого розчину доводять до 100 мл розчинником та перемішують.

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. 1,0 мл випробовуваного розчину та 1,0 мл розчину порівняння (b) поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл та доводять розчинником до позначки, перемішують. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- ✓ колонка: Grace Alltima розміром 250 × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р з розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи;
- ✓ рухома фаза: 3,0 г натрію перхлорату Р розчиняють у 500 мл води Р, додають 1,0 мл триетиламіну Р, доводять pH хлорною кислотою Р до 3,0, додають 500 мл ацетонітрилу Р та перемішують (рухому фазу готують безпосередньо перед використанням);
- ✓ швидкість рухомої фази — 1 мл/хв;
- ✓ температура термостата колонки — 25 °С;
- ✓ детектування за довжини хвилі 320 нм;
- ✓ час хроматографування — 40 хв.

Хроматографують по 20 мкл розчинника, розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, випробовуваного розчину та розчину порівняння (a). Для дотримання умов придатності хроматографічної системи допускається зміна кількості ацетонітрилу Р у рухомій фазі на 5 %. Порядок виходу піків такий: домішка С, бензидаміну гідрохлорид.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

✓ коефіцієнт розділення між піками бензидаміну гідрохлориду та домішки С на хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи не менше 2,0;

✓ коефіцієнт симетрії для піка бензидаміну на хроматограмі розчину порівняння становить від 0,9 до 1,5;

✓ відносне стандартне відхилення, розраховане для 3-х паралельних інжекцій, для кожного з визначуваних компонентів, у % становить не більше 2,0 %.

✓ *Нормування:*

✓ *домішка С*: площа відповідного піка не має перевищувати 0,5 площі піка домішки С на хроматограмі розчину порівняння (b) (0,5 %);

✓ *неспецифікована домішка:* площа піка кожної неспецифікованої домішки не має перевищувати 0,2 площі піка бензидаміну гідрохлориду на хроматограмі розчину порівняння (a) (0,2 %);

✓ *сума домішок:* має бути не більше 1,5 %;

✓ *не враховують:* піки розчинника, піки з відносним часом утримування меншим за 0,4 відносно піка бензидаміну гідрохлориду, пік метилпарагідроксибензоату та піки, площа яких становить менше 0,1 площі піка бензидаміну гідрохлориду на хроматограмі розчину порівняння (a) (0,1 %).

Дослідження примусової деградації лікарського засобу. Дослідження примусової деградації препарату допомагає виявити можливі продукти деградації, перевірити специфічність методу та довести відсутність коелюювання піків.

Зразок препарату Бензидаміну гідрохлорид спрей 1,5 мг/мл піддавали стрес-тесту для оцінки можливості інтерференції між бензидаміну гідрохлоридом, домішкою С та можливими неідентифікованими продуктами деградації. Досліджували вплив лугу, кислоти, окиснення, фотолізу та температури. Щоб підтвердити природу продуктів деградації, вводили холостий розчин і розчин плацебо.

Дослідження деградації показали, що бензидаміну гідрохлорид стабільний у лужному середовищі, стійкий до дії температури та фотолізу. Значна деградація бензидаміну гідрохлориду відбувалася під час обробки H_2O_2 (окиснення) та кислотою з утворенням відповідно невідомого продукту та домішки С (рис. 8.9).

Невідомий продукт деструкції вивчали за допомогою рідинної хроматографії з мас-спектрометрією. Визначено, що невідомою домішкою був бензидаміну N-оксид із відповідною масою 326, 2 m/z (рис. 8.10).

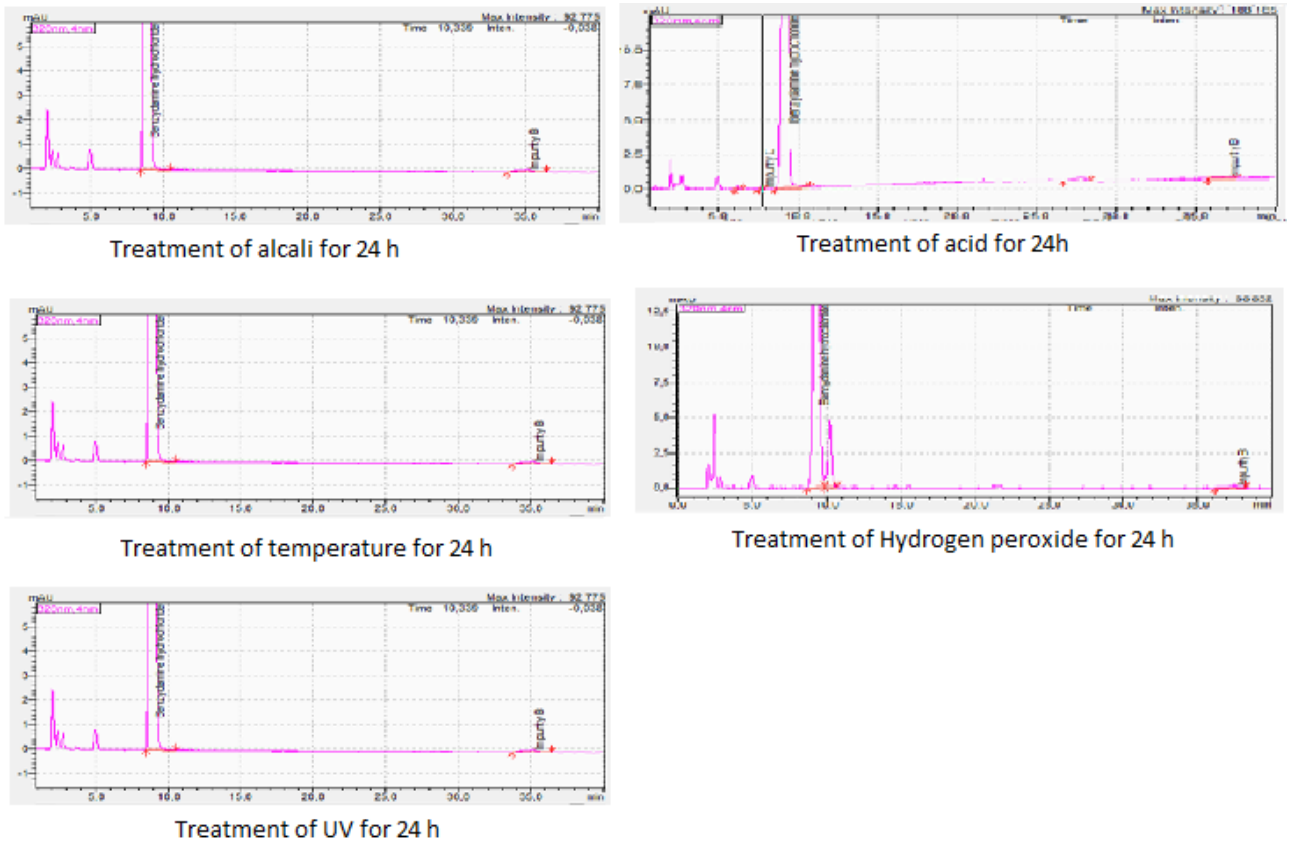


Рис. 8.9. Хроматограми стрес-тестів бензидаміну гідрохлориду
в готовій лікарській формі

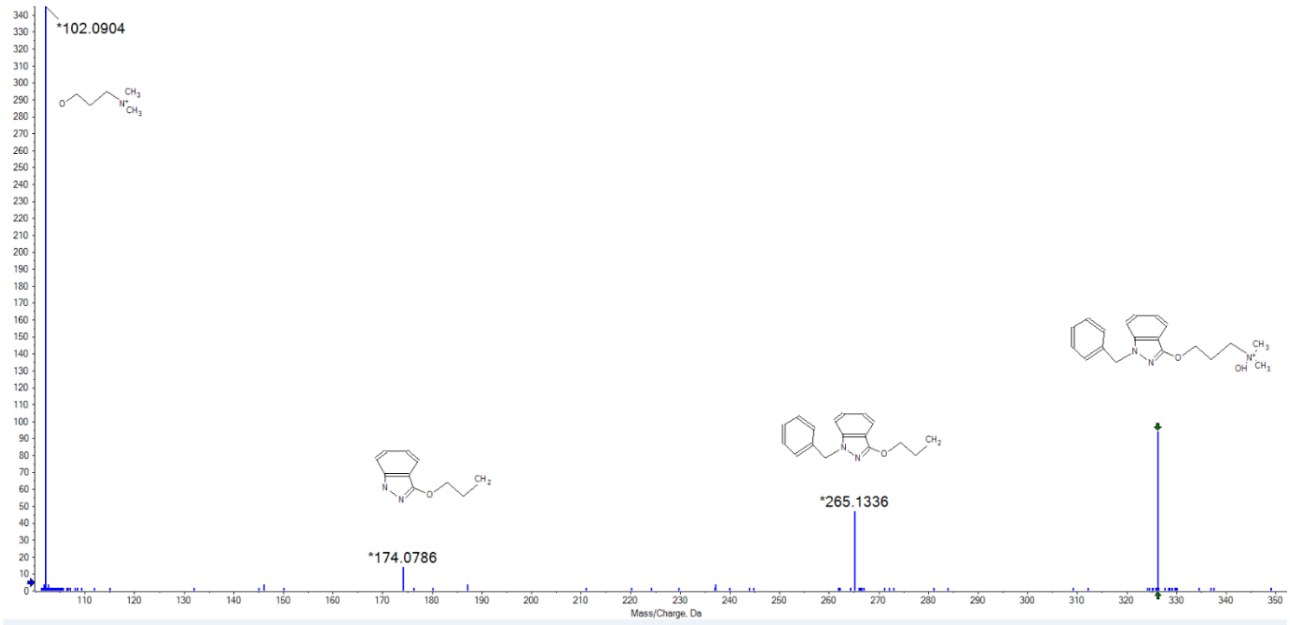


Рис. 8.10. Мас-спектр невідомої домішки
(ідентифікована як домішка — бензидаміну N-оксид)

Коефіцієнт чистоти, отриманий для піка АФІ для всіх зразків складу, підданих стрес-тесту, становив понад 990,00. Піки всіх індивідуальних домішок, що утворювались в результаті стрес-тестів, не перекривали один одного та пік бензидаміну. Метод був визнаний специфічним для всіх потенційних продуктів розпаду бензидаміну (рис. 8.11).

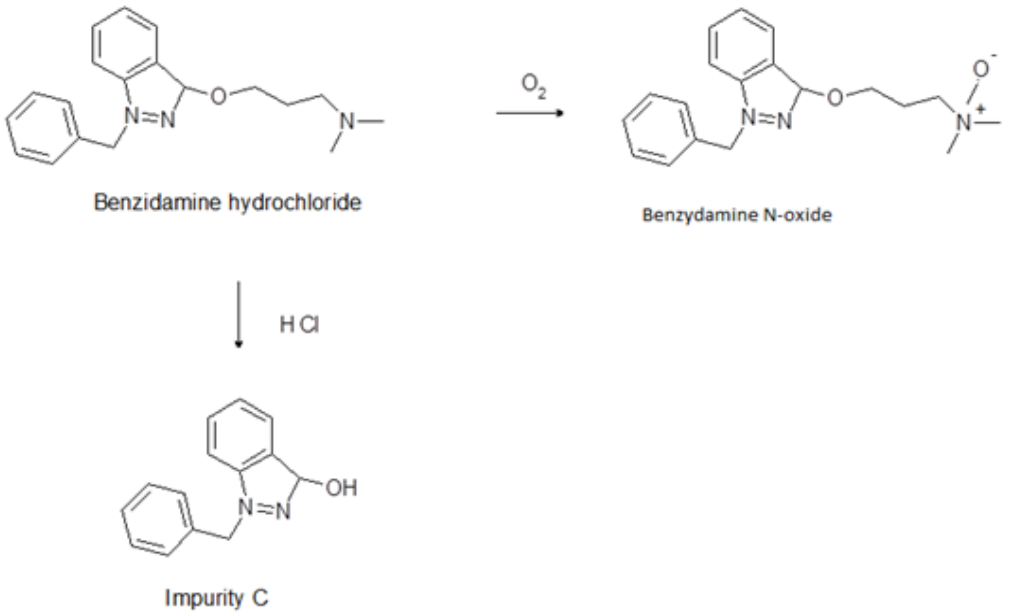


Рис. 8.11. Схема деградації бензидаміну гідрохлориду

Валідація методики визначення супровідних домішок. Розроблена ВЕРХ методика була валідована відповідно до вимог ДФУ та ІСН.

Специфічність ВЕРХ методики може бути встановлена шляхом оцінки роздільної здатності між піками, аналізу чистоти піків та відсутності інтерференції між піками матриці. Було показано, що роздільна здатність між піками домішки С та бензидаміну гідрохлориду на хроматограмі розчину для перевірки придатності системи становить 3,48 (рис. 8.12).

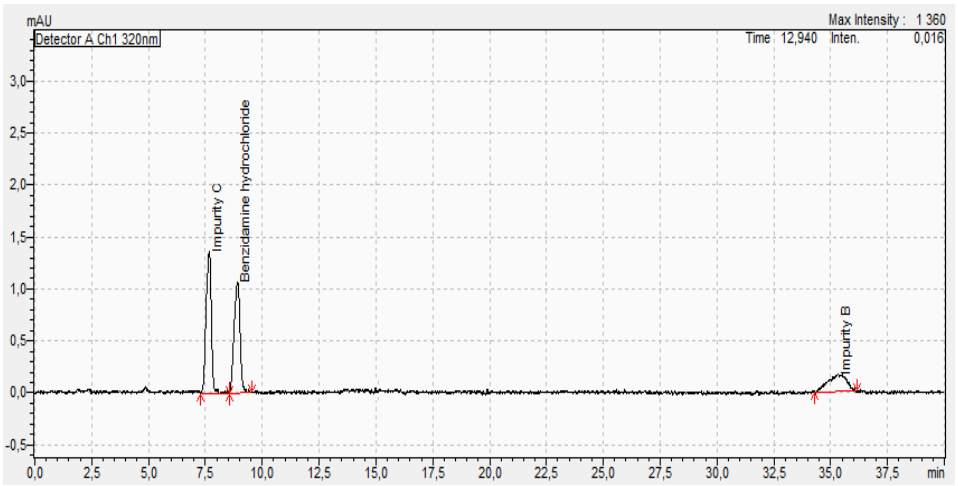


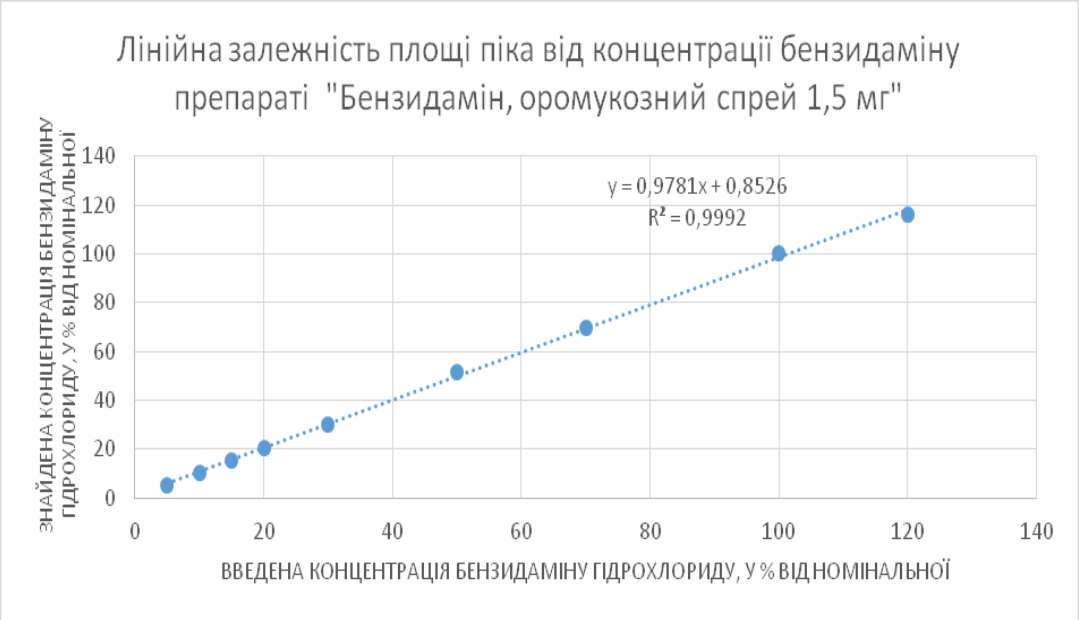
Рис. 8.12. Хроматограма розчину для перевірки придатності хроматографічної системи

Час утримування бензидаміну гідрохлориду на хроматограмі випробуваного розчину збігається з часом утримування бензидаміну гідрохлориду на хроматограмі для перевірки придатності хроматографічної системи. На хроматограмі розчину плацебо не виявлено піків, час утримування яких збігається з часом утримування бензидаміну гідрохлориду або домішки С.

Лінійність, збіжність і правильність для неідентифікованої домішки та домішки С вивчали в діапазоні концентрацій 0,05–1,2 % відносно номінальної концентрації бензидаміну гідрохлориду в складі препарату (1,5 мг/мл). Дев'ять окремих модельних розчинів готували з концентрацією бензидаміну гідрохлориду та домішки С 0,05, 0,1, 0,15 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0, 1,2 % відносно номінальної концентрації бензидаміну гідрохлориду в складі препарату. Кожен розчин уводили тричі.

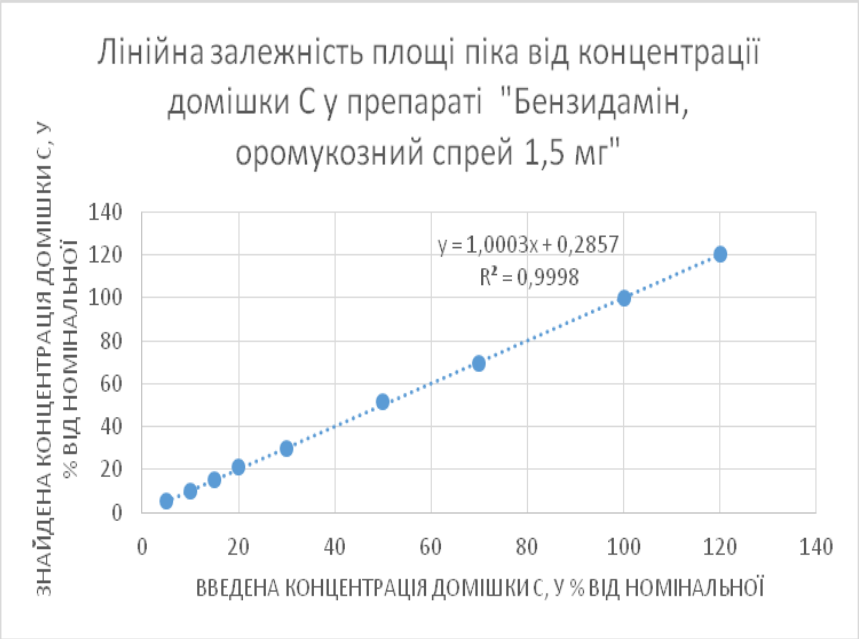
У нормалізованих координатах будували графік залежності концентрації бензидаміну гідрохлориду та домішки С від площі відповідних піків.

Відповідно до експериментальних даних побудовано лінійну залежність у системі нормалізованих координат «введений вміст гідрохлориду бензидаміну» від «знайденого вмісту бензидаміну гідрохлориду», тобто: Y = B • Xi + A (рис. 8.13 (А)). Графік залежності введеної концентрації домішки С від визначеної концентрації побудовано аналогічно (рис. 8.13 (Б)).



А

Рис. 8.13. Графік залежності визначеного вмісту бензидаміну гідрохлориду (**А**) та домішки С (**Б**) від уведеного *(початок)*



Б

Рис. 8.13. Графік залежності визначеного вмісту бензидаміну гідрохлориду (**А**) та домішки С (**Б**) від уведеного *(закінчення)*

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що регламентовані ДФУ. Значення коефіцієнта кореляції для неідентифікованої домішки та домішки С становить понад 0,999. Значення вільного члена рівняння лежать у межах критерію прийнятності та складають 0,85 та 0,29 для неідентифікованої домішки та домішки С відповідно. Методика також характеризується достатньою правильністю та прецезійністю для визначуваних домішок. Виконуються вимоги до критерію незначущості систематичної похибки.

Отже, можна зробити висновок, що методика визначення супровідних домішок в оромукозному розчині та спреї бензидаміну 1,5 мг/мл характеризується достатньою лінійністю, правильністю та збіжністю.

Визначення межі виявлення (LOD) та межі кількісного визначення (LOQ). Межі виявлення та кількісного визначення домішки С і неідентифікованої домішки (табл. 8.3, 8.4) розраховували на основі результатів лінійної регресії, використовуючи значення стандартного відхилення вільного члена рівняння та нахилу лінії регресії калібрувальної кривої.

Таблиця 8.3

Розраховані дані для домішки С та неідентифікованої домішки

Уведено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Неідентифікована домішка		Домішка С		
	знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	знайдено в % до введеного $Z_i = 100\cdot(Y_i/X_i)$ %	уведено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	знайдено в % до введеного $Z_i = 100\cdot(Y_i/X_i)$ %
5	4,91	98,2	5	5,1	102
10	10,31	103,13	10	10,02	100,20
15	15,23	101,53	15	15,49	103,27
20	20,58	102,90	20	20,95	104,75
30	29,86	99,53	30	29,62	98,73
50	51,53	103,83	50	51,41	102,82
70	69,81	99,74	70	69,39	99,13
100	100	100	100	100	100
120	116,23	96,88	120	120,73	100,61
Середнє значення		100,64			101,28
RSD_Z, %		2,35			2,01
Відносний довірчий інтервал $\Delta_Z(\%) = t(95, n - 1) \cdot RSD_Z = 1{,}860 \cdot RSD_Z$, %		4,37			3,74
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As}, % (гранична невизначеність)		5,0			5,0
Систематична похибка $\delta = \lvert\underline{Z} - 100\rvert$		0,64			1,28
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\,\% = \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} = \frac{4{,}37}{3} = 1{,}45$ (0,64 ≤ 1,45) якщо не виконується 1), то δ ≤ 0,32 · 5.0=1.6 % (1,45 ≤ 1,6)		Не виконується Виконується	Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\,\% = \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} = \frac{3{,}57}{3} = 1{,}24$ (1,28 ≥ 1,24)	Виконується	Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\,\% = \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} = \frac{4{,}37}{3} = 1{,}45$ (0,64 ≤ 1,45) якщо не виконується 1), то δ ≤ 0,32 · 5.0 = 1,6 % (1,45 ≤ 1.6)
Загальний висновок про методику		Коректна			Коректна

Таблиця 8.4

Метрологічні характеристики лінійної залежності для неідентифікованої домішки та домішки С

Параметр	Умовне позначення	Критерій прийнятності	Отримане значення для неідентифікованої домішки	Отримане значення для домішки С
Коефіцієнт кореляції	r	0,9976	0,9992	0,9998
Вільний член рівняння	a	≤ 2,1	0,8526	0,2857
Нахил лінії регресії	b	—	0,9780	1,0003
Стандартне відхилення	S_A	—	0,62	0,36
Тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої	S_b	—	0,0102	0,0058
Залишкове стандартне відхилення	S_r	—	1,21	0,69

$$LOD = \frac{3{,}3 \cdot S_A}{B};$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_A}{B}.$$

Було показано, що неідентифіковану домішку можна кількісно визначити за концентрації 0,0633 % відносно концентрації бензидаміну гідрохлориду у випробовуваному розчині, а домішку С — за концентрації 0,0356 % відносно концентрації бензидаміну гідрохлориду у випробовуваному розчині.

Проведено розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння для неідентифікованої домішки (табл. 8.5).

Таблиця 8.5

Межі виявлення та кількісного визначення

Параметр	Бензидаміну гідрохлорид, %	Домішка С, %
LOD	0,0209	0,0118
LOQ	0,0633	0,0356

Результати розрахунків наведено у табл. 8.6.

Розрахунок ΔAs, % проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_As, \% = \sqrt{(\ [\![1{,}025]\!]\ ^2 + [\![3{,}51]\!]\ ^2\ )} = 3{,}66\ \%\text{в}\Delta_Astеор = 5{,}0\ \%.$$

Отже, повна прогнозована невизначеність результатів для визначення неідентифікованої домішки не більше критичного значення $\Delta_{Astеор} = 5{,}0$ %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях:

$$\Delta_{FAO},\ \% = \sqrt{2} \cdot \frac{RSD_{max} \cdot t_{95\ \%,n-1}}{\sqrt{n}};$$

$$\Delta_{FAO},\ \% = \sqrt{2} \cdot \frac{2 \cdot 2{,}92}{\sqrt{3}} = 3{,}51\ \%.$$

Таблиця 8.6

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину для неідентифікованої домішки

Операції пробопідготовки	Невизначеність
Розчин порівняння	
Взяття аліквоти для виготовлення стандартного розчину 1 мл	0,98 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин	
Взяття аліквоти для виготовлення тестового розчину 10 мл	0,25 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0{,}98^2 + 0{,}12^2 + 0{,}25^2 + 0{,}12^2} = 1{,}025$	

Аналогічно розраховували невизначеність для розчинів домішки С (табл. 8.7).

Розрахунок Δ_{As}, % проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_{As},\ \% = \sqrt{0{,}49^2 + 3{,}51^2} = 3{,}54\ \%\text{в}\Delta_{Astеор} = 5{,}0\ \%$$

Отже, невизначеність для домішки С бензидаміну є прийнятною.

Таблиця 8.7

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину для домішки С

Операції пробопідготовки	Невизначеність
Розчин порівняння	
Взяття наважки стандарту	(0,2 мг / 75 мг) · 100 % = 0,26 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	0,25 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин	
Взяття аліквоти препарату 10 мл	0,25 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0{,}26^2 + 0{,}12^2 + 0{,}25^2 + 0{,}12^2 + 0{,}25^2 + 0{,}12^2} = 0{,}49$ %	

Перевірка придатності хроматографічної системи.

Розчин для перевірки придатності системи вводили тричі. Результати вивчення придатності хроматографічної системи наведені в табл. 8.8.

Таблиця 8.8

Придатність хроматографічної системи

Критерії придатності системи			
Площа піка бензидаміну гідрохлориду	*RSD, %*	Симетрія піка бензидаміну гідрохлориду	Розділення між бензидаміну гідрохлоридом та домішкою С
19293	1,43	1,005	3,48
19269			
19801			

Примітка. RSD, % — відносне стандартне відхилення у %.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі вимоги:

- ✓ роздільна здатність між піками бензидаміну та домішкою С складає не менше 2,0;
- ✓ коефіцієнт симетрії для піка бензидаміну з хроматограм розчину порівняння становить від 0,8 до 1,2;
- ✓ відносне стандартне відхилення, розраховане для 3-х паралельних інжекцій, для кожного з визначуваних компонентів становить не більше 2,0 %

Робасність методу була показана шляхом вивчення надійності хроматографічної методики та стабільності випробовуваних розчинів у часі.

Як видно з одержаних есперимента́льних результатів (табл. 8.9), випробовуваний розчин є стабільним і придатним для аналізу упродовж 48 годин.

Таблиця 8.9

Стабільність розчинів у часі

Термін зберігання	Відхилення площі піка домішки С (S(TS)/S(RS)) відносно контролю, %	
	отримане значення	критерій прийнятності
Контрольний розчин	—	—
48 години	0,56 %	≤ 5 %

Примітка. S(TS)/S(RS), % — співвідношення площ піків випробовуваного та стандартного розчину у %.

Надійність хроматографічної методики. Оцінювали за впливом на результати аналізу швидкості потоку (табл. 8.8) та pH розчину (табл. 8.9).

А. Швидкість потоку — стандартний та випробовуваний розчини вводили тричі зі швидкістю потоку рухомої фази 1,0, 0,9 та 1,1 мл/хв (табл. 8.10).

Таблиця 8.10

Вплив швидкості потоку

Швидкість потоку	Відхилення площі піка домішки С, S(TS)/S(RS), %	
	отримане значення	критерій прийнятності
1,0 ml/min	—	—
0,9 ml/min	0,39 %	≤ 5 %
1,1 ml/min	1,48 %	

Примітка. S(TS)/S(RS), % — співвідношення площ піків випробуваного та стандартного розчину у %.

Б. pH рухомої фази — стандартний та випробовуваний розчини вводили тричі зі зміною pH рухомої фази (табл. 8.11).

Таблиця 8.11

Вплив pH рухомої фази

pH рухомої фази	Відхилення площі піка домішки С (S(TS)/S(RS)) відносно контрольного значення pH, %	
	отримане значення	критерій прийнятності
pH 3,0	—	—
pH 2,0	1,44 %	≤ 5 %
pH 4,0	1,79 %	

Примітка. S(TS)/S(RS), % — співвідношення площ піків випробовуваного та стандартного розчину у %.

Установлено, що коливання швидкості потоку та pH не мають суттєвого впливу на результати аналізу.

Отже, показано, що метод відповідає валідаційним вимогам і може бути застосований для визначення та кількісної оцінки потенційних продуктів деградації у складних препаратах бензидаміну гідрохлориду.

8.3. ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БЕНЗИДАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ ТА МЕТИЛПАРАБЕНУ МЕТОДОМ ВЕРХ

(за матеріалами дисертаційної роботи В. А. Чорного [16])

Хроматографію проводили за таких умов:

— хроматографічна колонка GraceAlltima C18 (250 × 4,6 мм, розмір частинок — 5 мкм);

— рухому фазу готували таким чином: 3,0 перхлорату натрію розчиняли у 500 мл води, потім додавали 1,0 мл триетиламіну, доводили pH до 3,0 хлоридною кислоти і додавали 500 мл ацетонітрилу;

— швидкість потоку — 1 мл/хв;

— детектування проводили за довжини хвилі 320 і 254 нм;

— температура колонки кімнатна;

— об’єм введення стандартного та випробовуваного розчинів — 20 мкл.

Приготування розчинів:

Випробовуваний розчин. 5 мл препарату доводять розчинником до 50 мл та перемішують.

Розчин порівняння. 75 мг стандартного зразка бензидаміну гідрохлориду та 50 мг стандартного зразка метилпарабену розчиняють у 30 мл розчинника, доводять до об'єму 50 мл і перемішують. 5 мл отриманого розчину доводять до об'єму 50 мл розчинником та перемішують.

Придатність хроматографічної системи оцінюють за такими критеріями:

✓ Відносне стандартне відхилення для площі піка бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену із хроматограм стандартного розчину, не має перевищувати 0,5 % для трьох парлельних інжекцій.

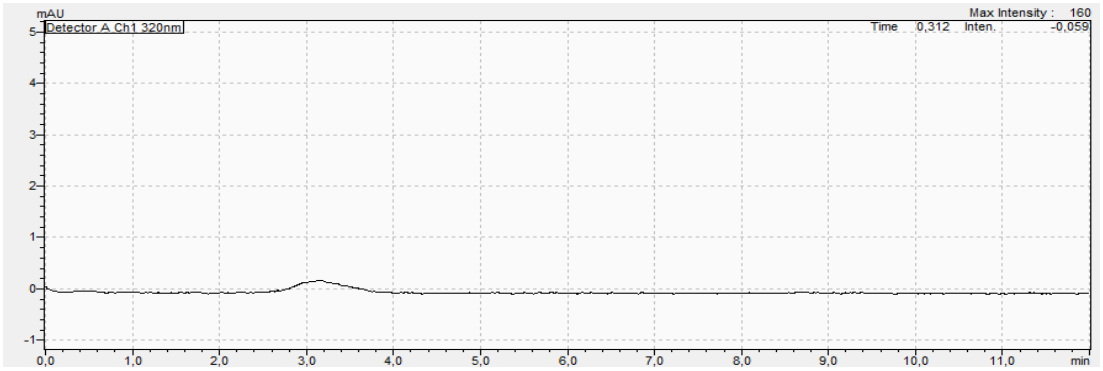
✓ Коефіцієнт симетрії для піків бензидаміну та метилпарабену має становити не більше 2,0.

Валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом ВЕРХ. Розроблена ВЕРХ методика була валідвана відповідно до вимог ДФУ та ICH Q2.

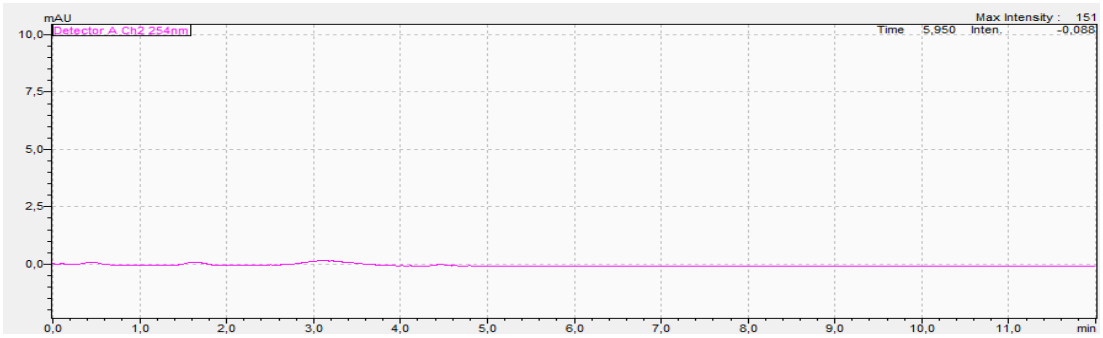
Специфічність. Рухому фазу, розчинник, розчин плацебо, модельний розчин плацебо 1 та модельний розчин плацебо 2, стандартний та випробовуваний розчини вводили в умовах методики. Специфічність методу була продемонстрована відсутністю інтерференіції між піками аналітів та піками плацебо на хроматограмах випробовуваного розчину. Приклади хроматограм рухомої фази та випробовуваного розчину за довжин хвиль 320 та 254 нм наведено на рис. 8.14, 8.15. Тобто методика є специфічною для визначених аналітів.

Лінійність методики кількісного визначення для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену вивчалася у діапазоні концентрацій 80–120 % відносно концентрації відповідних аналітів у випробовуному розчині. Для кожного з аналітів готували і хроматографували в умовах методу дев'ять модельних розчинів. Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів. Графіки лінійної залежності кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду в умовах описаної методики в нормалізованих координатах наведено на рис. 8.16 (А), метилпарабену — 8.16 (Б).

Отримані результати для лінійності методики визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену наведені в табл. 8.12.

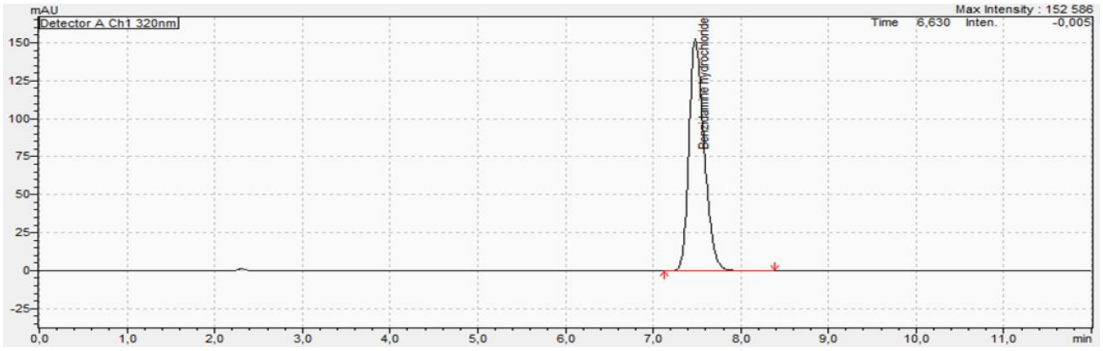


А

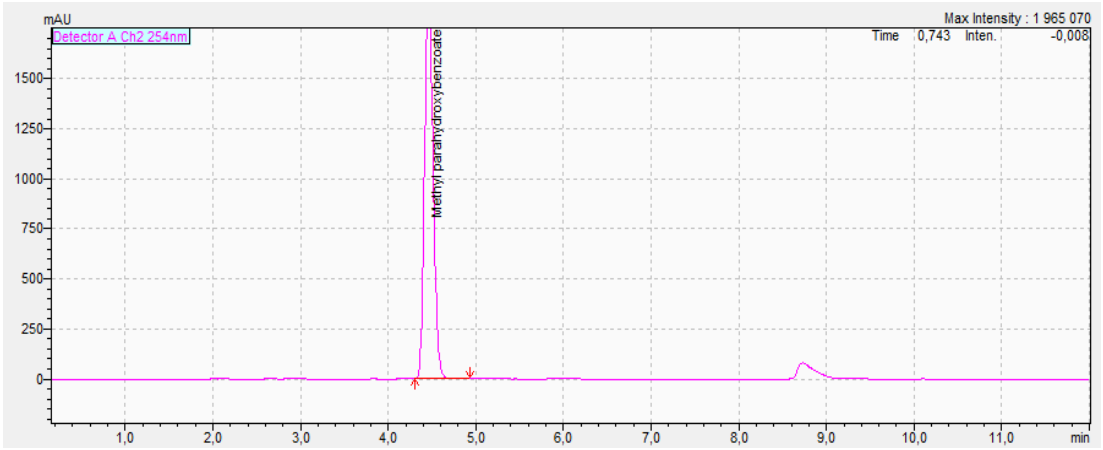


Б

Рис. 8.14. Хроматограми плацебо за 320 нм (**А**) та 254 нм (**Б**)



А



Б

Рис. 8.15. Хроматограми випробовуваного розчину за 320 нм (**А**) та 254 нм (**Б**)

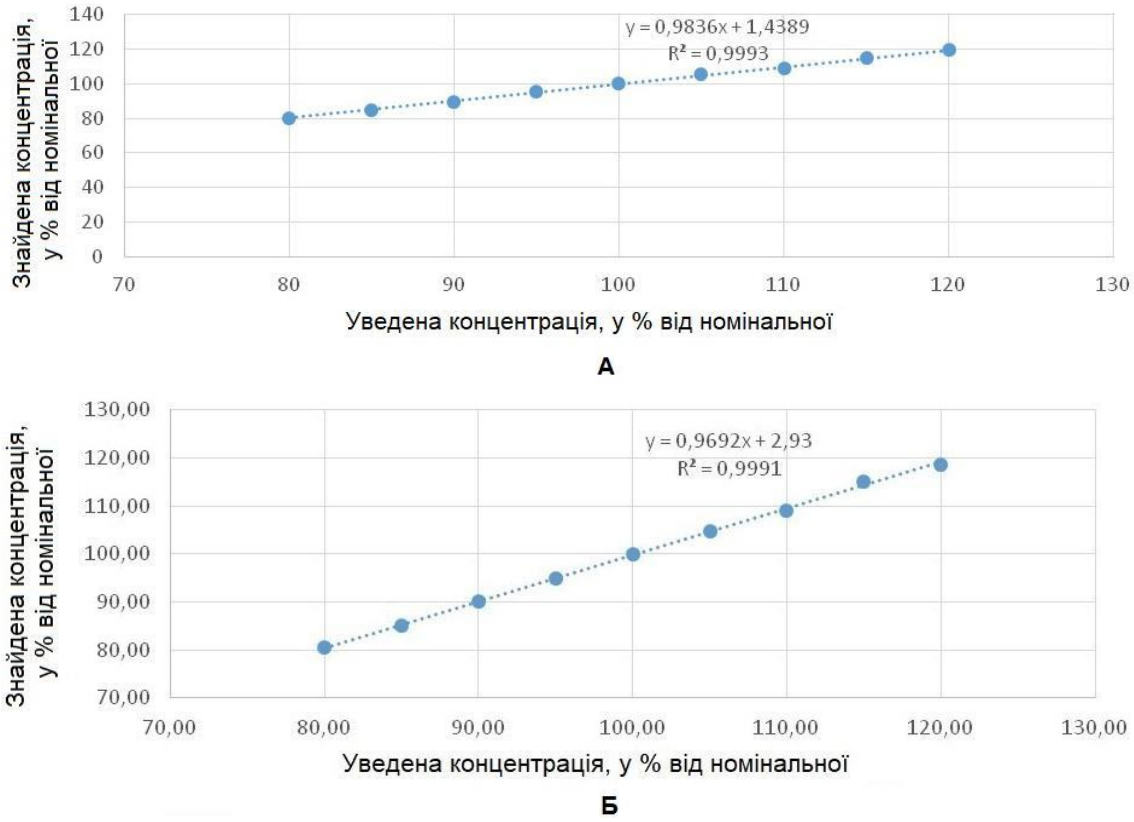


Рис. 8.16. Графік лінійної залежності (введено/знайдено) концентрації від площі піка для бензидаміну гідрохлориду (**А**) та метилпарабену (**Б**) в препараті Бензидамін, оромукозний спрей 1,5 мг

Таблиця 8.12

Метрологічні характеристики лінійної залежності для бензидаміну та метилпарабену

Параметр	Умовне позначення	Критерій прийнятності для допуску 95–105 %	Отримане значення для бензидаміну гідрохлориду	Критерій прийнятності для допуску 90–110 %	Отримане значення метил-парабену
Коефіцієнт кореляції	r	≥ 0,9981	0,9993	≥ 0,9924	0,9991
Вільний член рівняння	a	≤ 2,6	1,438	≤ 5,1	0,293
Нахил лінії регресії	b	—	0,0098		0.9692
Стандартне відхилення	S_A	—	0,99		1,12
Тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої	S_b	—	0,0102		0,0110
Залишкове стандартне відхилення	S_r	≤ 0,84	0,38	≤ 1,69	0,43

Отримані результати показують, що метод є лінійним для визначених речовин. Коефіцієнт кореляції становить понад 0,999 для обох речовин. Відносне стандартне відхилення лежить у межах 1,0 % для обох аналітів.

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики — систематична похибка методики (0,18 для бензидаміну та 0,10 для метилпарабену) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 80 до 120 % (табл. 8.13).

Методика аналізу також відповідає вимогам прецизійності (збіжності), оскільки знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Z (0,73 для бензидаміну та 0,99 для метилпарабену) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 та 3,2 % відповідно) (табл. 8.13).

Внутрішньолабораторна прецизійність

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 5 пробах однієї серії препарату, двома аналітиками, в різні дні, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta\overline{Z} \leq 1{,}6$ (за В = 5 %) та ≤ 3,2 (за В = 10 %).

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату ($\Delta\overline{Z}$ = 0,24 % для бензидаміну та 0,16 % для метилпарабену) задовольняє критерію прийнятності (≤ 1,6 % для бензидаміну та 3,2 % для метилпарабену). Результати вивчення внутрішньолабораторної прецезійності наведені в табл. 8.14, 8.15.

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату (Δ = 0,24 % для бензидаміну та 0,16 % для метилпарабену) задовольняє критерію прийнятності (≤ 1,6 % для бензидаміну та 3,2 % для метилпарабену).

Невизначеність кінцевої аналітичної операції розраховували за співвідношенням

$$\Delta_{FAO},\ \% = \sqrt{2} \cdot \frac{RSD_{max} \cdot t_{95\ \%,n-1}}{\sqrt{n}},$$

де: RSD_{max} — відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи; $t_{95\ \%,n-1}$ — односторонній коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %; n — число паралельних хроматограм.

Таблиця 8.13

Результати визначення лінійності для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену

Введено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Бензидаміну гідрохлорид		Метилпарабен		
	знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ %	уведено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/ X_i)$ %
80	80,13	100,16	80,00	80,47	100,59
85	84,81	99,78	85,00	85,17	100,20
90	89,69	99,66	90,00	90,09	100,10
95	95,31	100,33	95,00	95,03	100,03
100	100	100,00	100,00	100,00	100,00
105	105,16	100,15	105,00	104,88	99,89
110	109,01	99,10	110,00	109,17	99,25
115	114,78	99,81	115,00	115,22	100,19
120	119,3	99,42	120,00	118,62	98,85
Середнє значення		99,82			99,90
RSD_Z, %		0,39			0,53
Відносний довірчий інтервал $\Delta_Z(\%) = t(95, n - 1) \cdot RSD_Z = 1{,}860 \cdot RSD_Z$, %		0,73			0,99
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As}, % (гранична невизначеність)		1,6			3,2
Систематична похибка $\delta = \lvert \underline{Z} - 100 \rvert$		0,18			0,10
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\,\% = \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} = \frac{0{,}73}{3} = 0{,}24$ (0,18 ≤ 0,24) якщо не виконується 1), то $\delta \le 0{,}32 \cdot 5{,}0 = 1{,}6$ % (0,24 ≤ 1,6)	Не виконується Виконується		Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\,\% = \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} = \frac{0{,}99}{3} = 0{,}33$ (0,3 3≥ 0,10) якщо не виконується 1), то $\delta \le 0{,}32 \cdot 10 =$ 3,2 % (0,33 ≤ 3,2)	Не виконується Виконується	Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\,\% = \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} = \frac{0{,}73}{3} = 0{,}24$ (0,18 ≤ 0,24) якщо не виконується 1), то $\delta \le 0{,}32 \cdot 5{,}0 =$ 1,6 % (0,24 ≤ 1.6)
Загальний висновок про методику		Коректна			Коректна

Таблиця 8.14

Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену

№ розчину	Бензидаміну гідрохлорид		Метилпарабен	
	величина Z_i, %		величина Z_i, %	
	1 аналітик	2 аналітик	1 аналітик	2 аналітик
1	99,81	100,63	100,31	100,16
2	99,79	100,34	100,24	99,66
3	100,02	100,28	99,76	99,78
4	100,18	100,57	99,91	100,38
5	99,93	100,11	100,42	99,79
Середнє $\bar{Z}$ (%), $\bar{Z}(\%) = \frac{1}{5}\sum Z_i$	99,94	100,38	100,128	99,954
Об'єднане середнє	100,17		100,041	
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%), $RSD_Z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{15}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$	0,31		0,20	
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{Z}} = t(95\%, 14) \times \frac{RSD_Z}{\sqrt{5}}$	$1{,}76 \cdot 0{,}31/\sqrt{5} = 0{,}24 \leq 1{,}6$		$1{,}76 \cdot 0{,}31/\sqrt{5} = 0{,}16 \leq 3{,}2$	
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As}, %	1,6		3,2	

Таблиця 8.15

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину бензидаміну гідрохлориду

Операції пробопідготовки	Невизначеність
Розчин порівняння	
Взяття наважки стандарту	(0,2 мг/150 мг) · 100 % = 0,13 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	0,25 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин	
Взяття аліквоти препарату 10 мл	0,25 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0{,}13^2 + 0{,}12^2 + 0{,}25^2 + 0{,}12^2 + 0{,}25^2 + 0{,}12^2} = 0{,}42$	

Тобто невизначеність кінцевої аналітичної операції склала:

$$\Delta_{FAO},\ \% = \sqrt{2} \cdot \frac{0{,}5 \cdot 2{,}92}{\sqrt{3}} = 1{,}18\ \%.$$

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально припустиму невизначеність результатів аналізу для допусків вмісту ± 5,0 % складає max $\Delta_{As} \leq 1{,}6$ %.

Розрахунок Δ_{As}, % проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_{As},\ \% = \sqrt{0{,}42^2 + 1{,}18^2} = 1{,}25\ \%\text{в}\Delta_{As\text{теор}} = 1{,}6\ \%.$$

Отже, повна прогнозована невизначеність результатів для тесту кількісне визначення бензидаміну гідрохлориду методом ВЕРХ не більше критичного значення $\Delta_{Astеор} = 1{,}6$ %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Аналогічно розраховували невизначеність для визначення метилпарабену (табл. 8.16).

Таблиця 8.16

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину метилпарабену

Операції пробопідготовки	Невизначеність
Розчин порівняння	
Взяття наважки стандарту	(0,2 мг/100мг) · 100 % = 0,2 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	0,25 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин	
Взяття аліквоти препарату 10 мл	0,25 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0{,}2^2 + 0{,}12^2 + 0{,}25^2 + 0{,}12^2 + 0{,}25^2 + 0{,}12^2} = 0{,}46$ %	

Невизначеність кінцевої аналітичної операції склала:

$$\Delta_{FAO},\ \% = \sqrt{2} \cdot \frac{0{,}5 \cdot 2{,}92}{\sqrt{3}} = 1{,}18\ \%.$$

Сумарна невизначеність:

$$\Delta_{As},\ \% = \sqrt{0{,}46^2 + 1{,}18^2} = 1{,}27\ \%\text{а}\Delta_{As\text{теор}} = 3{,}2\ \%.$$

Повна прогнозована невизначеність результатів для тесту кількісне визначення метилпарабену методом ВЕРХ не більше критичного значення $\Delta_{Астеор}$ = 3,2 %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Придатність хроматографічної системи. Стандартний розчин вводили п'ять разів. Результати наведені в таблицях 8.17–8.19.

Робасність методики була підтверджена шляхом вивчення надійності хроматографічної процедури та стабільності випробовуваних розчинів.

Стабільність розчинів досліджували шляхом введення одних і тих же розчинів з різницею у 24 та 48 годин. Результати дослідження стабільності розчину наведені в таблиці 8.20.

Робасність методики була показана шляхом варіації таких хроматографічних параметрів, як: зміна pH у діапазоні ± 1,0; зміна швидкості потоку в межах ± 10 %; затримка часу проведення аналізу на 24 та 48 годин. Отримані дані свідчать, що результати аналізу є надійними і не залежать від незначних змін параметрів методики.

Результати дослідження робасності наведені у табл. 8.21, 8.22.

Отже, розроблена аналітична методика є швидкою, специфічною, робасною, точною та лінійною. Результати валідації вказують на те, що методика відповідає своєму призначенню і може бути використана для одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену. Запропонована оригінальна методика одночасного визначення бензидаміну та метилпарабену в спреї оромукозному, що відповідає принципу «зеленої аналітичної хімії» щодо одночасного визначення декількох компонентів.

Таблиця 8.17

Розраховані дані для піка бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену

Бензидаміну гідрохлорид			Метилпарабен		
Площа піка	RSD, %	Коефіцієнт симетрії	Площа піка	RSD, %	Коефіцієнт симетрії
1906339	0,02	1,15	13944562	0,07	1,101
1906741			13956871		
1906668			13962528		
1905940			13953774		
1905940			13958145		

Примітка. RSD, % — відносне стандартне відхилення у %.

Таблиця 8.18

Критерії придатності хроматографічної системи

Аналіт	Параметр	Отримане значення	Критерій прийнятності
Бензидаміну гідрохлорид	Коефіцієнт симетрії піка	1,15	0,8–1,2
	Відносне стандартне відхилення для площі піка бензидаміну гідрохлориду з хроматограм розчину порівняння, %	0,02	≤ 0,5 %
Метилпарабен	Коефіцієнт симетрії піка	1,107	0,8–1,2
	Відносне стандартне відхилення для площі піка метилпарабену порівняно з хроматограм розчину порівняння, %	0,07	≤ 0,5 %

Таблиця 8.19

Результати вивчення стабільності розчину

Термін зберігання	0 годин	24 години	48 годин
	Бензидаміну гідрохлорид		
Різниця між площами піків стандартного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	1,68	3,70
Різниця між площами піків випробовуваного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,22	0,63
	Метилпарабен		
Різниця між площами піків стандартного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	1,67	3,63
Різниця між площами піків випробовуваного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,24	0,69

Таблиця 8.20

Результати вивчення впливу швидкості потоку

Швидкість потоку, мл/хв	Різниця між площами піків бензидаміну гідрохлориду S(TS)/S(RS) відносно встановлених умов, %	Різниця між площами піків метилпарабену S(TS)/S(RS) відносно встановлених умов, %
1,0	—	—
0,9	0,19	0,15
1,1	0,28	0,20

Таблиця 8.21

Результати вивчення впливу pH

pH рухомої фази	Різниця між площами піків бензидаміну гідрохлориду S(TS)/S(RS) відносно встановлених умов, %	Різниця між площами піків метилпарабену S(TS)/S(RS) відносно встановлених умов, %
pH 3,0	—	—
pH 2,0	0,46	0,37
pH 4,0	0,72	1,10

8.4. ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БЕНЗИДАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ ТА МЕТИЛПАРАБЕНУ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

(за матеріалами дисертаційної роботи В. А. Чорного [16])

Приготування вихідного розчину. Стандартні зразки бензидаміну гідрохлориду (150 мг) та метилпарабену (100 мг) зважують та розчиняють окремо у 100 мл води, трохи нагріваючи, для отримання розчину з кінцевою концентрацією 1,5 мг/мл бензидаміну гідрохлориду та 1,0 мг/мл для метилпарабену.

Приготування розчину внутрішнього стандарту. 150 мг домішки бензидаміну А (внутрішній стандарт) зважують і розчиняють у 100 мл води для отримання розчину з кінцевою концентрацією 1,5 мг/мл.

Приготування стандартного розчину. По 5 мл вихідного розчину і розчину внутрішнього стандарту переносять у колбу об'ємом 50 мл, розчиняють у 10 мл хлороформу і доводять об'єм розчину водою до 50 мл. Після інтенсивного струшування приготованого розчину хлороформний шар відокремлюють і використовують для аналізу.

Приготування випробовуваного розчину. Препарат, що містить бензидаміну гідрохлорид та метилпарабен, беруть у кількості 5 мл і переносять у мірну колбу об'ємом 50 мл. Додають 5 мл розчину внутрішнього стандарту і 10 мл хлороформу. Об'єм отриманого розчину доводять водою до 50 мл. Після інтенсивного струшування приготованого розчину хлороформний шар відокремлюють і використовують для аналізу.

Скринінг нерухомої фази. Полярність нерухомої фази є ключовим фактором для успішного розділення компонентів у газовій хроматографії. Використання колонок з полярною фазовою, відмінною від полярності аналітів, може призвести до розмивання піків, поганого утримування та незадовільної селективності методики, що, нарешті,

призводить до неправильних результатів кількісного визначення аналітів. Тому вибір нерухомої фази є ключовим фактором аналізу. Оскільки бензидамін та метилпарабен є висококиплячими речовинами, у виборі колонки ми відштовхувались від термічно стабільної фази. Використовували фази різної полярності: HP-IINNOWAX (ПЕГ), HP-FFAP (ПЕГ, модифікований нітротерефталевою кислотою), DB-624 (6 % ціанопропілфеніл/94 % диметил (полі) силоксан) та HP-5 (5 % дифеніл/95 % диметил (полі) силоксан).

Для аналізованих речовин найкраща селективність та симетрія піків спостерігалися у разі використання неполярної фази HP-5 з геометрією колонки 30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм (рис. 8.17).

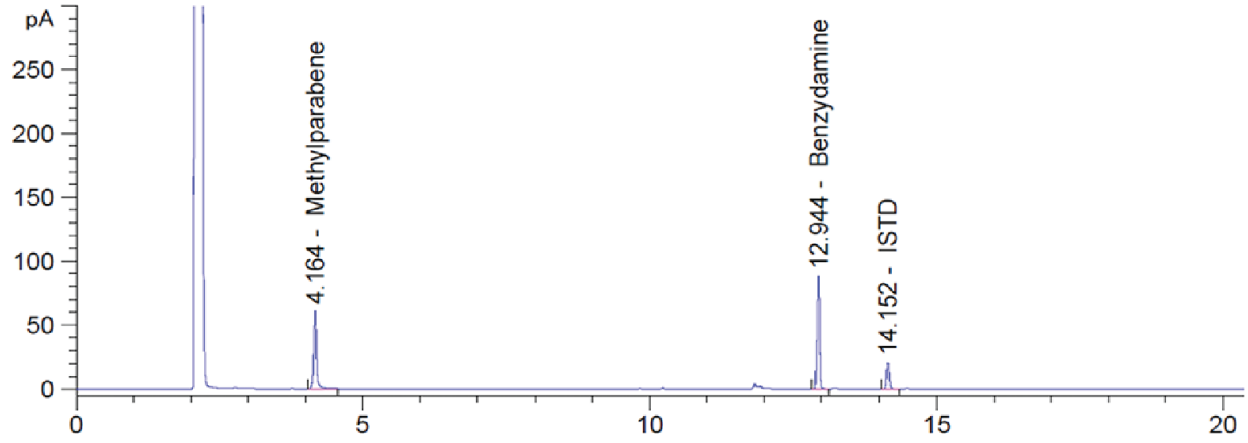


Рис. 8.17. Хроматограма бензидаміну та метилпарабену на колонці HP-5

Вибір параметрів інжектора. Щоб уникнути перевантаження колонки, у хроматограф вводили 1 мкл випробовуваного розчину. Враховуючи концентрацію аналітів у випробовуваному розчині, було обрано розведення 1:20. Враховуючи високі температури кипіння бензидаміну та метилпарабену (474 та 265 °С відповідно), а також суттєву різницю у температурі кипіння, необхідно було обрати таку температуру інжектора, яка забезпечить рівномірне випаровування аналітів та водночас не спричинить дискримінації компонентів зразка. Випробовували за температур: 230, 270 та 300 °С. Перші два варіанти не забезпечували достатньої енергії для випаровування бензидаміну, тоді як за температури 300 °С спостерігалася достатня відтворюваність площ піків без деградації аналітів.

Як вставки у лайнер використовували деактивоване скловолокно.

Вибір температурної програми хроматографії. У разі різниці температур кипіння аналізованих речовин, а також різниці хімічних властивостей ізотермічний

режим поділу дав істотну різницю у часі утримування бензидаміну та метилпарабену. Під час попередніх досліджень було встановлено, що метилпарабен елююється за температури 220 °С. За такої температури час утримування бензидаміну становить близько 30 хвилин. Оптимальна температура для елюювання бензидаміну становила 270 °С. Тому під час вибору градієнта температур була встановлена програма терморегулятора з початковою температурою 220 °С протягом 5 хвилин з подальшим підвищенням до температури 270 °С зі швидкістю 20 °С/хв і часом витримування 10 хв.

Для запобігання конденсації зразка в детекторі його температуру встановлювали на 30 °С вище, ніж кінцеву температуру термостата.

Отже, хроматографію проводили за таких умов:

— інжектор: температура — 300 °С; розведення зразка 1:20;

— колонка: HP-5 (30 м × 0,32 мм) з розміром частинок 0,25 мкм;

— газ-носій: гелій;

— детектор: полуменево-іонізаційний; температура — 300 °С;

— температурна програма: початкова температура — 220 °С протягом 5 хвилин з подальшим підвищенням до температури 270 °С зі швидкістю 20 °С/хв і часом витримування 10 хв;

— швидкість потоку — 3 мл/хв;

— об'єм введення — 1 мкл.

Придатність системи оцінювали за такими параметрами:

✓ Відносне стандартне відхилення для площі піка бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену із хроматограм стандартного розчину не має перевищувати 0,5 % для трьох паралельних інжекцій.

✓ Коефіцієнт симетрії для піків бензидаміну та метилпарабену має становити не більше 2,0.

Валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом газової хроматографії проводилася за такими параметрами:

Лінійність для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену. Співвідношення знайденої кількості бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену (Y) до заданої кількості (X), тобто залежність виду $Y = B \bullet X + A$, визначали за допомогою методу найменших квадратів для дев'яти модельних розчинів бензидаміну гідрохлориду. Результати наведено на рис. 8.18.

Метрологічні характеристики лінійної залежності для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену розраховані дані лінійності наведені в табл. 8.22, 8.23.

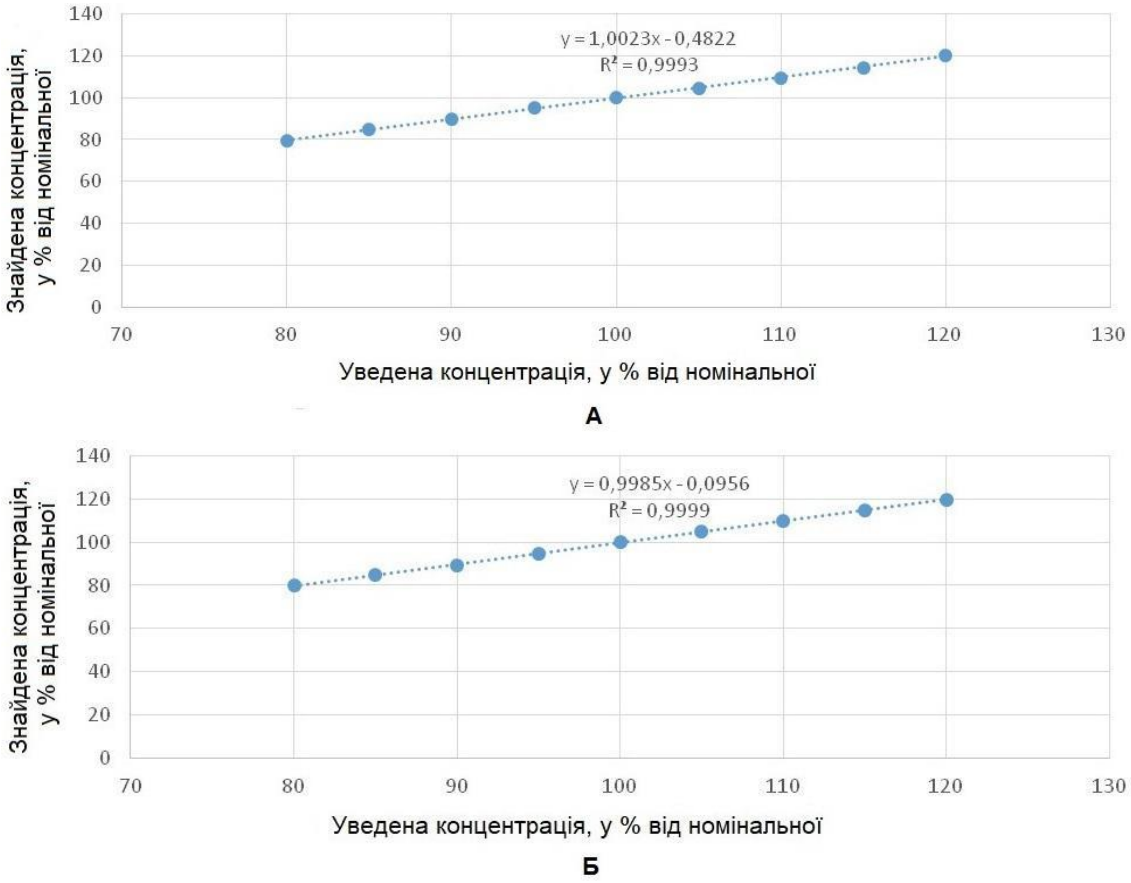


Рис. 8.18. Графік лінійної залежності (введено/знайдено) концентрації від площі піка для бензидаміну гідрохлориду (**А**) та метилпарабену (**Б**) в препараті Бензидамін, оромукозний спрей 1,5 мг

Таблиця 8.22

Метрологічні характеристики лінійної залежності для бензидаміну та метилпарабену

Параметр	Умовне позначення	Критерій прийнятності для допуску 95–105 %	Отримане значення для бензидаміну гідрохлориду	Критерій прийнятності для допуску 90–110 %	Отримане значення метил-парабену
Коефіцієнт кореляції	r	≥ 0,9981	0,9993	≥ 0,9924	0,9999
Вільний член рівняння	a	≤ 2,6	0,4822	≤ 5,1	0,0956
Нахил лінії регресії	b	—	1,0023		0,9985
Стандартне відхилення	S_A	—	1,02		1,02
Тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої	S_b	—	0,0101		0,0101
Залишкове стандартне відхилення	S_r	≤ 0,84	0,3926	≤ 1,69	0,39

Таблиця 8.23

Розраховані дані лінійності для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену

Уведено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Бензидаміну гідрохлорид		Метилпарабен		
	знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	знайдено в % до введеного $Z_i = 100\cdot(Y_i/X_i)$ %	уведено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	знайдено в % до введеного $Z_i = 100\cdot(Y_i/X_i)$ %
80	79,57	99,46	80,00	79,87	99,84
85	84,75	99,71	85,00	84,73	99,68
90	89,66	99,63	90,00	89,49	99,43
95	95,15	100,16	95,00	94,86	99,85
100	99,96	99,96	100,00	99,96	99,96
105	104,62	99,63	105,00	104,76	99,77
110	109,47	99,52	110,00	109,74	99,77
115	114,18	99,29	115,00	114,70	99,74
120	120,40	100,33	120,00	119,68	99,73
Середнє значення		99,79		99,75	99,90
RSD_Z, %		0,34		0,15	0,53
Відносний довірчий інтервал $\Delta_Z(\%) = t(95, n-1)\cdot RSD_Z = 1{,}860\cdot RSD_Z$, %		0,63		0,28	0,99
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As}, % (гранична невизначеність)		Відповідає (0,63 < 1,6)		Відповідає (0,28 < 3,2)	3,2
Систематична похибка $\delta = \lvert\underline{Z} - 100\rvert$		0,21		0,25	0,10
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\,\% = \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} = \frac{0{,}73}{3} =$ 0,24 (0,18 ≤ 0,24) якщо не виконується 1), то δ ≤ 0,32 · 5,0=1,6 % (0,24 ≤ 1,6)		Відповідає (0,21 < 0,51)	Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\,\% = \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} = \frac{0{,}99}{3} = 0{,}33$ (0,33 ≥ 0,10) якщо не виконується 1), то δ ≤ 0,32 · 10 = 3,2 % (0,33 ≤ 3,2)	Відповідає (0,25 < 1,02)	
Загальний висновок про методику		Коректна		Коректна	

Отже, отримані результати показують задовільну лінійність, правильність та повторюваність методики для визначення бензидаміну гідрохлориду. Коефіцієнт кореляції лінійної регресії становить понад 0,999 у діапазоні визначення 80–120 % що відповідає вимогам критерію прийнятності (0,998) і підтверджує лінійність залежності між «введеною» і «знайденою» кількістю досліджуваної речовини.

Методика аналізу також характеризується достатньою прецизійністю, так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Z (0,63) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 %).

Отримані результати показують, що методика є лінійною для визначення метилпарабену в діапазоні концентрацій 80–120 % відносно номінального значення (1 мг/мл). Коефіцієнт кореляції лінійної регресії становить 0,9999, що задовольняє вимогам критерію прийнятності 0,9923.

Методика аналізу також характеризується достатньою прецизійністю та правильністю. Знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Z (0,28) менше критичного значення для збіжності результатів (3,2 %).

Внутрішньолабораторна прецизійність

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 5 пробах однієї серії препарату двома аналітиками в різні дні шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta\overline{Z} \leq 1{,}6$ (за В = 5 %) та ≤3,2 (за В = 10 %).

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату ($\Delta\overline{Z}$ = 0,24 % для бензидаміну та 0,097 % для метилпарабену) задовольняє критерію прийнятності (≤ 1,6 % для бензидаміну та 3,2 % для метилпарабену) (табл. 8.24, 8.25).

Невизначеність кінцевої аналітичної операції розраховували за співвідношенням

$$\Delta_{FAO},\ \% = \sqrt{2} \cdot \frac{RSD_{max} \cdot t_{95\ \%,n-1}}{\sqrt{n}},$$

де: RSDmax — відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи; *t95 %,n-1* — односторонній коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %; *n* — число паралельних хроматограм.

Отже, невизначенність кінцевої аналітичної операції склала:

$$\Delta_{FAO},\ \% = \sqrt{2} \cdot \frac{0{,}5 \cdot 2{,}92}{\sqrt{3}} = 1{,}18\ \%.$$

Таблиця 8.24

Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену

№ розчину	Бензидаміну гідрохлорид		Метилпарабен	
	величина Z_i, %		величина Z_i, %	
	1 аналітик	2 аналітик	1 аналітик	2 аналітик
1	99,93	99,54	99,04	99,22
2	99,76	99,87	98,75	99,13
3	99,84	99,49	98,99	99,19
4	99,65	99,37	99,33	99,27
5	99,71	99,61	98,69	99,41
Середнє $\bar{Z}$ (%), $\bar{Z}(\%) = \frac{1}{5}\sum Z_i$	99,77	99,57	98,96	99,244
Об'єднане середнє	99,67		99,102	
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%), $RSD_Z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{15}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$	0,14		0,20	
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{Z}} = t(95\%, 14) \times \frac{RSD_Z}{\sqrt{5}}$	$1{,}76 \cdot 0{,}14 / \sqrt{5} = 0{,}11 \leq 1{,}6$		$1{,}76 \cdot 0{,}31 / \sqrt{5} = 0{,}16 \leq 3{,}2$	
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As}, %	1,6		3,2	

Таблиця 8.25

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину бензидаміну гідрохлориду

Операції пробопідготовки	Невизначеність
Розчин порівняння	
Взяття наважки стандарту та внутрішнього стандарту	(0,2 мг/150 мг) · 100 % = 0,13 %; (0,2 мг/150 мг) · 100 % = 0,13 %;
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Взяття аліквоти піпеткою 5 мл	0,37 %
Взяття аліквоти піпеткою 5 мл	0,37 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 50 мл	0,17 %
Випробовуваний розчин	
Взяття аліквоти препарату 5 мл	0,37 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 50 мл	0,17 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0{,}13^2 + 0{,}13^2 + 0{,}12^2 + 0{,}12^2 + 0{,}37^2 + 0{,}37^2 + 0{,}17^2 + 0{,}37^2 + 0{,}17^2} = 0{,}53$	

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально припустиму невизначеність результатів аналізу для допусків вмісту ± 5,0 %, що складає max $\Delta_{As} \leq 1{,}6$ %.

Розрахунок Δ_{As}, % проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_{As},\ \% = \sqrt{0{,}53^2 + 1{,}18^2} = 1{,}39\ \%\text{в}\Delta_{As\text{теор}} = 1{,}6\ \%.$$

Отже, повна прогнозована невизначеність результатів для тесту кількісне визначення бензидаміну гідрохлориду методом газової хроматографії не більше критичного значення $\Delta_{Astеор} = 1{,}6$ %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Аналогічно розраховували невизначеність для визначення метилпарабену (табл. 8.26).

Повна прогнозована невизначеність результатів для тесту кількісне визначення метилпарабену методом газової хроматографії не більше критичного значення $\Delta_{Astеор} = 3{,}2$ %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Таблиця 8.26

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину метилпарабену

Операції пробопідготовки	Невизначеність
Розчин порівняння	
Взяття наважки стандарту та внутрішнього стандарту	(0,2 мг/100 мг) · 100 % = 0,2 %; (0,2 мг/150 мг) · 100 % = 0,13 %;
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Взяття аліквоти піпеткою 5 мл	0,37 %
Взяття аліквоти піпеткою 5 мл	0,37 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 50 мл	0,17 %
Випробовуваний розчин	
Взяття аліквоти препарату 5 мл	0,37 %
Доведення до об'єму в мірній колбі на 50 мл	0,17 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0{,}2^2 + 0{,}13^2 + 0{,}12^2 + 0{,}12^2 + 0{,}37^2 + 0{,}37^2 + 0{,}17^2 + 0{,}37^2 + 0{,}17^2} = 0{,}55$	

Невизначеність кінцевої аналітичної операції склала:

$$\Delta_{FAO},\ \% = \sqrt{2} \cdot \frac{0{,}5 \cdot 2{,}92}{\sqrt{3}} = 1{,}18\ \%.$$

Сумарна невизначеність:

$$\Delta_{As},\ \% = \sqrt{0{,}46^2 + 1{,}18^2} = 1{,}40\ \% \leq \Delta_{As\text{теор}} = 3{,}2\ \%.$$

Специфічність. Щоб підтвердити специфічність методики, вводили розчинник та розчин плацебо препарату. Інтерференції між піками метилпарабену, внутрішнього стандарту та бензидаміну з піками плацебо не спостерігалося. Час утримування аналітів порівнювали з часом утримування стандартних зразків бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та домішки А бензидаміну. На хроматограмах досліджуваного розчину не було інтерференції між піками аналітів. Тобто методика є специфічною для визначених речовин.

Робасність методики була підтверджена шляхом стабільності випробуваних розчинів.

Стабільність розчинів досліджували шляхом введення одних і тих же розчинів з різницею у 24 та 48 годин. Результати дослідження стабільності розчину наведені в табл. 8.27.

Таблиця 8.27

Результати вивчення стабільності розчину

Термін зберігання	0 годин	24 години	48 годин
	Бензидаміну гідрохлорид		
Різниця між відношенням площ піків стандартного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,11	0,14
Різниця між відношенням площ піків випробовуваного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,12	0,17
	Метилпарабен		
Різниця між відношенням площ піків стандартного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,13	0,18
Різниця між відношенням площ піків випробовуваного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,10	0,15

Отже, розроблено методику одночасного визначення бензидаміду гідрохлориду та метилпарабену в лікарській формі спрею методом газової хроматографії. Під час розроблення методу було обрано оптимальні умови екстракції, температуру інжектора, детектор, швидкість потоку рухомої фази, нерухому фазу, тип уведення зразка та градієнт температури. Хроматографію проводили на капілярній колонці HP-5 (5 % дифеніл/95 % диметилсилоксану) з використанням хлороформної екстракції. Загальний час однієї аналітичної процедури становив 17,5 хв.

Валідацію методики проводили згідно з вимогами ДФУ 5.3.N.2 та ICH Q2. Процедура є специфічною для аналізованих речовин. Лінійність, повторюваність та правильність методики підтвержено валідаційними тестами. Усі досліджувані параметри були в межах критеріїв прийнятності. Методика може використовуватися в рутинному аналізі для одночасного визначення бензидаміну та метилпарабену в препаратах, що містять ці компоненти.

8.5. ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЕДЕРАКОЗИДУ С МЕТОДАМИ ВЕРХ ТА УВЕРХ У ЗРАЗКАХ ЛИСТЯ ПЛЮЩА ЗВИЧАЙНОГО

(за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1])

Розчин порівняння для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 6 мг *гедеракозиду С* поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 80 мл *метанолу Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* до позначки та перемішують.

Як *випробовувані розчини для ВЕРХ та УВЕРХ методів* використовувалися витяжку *листя плюща,* яке було приготовано за методикою, описаною нижче.

Витяжка листя плюща. Приготовано відповідно до методики, зазначеної в ДФУ 2.0. 1,00 г подрібненої на порошок сировини (355) поміщають у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додають 50 мл *80 % розчину* метанолу та нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані за температури 80°С протягом 1 год. Охолоджують і фільтрують крізь ватний тампон у мірну колбу місткістю 100 мл. Ватний тампон разом із рослинним залишком знову екстрагують (30 мл суміші) зі зворотним холодильником протягом 30 хв, після чого фільтрують. Отримані два фільтрати об'єднують та доводять *80 % розчину метанолу* до об'єму 100,0 мл і фільтрують крізь мембранний фільтр.

Вміст гедеракозиду в листі плюща (X_3), у перерахунку на висушену сировину, у відсотках, для методів ВЕРХ та УВЕРХ обчислюють за формулою:

$$X_3 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot P \cdot 100}{S_{st} \cdot m_i \cdot (100 - W)},$$

де S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для листя плюща; S_{st} — середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння; m_i — маса наважки випробовуваної сировини, г; m_{st} — маса наважки *стандарту гедеракозиду С*, г; P — вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С*, %; W — втрата в масі під час висушування, %.

Аналіз цими методами було проведено для усіх зібраних зразків. Час утримування гедеракозиду С для методу ВЕРХ складав 15,9 хв (рис. 8.19), для УВЕРХ — 7,9 хв (рис. 8.20).

Вміст гедеракозиду С для кожного з методів наведено в табл. 8.28. Найвищий вміст був у зразку, зібраному з Науйої-Акмяне: 110,053 та 109,446 мкг/г для ВЕРХ та УВЕРХ відповідно. Найменша кількість була знайдена в зразку із Сіракуз.

Також результати, отримані за допомогою цих методів були порівняні за t-критерієм Стьюдента (табл. 8.28).

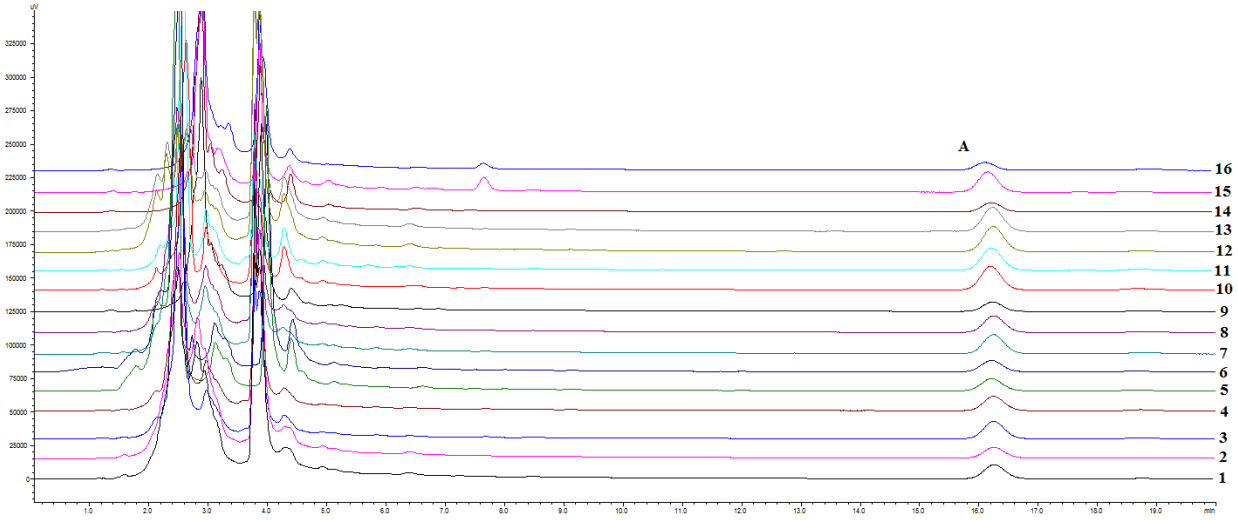


Рис. 8.19. Типові хроматограми листя плюща звичайного, проаналізованого методом ВЕРХ:
А — гедеракозид С; 1 — Шилюте; 2 — Братислава; 3 — Відень; 4 — Пумпенай;
5 — Будапешт; 6 — Прага; 7 — Харків; 8 — Плунге; 9 — Брно; 10 — Науйої-Акмяне;
11 — Клайпеда; 12 — Краків; 13 — Варшава; 14 — Київ; 15 — Каунас; 16 — Афіни

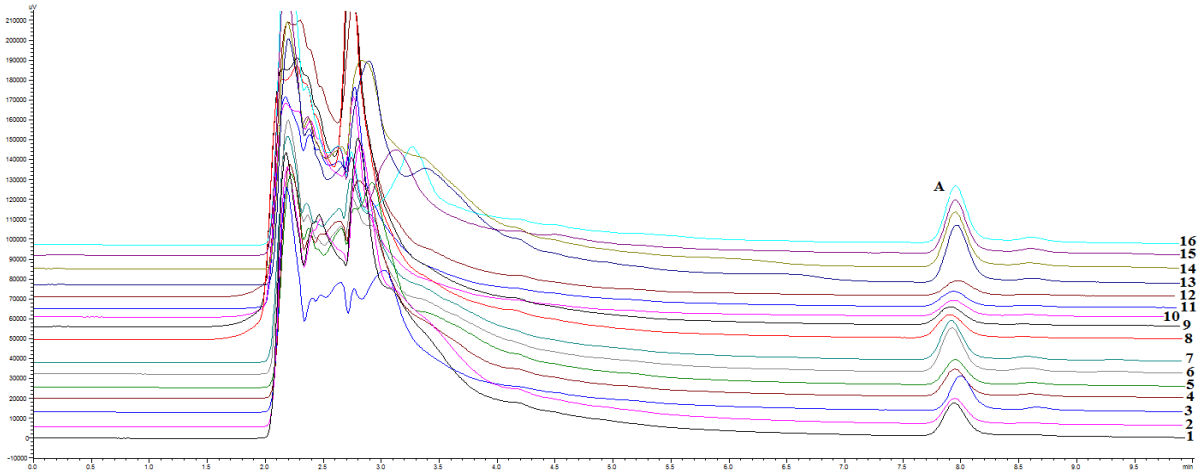


Рис. 8.20. Типові хроматограми листя плюща звичайного, проаналізованого методом УВЕРХ: А — гедеракозид С; 1 — Шилюте; 2 — Брно; 3 — Відень; 4 — Пумпенай; 5 — Будапешт; 6 — Прага; 7 — Харків; 8 — Варшава; 9 — Київ; 10 — Братислава; 11 — Афіни; 12 — Краків; 13 — Плунге; 14 — Науйої-Акмяне; 15 — Клайпеда; 16 — Каунас

Таблиця 8.28

Вміст гедеракозиду С у листі плюща, виміряний різними методами, та статистична різниця між ними

Місце збору	Кількість гедеракозиду С, мг/г, середнє ± SD		Різниця між ВЕРХ/УВЕРХ
	ВЕРХ	УВЕРХ	
Науйої-Акмяне	98,272 ± 1.947	100,081 ± 4,053	2,83
Клайпеда	69,233 ± 1,645	68,143 ± 1,409	2,46
Плунге	53,610 ± 2,051	53,837 ± 1,515	2,28
Шилюте	48,687 ± 1,443	49,628 ± 1,841	2,68
Пумпенай	77,206 ± 3,687	76,579 ± 2,857	2,63
Каунас	110,053 ± 5,056	109,446 ± 4,272	2,68
Київ	23,751 ± 0,673	23,832 ± 0,694	2,00
Харків	44,710 ± 1,358	44,379 ± 1,578	2,80
Будапешт	55,336 ± 2,377	55,647 ± 1,372	2,63
Прага	36,223 ± 1,117	36,303 ± 1,513	2,53
Брно	46,315 ± 1,516	46,156 ± 1,076	2,77
Відень	79,459 ± 2,756	79,034 ± 1,951	2,65
Братислава	26,679 ± 0,582	27,254 ± 1,276	2,68
Краків	43,027 ± 1,253	43,465 ± 1,739	2,37
Варшава	35,224 ± 0,676	35,392 ± 1,575	2,66
Афіни	31,344 ± 1,279	31,839 ± 2,548	2,59
Дельфи	33,075 ± 1,363	33,785 ± 1,279	2,62
Метеора	14,127 ± 0,487	13,074 ± 0,486	2,60
Катанія	20,212 ± 1,050	20,152 ± 0,451	2,63
Палермо	13,533 ± 0,572	14,063 ± 1,254	2,67
Сіракузи	12,452 ± 0,269	13,540 ± 1,070	2,72

Отримані дані свідчать, що не всі зразки відповідають установленим вимогам ДФУ та ЄФ. Кількість гедеракозиду С у листках, зібраних у Сіракузах, Метеорах, Палермо, Катанії, Києві та Братиславі, була нижчою за встановлені межі (30 мг/г).

Різницю між двома методиками обчислювали за формулою:

$$t = \frac{|\underline{d}|}{\sqrt{\sum d_i^2 - \frac{1}{n}}},$$

де d_i — різниця між двома парами вимірювань для того самого зразка (i).

Таблиця розподілу дає значення t (95 %; 2) = 4,30. Обчислений t коєфіцієнт кожного зразка був меншим за це значення, тобто відмінності не суттєві.

З метою підтвердження коректності розроблених методик для аналізу листя плюща була проведена їх валідація. Розраховані валідаційні характеристики оцінювали порівняно з критеріями прийнятності аналітичної методики.

Вивчення лінійної залежності площини піка від концентрації проводили на 5 модельних розчинах у межах концентрацій від 50 до 250 % від номінальної концентрації з кроком 50 %. Результати досліджень наведені в табл. 8.29 та 8.30 і на рис. 8.21-8.24. Вимірювання кожного розчину проводили тричі. Для розрахунків було використано середні значення площі піка основної речовини для кожного з розчинів.

Графік лінійності було побудовано в «нормалізованих» координатах, що дозволяє сформулювати єдині критерії, які пов'язані тільки з допусками вмісту, але не залежать від специфіки конкретних речовин.

Нормалізовані координати X_i та Y_i для побудови графіка визначали за формулою:

$$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \cdot 100\ \%, Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \cdot 100\ \%,$$

де C_i — концентрація аналізованої речовини в i-тому аналізованому розчині; C_{st} — концентрація цієї самої речовини в розчині порівняння; S_i — площа піка аналізованої речовини для i-ого аналізованого розчину; S_{st} — площа піка цієї самої речовини для розчину порівняння.

Лінійність характеризується графіком лінійної залежності:

$$Y_i = b \cdot X_i + a,$$

де a — вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої; b — кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої.

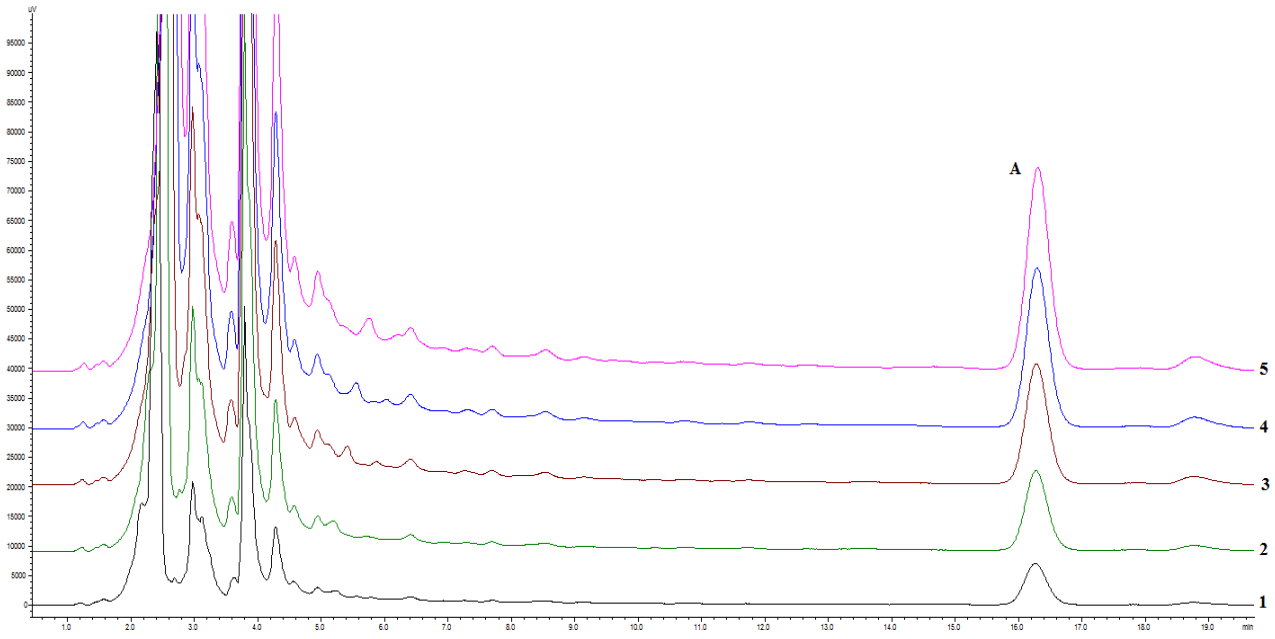


Рис. 8.21. Хроматограми розчинів для вивчення лінійності методики ВЕРХ для кількісного визначення гедеракозиду С: А — гедеракозид С; 1 — 50 %; 2 –100 %; 3 — 150 %; 4 — 200 %; 5 — 250 %

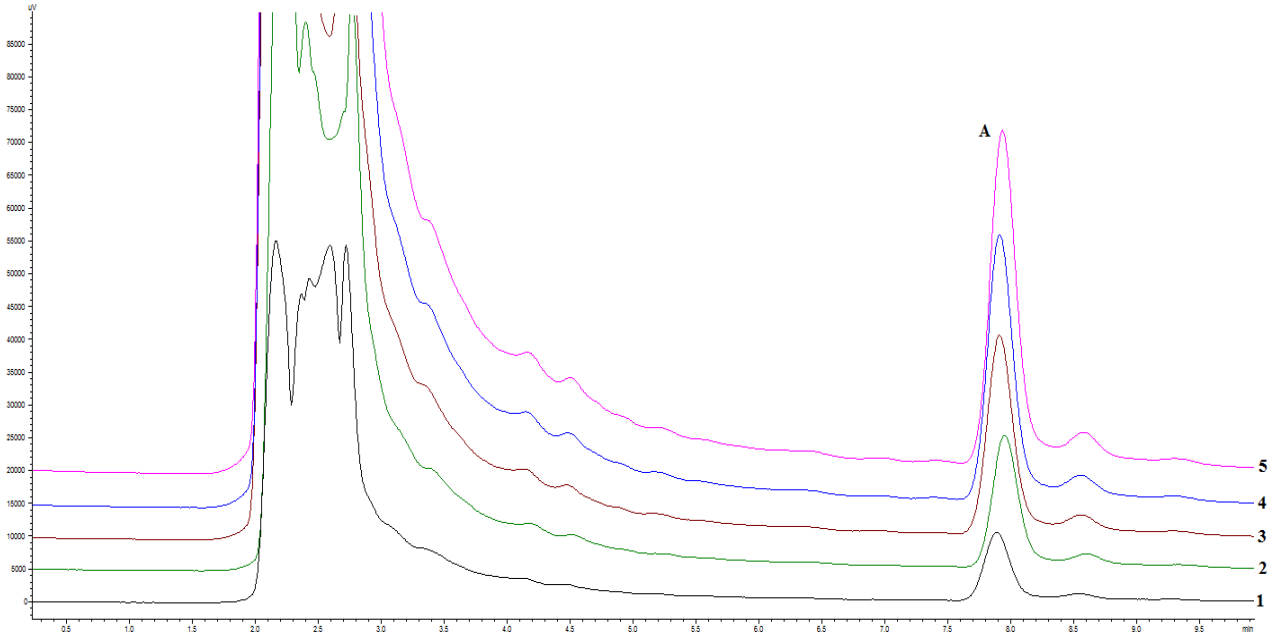


Рис. 8.22. Хроматограми розчинів для вивчення лінійності методики УВЕРХ для кількісного визначення гедеракозиду С: А — гедеракозид С; 1 — 50 %; 2 –100 %; 3 — 150 %; 4 — 200 %; 5 — 250 %

На рис. 8.23 зображено графік лінійної залежності площі піка основної речовини від концентрації розчину для ВЕРХ методу.

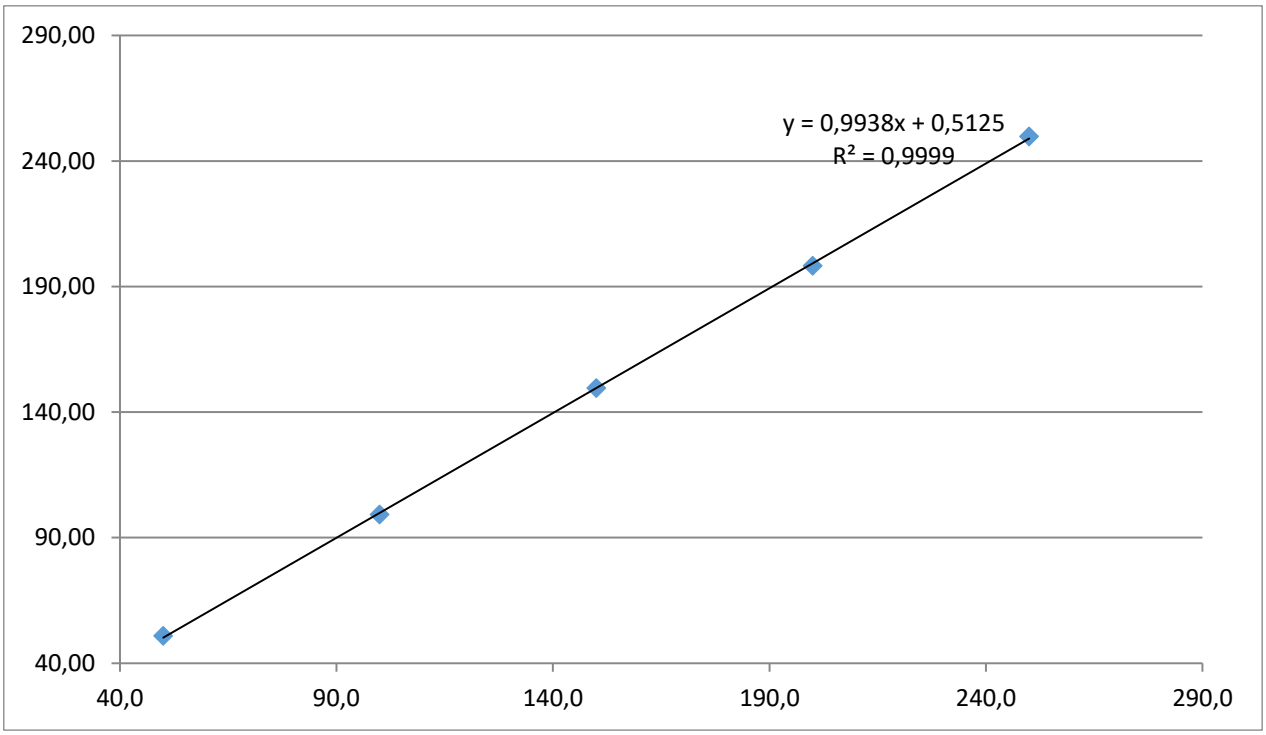


Рис. 8.23. Графік лінійної залежності площі піка основної речовини від концентрації досліджуваної речовини для методу ВЕРХ

Дані результатів перевірки лінійності ВЕРХ методики наведені у табл. 8.29.

Таблиця 8.29

Результати перевірки лінійності ВЕРХ методики кількісного визначення гедеракозиду С

Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
a	≤ 4,1	0,5125	Виконується
r^2	≥ 0,9978	0,9999	Виконується
S_0	≤ 2,7	0,9652	Виконується

На рис. 8.24 зображений графік лінійної залежності площі піка основної речовини від концентрації розчину для УВЕРХ методу.

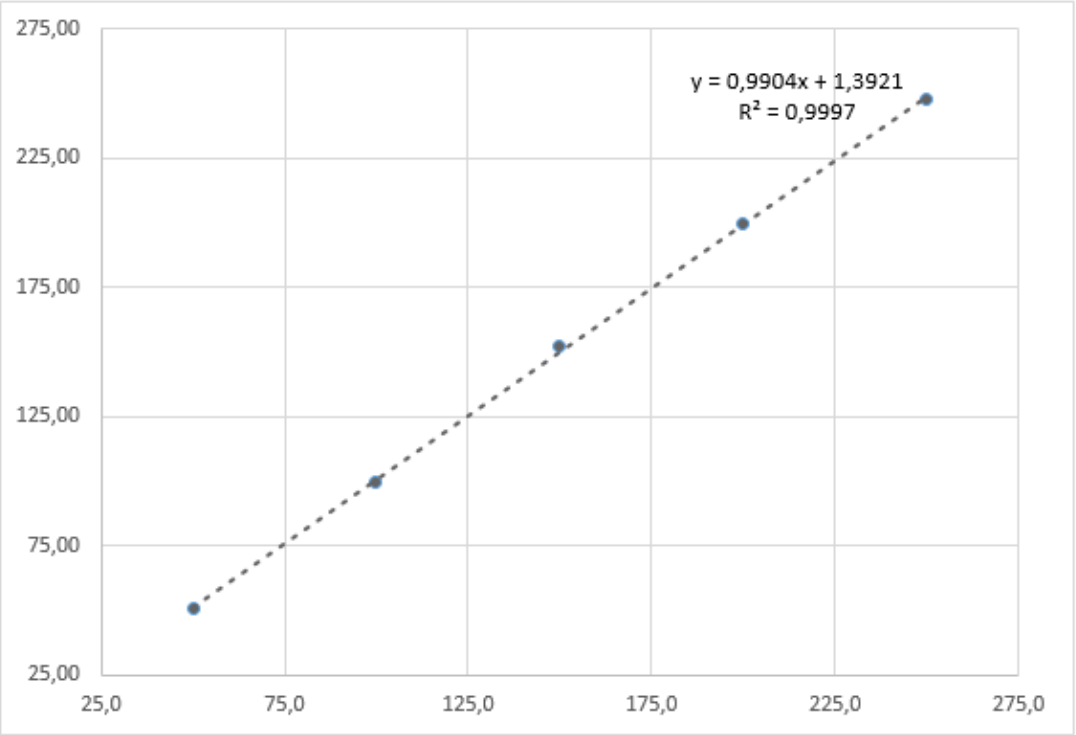


Рис. 8.24. Графік лінійної залежності площі піка основної речовини від концентрації досліджуваної речовини для методу УВЕРХ

Дані результатів перевірки лінійності УВЕРХ методики наведені у табл. 8.30.

Таблиця 8.30

Результати перевірки лінійності УВЕРХ методики кількісного визначення для гедеракозиду С

Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
a	≤ 4,1	1,3921	Виконується
r^2	≥ 0,9978	0,9999	Виконується
S_0	≤ 2,7	1,3207	Виконується

Для оцінки правильності і прецизійності використовували співвідношення «знайдено/введено»:

$$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\ \%.$$

Методика не має містити значної систематичної похибки. Це означає, що величина має незначно відрізнятись від нуля. Отримані дані для обох методів та розраховані статистичні характеристики наведено у табл. 8.31 і 8.32 для ВЕРХ та УВЕРХ відповідно.

Таблиця 8.31

Результати аналізу модельних сумішей гедеракозиду С методом ВЕРХ

Уведено у % до концентрації розчину порівняння (Ci/Cst)·100 %	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння (Ai/Ast)·100 %	Знайдено у % до введеного (Ai/Ast)·100/(Ci/Cst)
50	50,88	101,76
100	99,29	99,29
150	149,60	99,74
200	198,27	99,14
250	249,83	99,93
Середнє значення, Z, %		99,97
Відносне стандартне відхилення, S_Z, %		1,05
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z, % = t(95 %,4)·Sz		2,24
Критичне значення для збіжності результатів, Δ_{AS}, %		6,4
Систематична похибка, δ, %		0,03
Критерій статистичної невизначеності систематичної похибки, δ, %		1,0
Критерій практичної невизначеності систематичної похибки, δ, %		2,048
Загальний висновок про методику		Коректна

Таблиця 8.32

Результати аналізу модельних сумішей гедеракозиду С методом УВЕРХ

Уведено у % до концентрації розчину порівняння (Ci/Cst)·100 %	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння (Ai/Ast)·100 %	Знайдено у % до введеного (Ai/Ast)·100/(Ci/Cst)
50	50,35	100,70
100	99,63	99,63
150	152,33	101.55
200	199,42	99,71
250	250,00	100,00
Середнє значення, Z, %		100,32
Відносне стандартне відхилення, S_Z, %		0,81
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z, % = t(95 %, 4)·Sz		1,72
Критичне значення для збіжності результатів, Δ_{AS}, %		6,4
Систематична похибка, δ, %		0,32
Критерій статистичної невизначеності систематичної похибки, δ, %		0,77
Критерій практичної невизначеності систематичної похибки, δ, %		2,048
Загальний висновок про методику		Коректна

Стабільність (робасність) розчинів визначали шляхом аналізу свіжоприготованих розчинів та після 24 годин. Відмінність між отриманими значеннями для методів ВЕРХ та УВЕРХ становила 0,39 та 0,14 % відповідно.

Оскільки показники відповідають установленим критеріям, методики можуть використовуватись для проведення кількісного визначення.

8.6. ВИЗНАЧЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ПРЕПАРАТІВ, ЩО МІСТЯТЬ ЕКСТРАКТ ЛИСТЯ ПЛЮЩА ЗВИЧАЙНОГО

(за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1])

Досліджувані розчини для аналізу методом ВЕРХ були виготовлені таким чином:

Випробовуваний розчин сухого екстракту листя плюща. 200 мг сухого екстракту поміщають в мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл *метанолу Р* і витримують на УЗ-бані протягом 20 хв за кімнатної температури. Після охолодження розчину доводять його до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Випробовуваний розчин капсул, які містять сухий екстракт листя плюща. 400 мг вмісту капсул поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл *метанолу Р* і витримують на УЗ-бані протягом 20 хв за кімнатної температури. Після охолодження розчину його доводять до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Випробовуваний розчин сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща. 8,0 мл сиропу переносять у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 10 мл *метанолу Р* і витримують на УЗ-бані протягом 20 хв за кімнатної температури. Після охолодження розчину його доводять до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Випробовуваний розчин крапель, які містять екстракт листя плюща. 2,0 мл крапель поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл *метанолу Р* й витримують на УЗ-бані протягом 20 хв за кімнатної температури. Після охолодження розчину його доводять до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Випробовуваний розчин таблеток, які містять сухий екстракт листя плюща. 400 мг порошку таблеток поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл *метанолу Р* й обробляють на УЗ-бані протягом 20 хвилин за кімнатної температури. Після охолодження розчину його доводять до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Стандартизація препаратів плюща звичайного полягала у визначенні аналогічних компонентів у досліджуваних зразках. Застосований метод дозволив провести визначення 20 компонентів (4 тритерпенових сапонінів, 6 флавоноїдів та 10 фенольних

кислот). Крім лікарських препаратів *H. helix*, були проаналізовані сухі екстракти листя плюща звичайного.

Профілі фенольних кислот екстрактів були близькими, за винятком галової кислоти, що була відсутня у другому екстракті (табл. 8.33). Крім того, відрізнявся кількісний вміст інших компонентів. З-поміж усіх речовин кемпферол мав найбільше відхилення — понад 135,28 %, тоді як гедеракозид С найнижче — 7,18 %. Кількісні відмінності можна пояснити різницею походження сировини, технологією приготування або процесом сушіння.

Профілі всіх ЛФ були подібні до сухих екстрактів.

Фенольні речовини *H. helix* можуть сприяти деяким фармакологічним ефектам. Профіль фенольних кислот був представлений галовою, неохлорогеновою, хлорогеновою, коричною, кофеїновою, 3,5-дикофеїлхінною, 3,4-дикофеїлхінною, 4,5-дикофеїлхінною та криптохлорогеновою кислотами (табл. 8.33, рис. 8.24). Переважно всі вони були знайдені в кожному зразку, за винятком галової, коричної та кофеїнової кислот. Середні концентрації всіх кислот значно варіювалися. Хлорогенова та 4,5-дикофеїлхінна кислоти мали найвищі значення і становили близько 60 % від загального вмісту фенольних кислот.

Профіль флавоноїдів складався з таких речовин: рутин, гіперозид, ізокверцитрин, 6-7-дигідроксіізофлавон, кверцетин, кемпферол, нікотифлорин (табл. 8.34, рис. 8.25). Гіперозид був знайдений у всіх зразках. Лише у сиропі «Гедерин+» не були виявлені рутин та ізокверцитрин.

Вміст тритерпенових сапонінів переважав у всіх зразках (табл. 8.35, рис. 8.26). Їх загальна кількість становила близько 80 % у кожному зразку. Переважно кількісний вміст тритерпенових сапонінів розташовувався в такому порядку: гедеракозид С > гедеракозид D > α-гедерин > гедерасапонін В. Гедеракозид С мав найбільший з-поміж серед усіх сапонінів.

Калію сорбат був знайдений у деяких зразках за УФ-спектром. Він не був кількісно визначений під час хімічного дослідження препаратів плюща звичайного, оскільки був знайдений лише в деяких препаратах, а саме: у сиропах «Гелітуспан», «Проспан», «Гедерин» та «Гедерин+».

Основні компоненти, що відповідають за антиоксидантну активність, наведені в табл. 8.36. Визначені компоненти відповідають за 92-100 % антиоксидантної активності в зразку. З-поміж усіх компонентів неохлорогенова та хлорогенова кислоти разом з гіперозидом були присутні майже в кожному зразку з високими показниками антиоксидантної активності. Крім того, 3,4-дикофеїлхінна та 4,5-дикофеїлхінна кислоти мали значну активність, однак вони були знайдені лише в сухих екстрактах, капсулах та краплях від кашлю.

Таблиця 8.33

Вміст фенольних кислот у лікарських засобах плюща звичайного

Об'єкт	Галова кислота	Неохлорогенова кислота	Кислота хлорогенова	Корична кислота	Кофейна кислота	3,5-дикофеїлхінна кислота	3,4-дикофеїлхінна кислота	4,5-дикофеїлхінна кислота	Криптохлорогенова кислота
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C1[1]	8,24 ±0,24	112,03 ±3,41	506,87 ±13,42	0,34 ±0,01	7,60 ±0,17	178,61 ±8,89	283,50 ±14,07	560,31 ±25,97	144,27 ±7,19
C2[1]	7,94 ±0,19	102,59 ±3,24	482,22 ±11,42	0,51 ±0,01	6,67 ±0,12	172,17 ±8,57	273,87 ±13,58	540,65 ±26,08	138,34 ±6,29
C3[1]	8,23 ±0,16	109,47 ±2,57	496,13 ±8,65	0,30 ±0,01	7,15 ±0,17	175,93 ±8,47	278,51 ±13,73	560,20 ±27,65	140,96 ±7,01
C4[1]	8,04 ±0,24	108,30 ±1,45	491,40 ±14,57	0,33 ±0,01	7,19 ±0,19	173,60 ±8,59	274,78 ±13,50	544,86 ±26,32	139,30 ±6,86
C5[1]	8,70 ±0,34	105,81 ±2,57	494,59 ±14,92	0,56 ±0,02	6,93 ±0,16	178,35 ±8,87	279,81 ±13,72	569,47 ±27,61	143,82 ±7,07
S1[2]	0,36 ±0,01	15,06 ±0,37	364,80 ±14,82	0,52 ±0,02	5,30 ±0,15	16,21 ±0,76	32,12 ±1,27	43,66 ±1,40	20,21 ±0,89
S2[2]	н/в	8,75 ±0,31	124,06 ±3,62	1,03 ±0,01	2,82 ±0,11	6,53 ±0,29	34,11 ±1,68	38,07 ±1,87	36,76 ±1,82
S3[2]	0,42 ±0,01	4,27 ±0,15	14,16 ±0,57	0,59 ±0,02	0,67 ±0,01	2,49 ±0,12	2,62 ±0,11	6,06 ±0,27	15,28 ±0,69
S4[2]	0,90 ±0,03	36,82 ±0,91	116,38 ±3,17	н/в	2,40 ±0,04	33,64 ±1,42	51,24 ±2,43	72,12 ±2,86	64,62 ±3,07

Продовження табл. 8.33

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S5[2]	н/в	23,23 ±0,91	99,40 ±2,79	0,40 ±0,01	н/в	8,90 ±0,39	17,38 ±0,74	11,03 ±0,43	28,30 ±1,24
S6[2]	н/в	17,28 ±0,38	25,31 ±0,83	н/в	н/в	4,62 ±0,22	1,71 ±0,06	4,42 ±0,17	15,07 ±0,63
EF[3]	н/в	91,86 ±4,56	1177,73 ±29,57	2,96 ±0,12	10,13 ±0,28	10,22 ±0,48	17,06 ±0,73	39,20 ±1,86	33,91 ±1,57
D[4]	2,76 ±0,07	126,33 ±6,29	745,90 ±24,37	1,45 ±0,03	4,40 ±0,16	118,31 ±54,98	262,20 ±13,08	328,47 ±16,42	123,22 ±6,14
E1[5]	86,31 ±2,65	2145,15 ±54,52	10539,29 ±234,69	0,21 ±0,01	146,35 ±2,57	1489,07 ±73,68	2151,32 ±105,76	4700,32 ±219,57	3698,14 ±179,36
E2[5]	н/в	2668,71 ±33,51	12279,99 ±361,59	21,70 ±0,82	н/в	3431,72 ±164,34	5348,11 ±263,44	11028,1 ±541,29	2842,09 ±137,83

Примітка: 1 — кількість речовини (мкг) в капсулі; 2 — кількість речовини (мкг) в 1 мл сиропу; 3 — кількість речовини (мкг) в таблетці; 4 — кількість речовини (мкг) в 1 мл крапель від кашлю; 5 — кількість речовини (мкг) в 1 г сухого екстракту.

Таблиця 8.34

Вміст флавоноїдів у лікарських засобах плюща звичайного

Об'єкт	6-7-дигідрокси ізофлавон	Кверцетин	Кемпферол	Рутин	Гіперозид	Ізокверцитрин	Нікотифлорин
C1[1]	н/в	49,44±1,74	7,46±0,27	6,45±0,23	410,00±6,21	9,25±0,25	17,09±0,82
C2[1]	н/в	48,85±1,24	7,23±0,24	9,20±0,14	396,98±12,94	9,96±0,34	17,15±0,83
C3[1]	н/в	48,57±1,58	7,23±0,25	9,45±0,27	398,39±17,21	10,06±0,35	16,87±0,78
C4[1]	н/в	48,38±1,31	7,19±0,22	9,28±0,14	395,99±15,79	10,14±0,38	17,00±0,75
C5[1]	н/в	49,12±1,54	7,35±0,29	9,46±0,34	403,39±16,09	8,48±0,24	16,68±0,82
S1[2]	н/в	8,00±0,24	1,00±0,02	4,90±0,15	243,50±6,24	1,80±0,04	н/в
S2[2]	н/в	9,39±0,27	0,13±0,01	9,39±0,19	49,49±2,46	3,70±0,12	н/в
S3[2]	0,16±0,01	н/в	н/в	2,78±0,11	27,84±1,38	0,76±0,02	н/в
S4[2]	0,22±0,01	н/в	2.61±0,06	6,81±0,24	47,02±2,34	4,76±0,13	н/в
S5[2]	н/в	н/в	н/в	8,92±0,26	10,43±0,51	5,00±0,14	н/в
S6[2]	н/в	н/в	н/в	н/в	2,89±0,05	н/в	н/в
EF[3]	н/в	4,86±0,11	н/в	16,67±0,34	540,55±13,89	9,33±0,27	н/в
D[4]	н/в	н/в	0,19±0,01	15,10±0,23	746,83±18,25	3,50±0,09	2,54±0,05
E1[5]	н/в	897,15±24,57	133,32±2,57	176,42±3,81	7752,61±18,36	190,46±5,39	54,49±2,69
E2[5]	н/в	56,24±1,82	2,96±0,11	222,97±4,41	9894,44±174,29	104,58±2,59	322,63±16,11

Таблиця 8.35

Вміст тритерпенових сапонінів у лікарських засобах плюща звичайного

Об'єкт	Гедеракозид C	α-гедерин	Гедерасапонін B	Гедеракозид D
C1[1]	7538,71±124,53	570,89±14,45	289,18±14,37	1100,83±55,01
C2[1]	7318,19±204,90	545,86±13,97	289,24±13,76	1021,70±51,03
C3[1]	7398,19±200,14	545,96±19,37	297,03±14,08	976,92±47,69
C4[1]	7250,34±214,13	530,10±15,06	283,47±14,08	1037,91±51,29
C5[1]	7447,41±253,24	555,93±19,74	261,14±13,01	946,86±46,53
S1[2]	3246,50±103,56	277,00±11,58	24,44±1,20	150,88±7,34
S2[2]	4396,71±164,28	173,37±6,57	140,40±76,57	663,05±32,53
S3[2]	4673,64±121,86	203,29±64,01	137,38±6,76	524,80±24,93
S4[2]	3011,80±59,01	104,16±3,82	89,19±4,39	423,29±21,08
S5[2]	1287,33±35,46	33,46±0,84	57,30±2,73	174,40±8,27
S6[2]	622,57±18,58	н/в	14,31±0,68	21,56±1,01
EF[3]	8303,67±324,45	560,35±16,07	27,96±1,13	114,68±5,14
D[4]	5477,85±108,37	634,65±17,57	243,50±12,37	1237,32±61,27
E1[5]	139433,64±852,86	10505,21±26,26	3612,05±176,35	26441,31±1324,07
E2[5]	114994,08±749,04	8426,40±124,23	5718,13±278,39	19807,03±986,53

Таблиця 8.36

Значення еквівалента тролоксу антиоксидантної активності окремих речовин у лікарських засобах плюща звичайного

Зразок	Неохлорогенова кислот	Кислота хлорогенова	Криптохлоро-генова кислота	Гіперозид	3,4-дикофеїлхінна кислота	4,5-дикофеїлхінна кислота
1	2	3	4	5	6	7
C1[1]	120,23 ±5,87 ×10^{-3}	546,68 ±27,31 × 10^{-3}	75,91 ±3,67 ×10^{-3}	345,03 ±17,09 × 10^{-3}	362,67 ±18,08 × 10^{-3}	637,86 ±30,98 × 10^{-3}
C2[1]	110,21 ±5,29 ×10^{-3}	520,62 ±25,89 × 10^{-3}	72,50 ±3,53 ×10^{-3}	334,41 ±16,69 × 10^{-3}	346,41 ±17,87 × 10^{-3}	609,27 ±29,53 × 10^{-3}
C3[1]	116,40 ±5,79 × 10^{-3}	530,18 ±25,86 × 10^{-3}	73,39 ±3,59 ×10^{-3}	332,18 ±16,59 × 10^{-3}	350,64 ±17,49 × 10^{-3}	616,70 ±29,97 × 10^{-3}
C4[1]	114,60 ±5,71 × 10^{-3}	522,56 ±26,07 × 10^{-3}	72,43 ±3,61 × 10^{-3}	328,56 ±16,26 × 10^{-3}	346,04 ±17,19 × 10^{-3}	608,62 ±30,17 × 10^{-3}
C5[1]	114,50 ±5,49 × 10^{-3}	537,88 ±26,81 × 10^{-3}	74,67 ±3,57 × 10^{-3}	342,29 ±17,06 × 10^{-3}	356,77 ±17,76 × 10^{-3}	627,48 ±31,29 × 10^{-3}
S1[2]	77,56 ±3,76 × 10^{-3}	518,25 ±25,13 × 10^{-3}	29,17 ±1,39 × 10^{-3}	270,28 ±13,27 × 10^{-3}	н/в	н/в
S2[2]	56,56 ±2,13 × 10^{-3}	187,20 ±9,27 ×10^{-3}	31,24 ±1,57 × 10^{-3}	41,65 ±1,98 × 10^{-3}	н/в	н/в

Продовження табл. 8.36

1	2	3	4	5	6	7
S3[2]	н/в	н/в	н/в	24,20 ±1,18 × 10^{-3}	н/в	н/в
S4[2]	22,73 ±1,10 × 10^{-3}	43,40 ±2,11 × 10^{-3}	9,53 ±0,39 × 10^{-3}	40,72 ±1,79 × 10^{-3}	н/в	н/в
S5[2]	1,35 ±0,05 ×10^{-3}	16,03 ±0,78 × 10^{-3}	1,56 ±0,05 ×10^{-3}	9,09 ±0,43 × 10^{-3}	н/в	н/в
S6[2]	0,50 ±0,01× 10^{-3}	0,85 ±0,03 × 10^{-3}	н/в	н/в	н/в	н/в
EF[3]	98,59 ±4,87 × 10^{-3}	993,98 ±47,38 × 10^{-3}	н/в	588,83 ±29,37 × 10^{-3}	н/в	н/в
D[4]	135,58 ±6,76 × 10^{-3}	762,87 ±31,59 ×10^{-3}	64,83 ±3,05 × 10^{-3}	356,63 ±17,78 × 10^{-3}	335,42 ±16,75 × 10^{-3}	373,94 ±18,58 × 10^{-3}
E1[5]	3029,3 ±149,83 ×10^{-3}	22426,51 ±986,39 × 10^{-3}	2268,17 ±112,58 × 10^{-3}	8865,86 ±441,93 × 10^{-3}	10049,89 ±499,95 × 10^{-3}	17104,79 ±850,98 × 10^{-3}
E2[5]	3935,3 ±195,58 × 10^{-3}	16627,51 ±825,57 × 10^{-3}	2801,39 ±138,09 × 10^{-3}	10839,36 ±538,86 × 10^{-3}	2830,14 ±140,48 × 10^{-3}	5993,07 ±297,53 × 10^{-3}

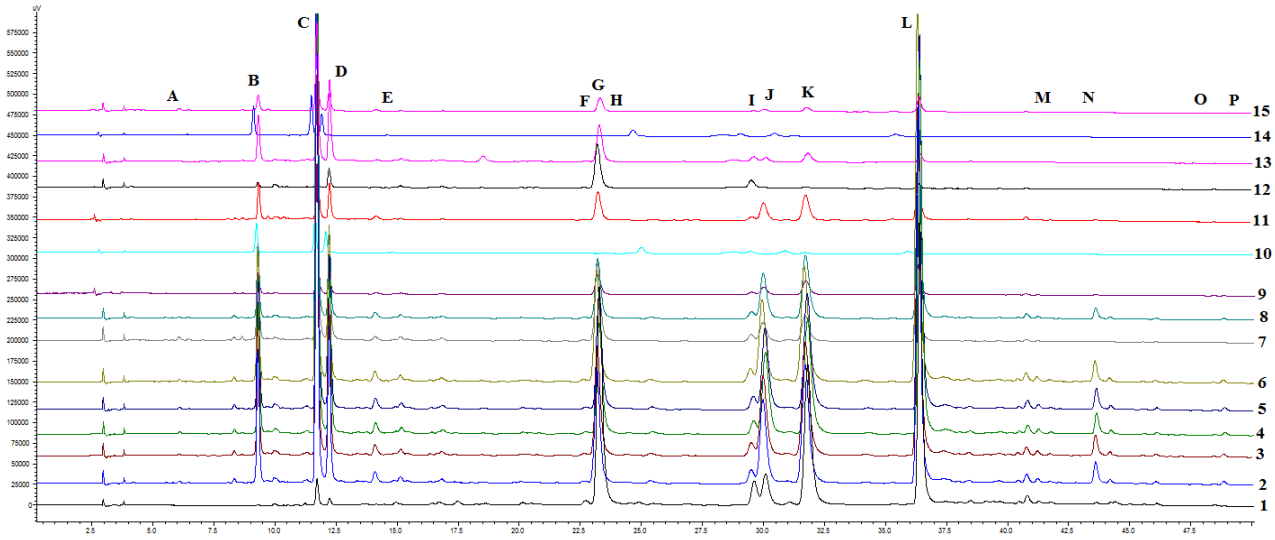


Рис. 8.24. Типові ВЕРХ хроматограми дослідження хімічного складу лікарських засобів плюща звичайного, детектованих за довжини хвилі 325 нм (1 — D, 2 — C1, 3 — C2, 4 — C3, 5 — C4, 6 — C5, 7 — E1, 8 — E2, 9 — S1, 10 — S5, 11 — S4, 12 — S3, 13 — EF, 14 — S2, 15 — S5): A — галова кислота; B — неохлорогенова кислота; C — хлорогенова кислота; D — криптохлорогенова кислота; E — кофейна кислота; F — рутин; G — гіперозид; H — ізокверцитрин; I — 3,5-дикофеїлхінна кислота; J — нікотифлорин; K — 3,4-дикофеїлхінна кислота; L — 4,5-дикофеїлхінна кислота; M — кверцетин; N — корична кислота; O — 6-7-дигідрокси ізофлавон; P — кемпферол

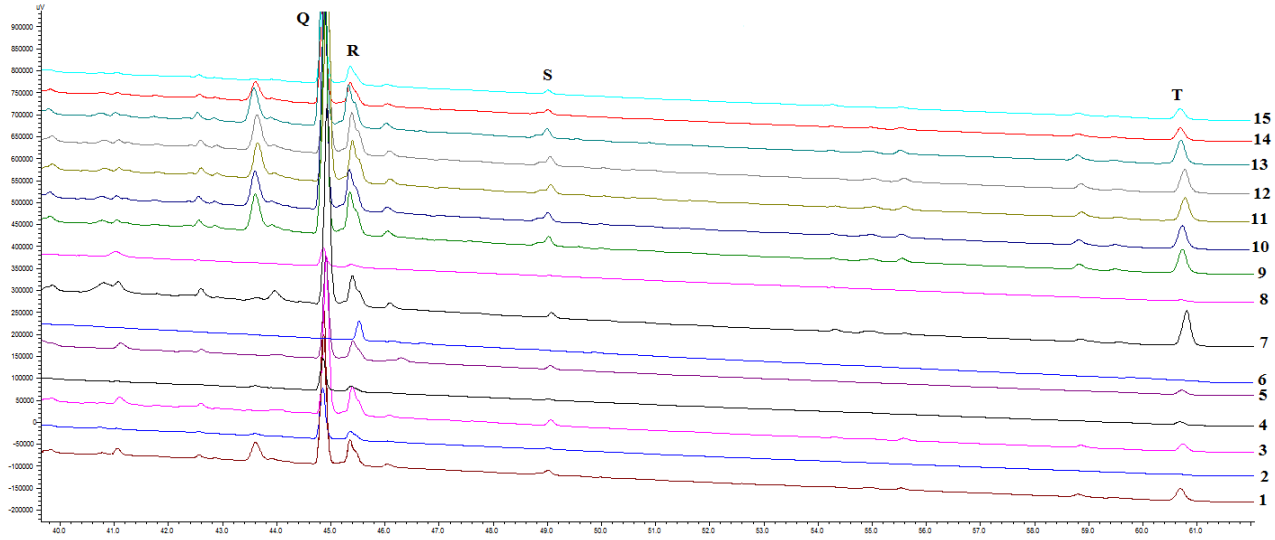


Рис. 8.25. Типові ВЕРХ хроматограми дослідження хімічного складу препаратів плюща звичайного, детектованих за довжини хвилі 210 нм (1 — S1, 2 — S5, 3 — S2, 4 — S5, 5 — S4, 7 — D, 8 — EF, 9 — C1, 10 — C2, 11 — C3, 12 — C4, 13 — C5, 14 — E2, 15 — E1): Q — гедеракозид C; R — гедеракозид D; S — гедерасапонін B; T — α-гедерин

Відповідно до отриманих результатів аналізу рослинної сировини та препаратів плюща звичайного як речовини-маркери запропоновано використовувати хлорогенову кислоту, гіперозид та гедеракозид С. Такий вибір пояснюється їх високим вмістом у всіх зразках та фармакологічними властивостями, які будуть вигідно доповнювати одна одну в лікуванні бронхітів.

8.7. ДОСЛІДЖЕННЯ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ (КАПСУЛ «ГЕДЕРИН» ТА СИРОП «ГЕДЕРИН+») З ВИКОРИСТАННЯМ ВЕРХ, УВЕРХ ТА ВЕТШХ МЕТОДИК

(за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1])

Аналіз сухого екстракту листя плюща звичайного та капсул із сиропом на його основі

Технологічна схема виробництва капсул «Гедерин» та сироп «Гедерин+» передбачає використання сухого екстракту плюща звичайного. Відповідно до ДФУ та ЄФ для підтвердження якості ЛЗ на основі екстракту листя плюща необхідно проводити кількісне визначення гедеракозиду С. Екстракти *H. helix* входять до складу різних ЛФ: таблеток, сиропів, крапель, капсул, які мають різний склад допоміжних речовин. Тому розроблені методи мають бути досить специфічними і точними для проведення стандартизації різних ЛФ. Крім того, підприємство широко запроваджує принципи «зеленої хімії», тому одним із завдань було обрання методики, що характеризується найменшим впливом на навколишнє середовище та виробничий персонал, найменшою кількістю відходів та найнижчою собівартістю.

Для досліджень були використані ВЕРХ та УВЕРХ методи, які було розроблено для кількісного визначення гедеракозиду С у сировині плюща звичайного за наведеними *методиками 1* та *2* відповідно.

Методика 1. Кількісне визначення гедеракозиду С у листі плюща, сухому екстракті та лікарських формах із використанням ВЕРХ. Для розділення речовин було використано колонку ACE C18 (150 × 4,6 мм, з розміром частинок 5 мкм). Як рухому фазу застосовували *воду Р–ацетонітрилу Р* (71 : 29). Швидкість рухомої фази складала 0,5 мл/хв. Детектування речовин відбувалося за довжини хвилі 210 нм, температура термостата −40 °С. 10 мкл випробовуваного розчину (або стандартного) вводили

в хроматографічну систему. Рухому фазу та всі зразки фільтрували крізь 0,22 мкм мембранний фільтр.

Методика 2. Кількісне визначення гедеракозиду С у листі плюща, екстракту та лікарських формах із застосуванням УВЕРХ. В аналізі було використано ACQUITY UPLC BEH C18 колонку 50 × 2,1 мм, з розміром частинок 1,7 мкм. Температура колонки була 40°С. Рухома фаза складалася з *води Р — ацетонітрилу Р* (71 : 29). Швидкість фази становила 0,05 мл/хв. Оптичне поглинання речовин вимірювали за допомогою діодно-матричного детектора за довжини хвилі 210 нм. 1 мкл випробовуваного розчину (або стандартного розчину) було введено до хроматографічної системи. Рухому фазу та всі зразки фільтрували з використанням 0,22 мкм мембранного фільтра.

Крім того, ми досліджували перспективи застосування ВЕТШХ, що іноді має певні переваги порівняно з ВЕРХ, а саме: коротший час аналізу, менша кількість рухомої фази, необхідної для проведення аналізу, мінімізація перешкод від попереднього аналізу, а також можливість аналізу зразків і стандартів, які можуть бути одночасно проаналізовані за тих самих умов, що забезпечує кращу аналітичну точність та відтворюваність. Для кількісного визначення гедеракозиду С було використано ВЕТШХ метод за *методикою 3.*

Методика 3. Кількісне визначення гедеракозиду С в екстракті та лікарських формах плюща за ВЕТШХ методикою. ВЕТШХ дослідження ЛРС та ЛЗ проводили на ВЕТШХ пластині (10 × 10 см), яка була вкрита сорбентом *силікагель Р* 60 F_{254} на скляній основі (Sigma-Aldrich). Рухомою фазою була суміш *безводної мурашиної кислоти — ацетону Р — метанол Р — етилацетат Р* (4 : 20 : 20 : 30 об/об/об/об). Стандартні та випробовувані розчини були нанесені у вигляді смуг шириною 6 мм, об'єм нанесення становив 8 мкл. Дослідження проводили у скляній хроматографічній камері з розмірами 20 × 20 см. Хроматографічну камеру насичували протягом 30 хв, після чого рухомій фазі давали пройти відстань 80 мм від лінії старту. Гедеракозид С виявляли після обприскування 20 % сірчаною кислотою в розчині етанолу після нагрівання пластини за 105 ° С та огляду в денному світлі.

Усі розчини фільтрувалися з використанням 0,22 мкм мембранного фільтра.

Порівняння методів (ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ) проводили під час аналізу екстрактів, капсул та сиропу. Методи були валідовані відповідно до вимог Міжнародної конференції з гармонізації та ДФУ.

Для аналізу випробовуваних зразків застосовувалися різні колонки: ACE C18 (150 × 4,6 мм, з розміром частинок 5 мкм) та Eclipse XDB — C18 (150 × 4,6 мм, з розміром

частинок 5 мкм). Найкраще розділення було досягнуто з допомогою колонки ACE C18. Час утримування гедеракозиду С становив близько 15,9 хв для ВЕРХ методу (рис. 8.26). Розраховані кількості речовин наведені в табл. 8.37.

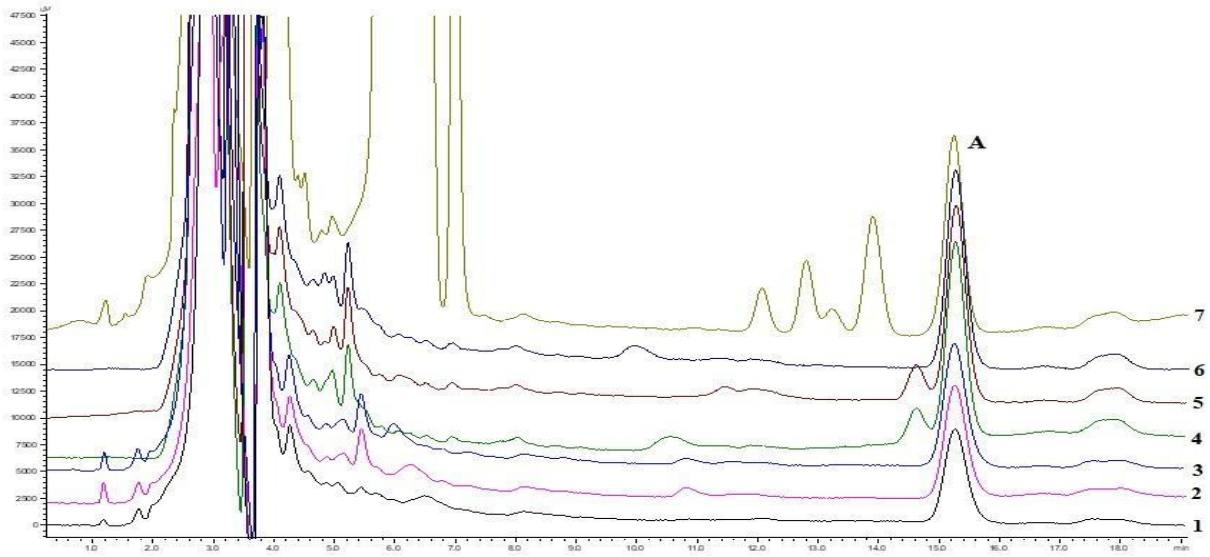


Рис. 8.26. ВЕРХ хроматограми досліджуваних зразків: А — гедеракозид С; 1-3 — екстракти (три різні серії), 4-6 — капсули (три різні серії); 7 — сироп

Застосування УВЕРХ методики дозволило скорити час дослідження. Однак під час аналізу сиропу не спостерігалося розділення між гедеракозидом С та іншим компонентом (рис. 8.27), тому необхідно було підвищити специфічність методики.

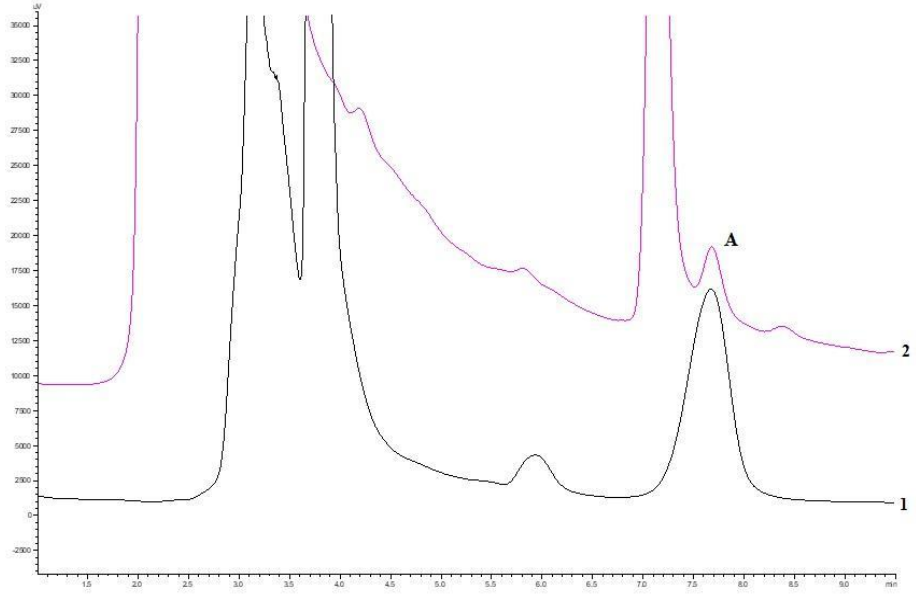


Рис. 8.27. Хроматограми зразків сиропу з використанням твердофазної екстракції (1) та без (2)

Сиропні матриці — це складні суміші таких різноманітних допоміжних речовин, як розріджувачі, солюбілізатори, консерванти. Уведення всіх цих компонентів у хроматографічну систему може призвести до зниження специфічності визначення, погіршення ефективності колонки, розщеплення форми піків та сильного скорочення терміну експлуатації колонок, особливо УВЕРХ колонок, де розмір частинок сорбенту становить менше 2 мкм.

Оскільки пробопідготовка відіграє важливу роль у проведенні аналізу, то для методу УВЕРХ її було змінено. Так, для видалення допоміжних речовин з матриці застосували твердофазну екстракцію, що дозволило б забезпечити більшу специфічність. Крім того, раніше не повідомлялось про жодний аналітичний метод, що використовує твердофазну екстракцію для визначення гедеракозиду С. Запропонований метод показав прийнятне розділення речовин (рис. 8.27).

Хроматограми деяких проаналізованих зразків показані на рис. 8.28. Розділення між гедеракозидом С та іншими компонентами було задовільним, а коефіцієнт розділення був більше за 2 у всіх досліджуваних розчинах. Розраховані кількості за методом УВЕРХ наведені в табл. 8.37.

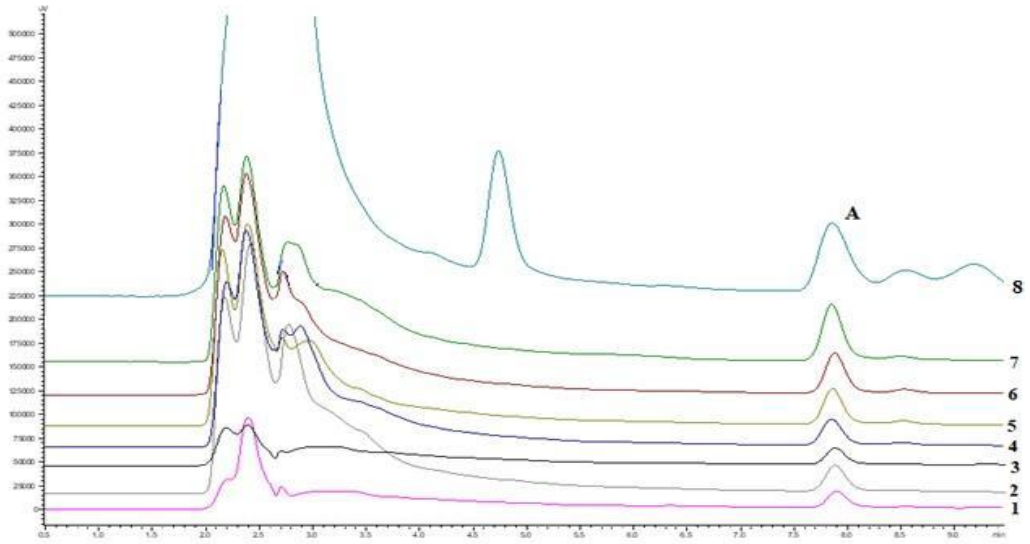


Рис. 8.28. Хроматограми аналізованих зразків методом УВЕРХ: 1 — стандарт гедеракозиду С; 2-4 — екстракт; 5-7 — капсули; 8 — сироп

Для ідентифікації гедеракозиду С ЄФ та ДФУ пропонують використовувати метод ТШХ. Тому умови цієї методики були перенесені на ВЕТШХ пластини. Метод має певні переваги, зокрема скорочення часу дослідження, що досить доцільно для виробників у разі аналізу великої кількості серій лікарських засобів. Проте під час аналізу

сиропу виникли деякі складнощі. Для очищення аналізованого зразка застосували твердофазну екстракцію. Для елюювання компонентів було перевірено різні розчини, з них *метанол Р* та його суміші з *водою Р* (60 та 80 %), а також *ацетонітрил Р* та його суміші з *водою Р* (60 та 80 %). Найкращим виявився *метанол Р*. Результати, отримані під час дослідження, наведені на рис. 8.29 і в табл. 8.37.

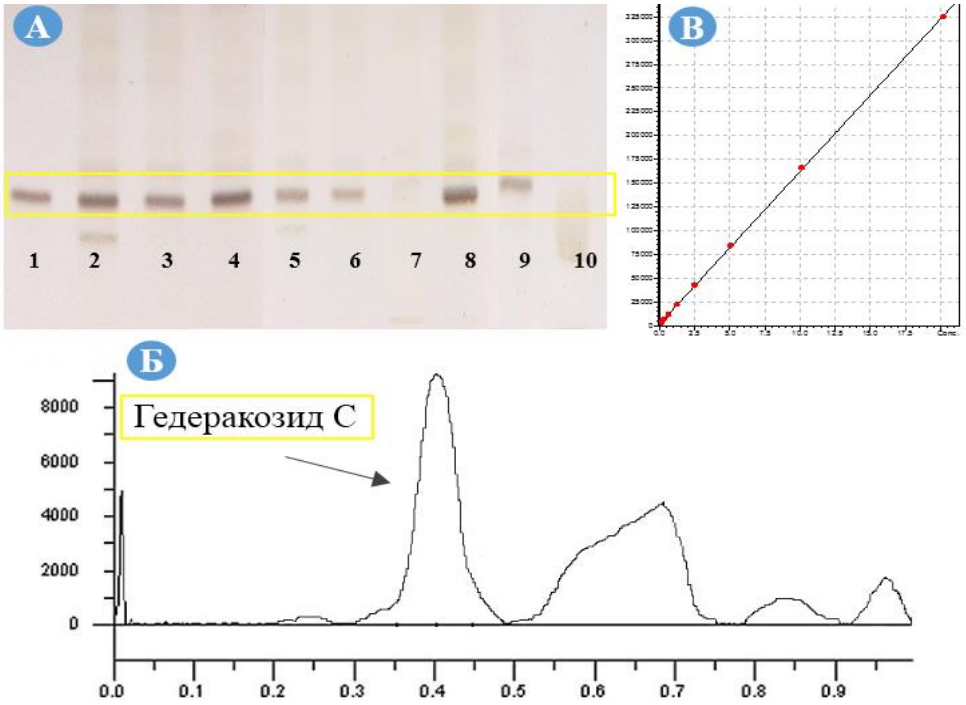


Рис. 8.29. Результати ВЕТШХ досліджень: А — ВЕТШХ пластина; Б — типова хроматограма, отримана з кожної доріжки; В — калібрувальна крива для кількісного виміру гедеракозиду С; 1 — стандарт гедеракозиду С; 2, 4, 5 — екстракт плюща листя; 9 — сироп; 3, 6, 8 — капсули; 7 — плацебо капсул; 10 — плацебо сиропу

Для досягнення найкращих результатів аналізу приготування розчинів слід проводити таким чином.

Приготування розчинів для ВЕРХ та УВЕРХ методів:

Розчин порівняння для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 6 мг *гедеракозиду С* поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють в 10 мл *метанолу Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* до позначки та перемішують.

Випробовуваний розчин сухого екстракту листя плюща для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 28 мг сухого екстракту плюща поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 10 мл *метанолу Р* та витримують на УЗ-бані протягом 15 хв за кімнатної температури, після чого розчину дають охолонути, доводять розчин до мітки *водою Р* та перемішують.

Випробовуваний розчин капсул «Гедерин», які містять сухий екстракт листя плюща, для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 280 мг препарату (точна наважка) поміщають у мірну колбу місткістю 250,0 мл, додають 10 мл *метанолу Р* та обробляють ультразвуком протягом 15 хв за кімнатної температури, після чого розчину дають охолонути, доводять розчин до мітки *водою Р* та перемішують.

Випробовуваний розчин сиропу «Гедерин+», який містить сухий екстракт листя плюща, для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 5,0 мл сиропу (точна наважка) поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, заповнюють колбу на 80 % *водою Р*, обробляють ультразвуком протягом 15 хв за кімнатної температури, доводять розчин до мітки та перемішують.

Твердофазна екстракція для сиропу в аналізі УВЕРХ методу

Отриманий розчин пропускали через патрон для твердофазної екстракції із сорбентом С18 у такому порядку:

— патрон промивали об'ємом *метанолу Р*, що дорівнює об'єму патрона;

— потім патрон промивали об'ємом *води Р*, що дорівнює двом об'ємам патрона;

— до верхньої частини патрона за допомогою адаптера приєднували корпус одноразового шприца без голки і поршня;

— через патрон пропускали 5,0 мл випробовуваного розчину;

— патрон промивали водою Р два рази порціями по 3 мл;

— висушували патрон за допомогою вакууму протягом 5 хв;

— проводили елюювання проби двома порціями по 2 мл суміші: ацетонітрил Р — вода Р (60 : 40) в мірну колбу місткістю 5 мл, доводили об'єм колби водою Р до позначки та перемішували.

Приготування розчинів для ВЕТШХ методу

Розчин порівняння для ВЕТШХ. 5,0 мг гедеракозиду С переносять у мірну колбу місткістю 5,0 мл, розчиняють у *метанолі Р* і доводять до мітки тим же розчинником.

Випробовуваний розчин сухого екстракту листя плюща. 50 мг сухого екстракту плюща поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл *метанолу Р* й установлюють на УЗ-баню протягом 15 хв за кімнатної температури. Після цього розчину дають охолонути, доводять розчин до мітки тим самим розчинником та перемішують.

Випробовуваний розчин капсул «Гедерин», які містять сухий екстракт листя плюща. 300 мг препарату поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл *метанолу Р* та обробляють ультразвуком протягом 15 хв, після чого доводять розчин до мітки тим же розчинником та перемішують.

Випробовуваний розчин сиропу «Гедерин+», який містить сухий екстракт листя плюща. 2,0 мл сиропу (точна наважка) поміщають у мірну колбу місткістю 5,0 мл, додають

2 мл *водою Р*, обробляють ультразвуком протягом 15 хв, після чого доводять розчин до мітки тим самим розчинником та перемішують.

Отриманий розчин пропускали через патрон для твердофазної екстракції із сорбентом С18 у такому порядку:

— патрон промивали об'ємом метанолу Р, що дорівнює об'єму патрона;

— потім патрон промивали об'ємом води Р, що дорівнює двом об'ємам патрона;

— до верхньої частини патрона за допомогою адаптера приєднували корпус одноразового шприца без голки і поршня;

— через патрон пропускали 5,0 мл випробовуваного розчину;

— патрон промивали водою Р два рази порціями по 3 мл;

— висушували патрон за допомогою вакууму протягом 5 хв;

— проводили елюювання проби двома порціями по 2 мл *метанолом Р* у мірну колбу місткістю 5 мл, доводили об'єм колби тим самим розчинником до позначки та перемішували.

Для визначення кількісного вмісту гедеракозиду С за вказаними методами слід використовувати такі формули розрахунків.

Вміст гедеракозиду в сухому екстракті листя плюща (X_4) для ВЕРХ та УВЕРХ методів, у %, обчислюють за формулою:

$$X_4 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 100 \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot P}{S_{st} \cdot m_i},$$

де S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для сухого екстракту листя плюща; S_{st} — середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння; m_i — маса наважки сухого екстракту листя плюща, г; m_{st} — маса наважки *стандарту гедеракозиду С*, %; P — вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С*, %.

Вміст гедеракозиду в капсулах (X_5) для ВЕРХ та УВЕРХ методів, у мг, обчислюють за формулою:

$$X_5 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 250 \cdot m_c \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 2.5 \cdot m_c \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot (100 - W)},$$

де S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для капсул, які містять сухий екстракт листя плюща; S_{st} — середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння; m_i — маса наважки капсули капсульної маси, взятої для приготування випробовуваного розчину для капсул, які містять сухий екстракт листя плюща, мг;

m_{st} — маса наважки *стандарту гедеракозиду С,* мг; m_c — середня маса вмісту капсул, мг; P — вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С,* %; W — втрата в масі під час висушування, %.

Вміст гедеракозиду (X_6) в 1 мл сиропу для ВЕРХ та УВЕРХ методів, в г, обчислюють за формулою:

$$X_6 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 50 \cdot \rho \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot \rho \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 200},$$

де S_i — середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща; S_{st} — середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння; m_i — маса наважки сиропу, взятої для приготування випробовуваного розчину для сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща, г; m_{st} — маса наважки *стандарту гедеракозиду С,* г; ρ — густина сиропу, г/см^3; P — вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С,* %.

Вміст гедеракозиду в сухому екстракті листя плюща (X_7) для ВЕТШХ методу, у %, обчислюють за формулою:

$$X_7 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 20 \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 5} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 4 \cdot P}{S_{st} \cdot m_i},$$

де S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для сухого екстракту листя плюща; S_{st} — середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння; m_i — маса наважки сухого екстракту листя плюща, г; m_{st} — маса наважки *стандарту гедеракозиду С,* г; P — вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С,* %.

Вміст гедеракозиду в капсулах (X_8) для ВЕТШХ методу, у мг, обчислюють за формулою:

$$X_8 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 20 \cdot m_c \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 4 \cdot m_c \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot (100 - W)},$$

де S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для капсул які містять сухий екстракт листя плюща; S_{st} — середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння; m_i — маса наважки капсули капсульної маси, взятої для приготування випробовуваного розчину для капсул, які містять сухий екстракт листя плюща, мг; m_{st} — маса наважки *стандарту гедеракозиду С,* мг; m_c — середня маса вмісту капсул, мг; P — вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С,* %; W — втрата в масі під час висушування, %.

Вміст гедеракозиду (X_9) в 1 мл сиропу для ВЕТШХ методу, в г, обчислюють за формулою:

$$X_9 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 5 \cdot \rho \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 5 \cdot 100} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot \rho \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100},$$

де S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща; S_{st} — середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння; m_i — маса наважки сиропу, взятої для приготування випробовуваного розчину для сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща, г; m_{st} — маса наважки *стандарту гедеракозиду С,* г; ρ — густина сиропу, г/см^3; P — вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С,* %.

Результати були отримані для всіх зразків після аналізу кожним методом (табл. 8.37). Кожен зразок аналізували не менше трьох разів. Отримані результати були порівняні за допомогою критерію Стьюдента.

Таблиця 8.37

Вміст гедеракозиду С у зразках та різниця між методами

Аналізовані зразки	Вміст гедеракозиду С, середнє ± SD			Вимоги	Порівняння за критерієм Стьюдента		
	ВЕРХ	УВЕРХ	ВЕТШХ		ВЕРХ/ УВЕРХ	ВЕРХ/ ВЕТШХ	УВЕРХ/ ВЕТШХ
Екстракт I, %	19,57 ± 0,23	19,65 ± 0,34	19,83 ± 0,21	Не менше 14 %	2,68	3,07	2,81
Екстракт II, %	16,02 ± 0,17	15,93 ± 0,16	16,10 ± 0,39		2,72	2,51	2,95
Екстракт III, %	18,92 ± 0,24	18,98 ± 0,35	19,11 ± 0,28		2,54	3,19	3,01
Капсули I, мг	8,39 ± 0,37	7,99 ±0,27	8,47 ± 0,39	Не менше 7 мг	2,83	2,02	3,87
Капсули II, мг	8,76 ± 0,26	8,91± 0,40	8,98 ±0,43		2,82	3,05	2,11
Капсули III, мг	8,53 ± 0,21	8,49 ± 0,37	8,61 ± 0,1		2,56	2,73	2,89
Сироп, мг/мл	0,603 ± 0,019	0,63 ± 0,028	0,611 ± 0,024	Не менше 0,6 мг/мл	2,82	3,34	2,77

Таблиця розподілу Стьюдента має значення t (95 %; 2) = 4,30. Розраховані t значення менші за наведені у таблиці, тобто відмінності між значеннями не суттєві. Тому запропоновані методи ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ можуть використовуватися для рутинного контролю гедеракозиду С в екстракті, капсулах та сиропі.

Валідація розроблених методик

Валідація була проведена для всіх методик за такими параметрами: лінійність, специфічність, прецизійність, правильність, стабільність, крім того, було визначено межу виявлення та межу кількісного визначення [3, 32].

Специфічність. Вплив допоміжних речовин плацебо для капсул та сиропу був досліджений шляхом порівняння хроматограм, отриманих із тестових, порівняння та плацебо розчинів. Розчин плацебо містив такі самі компоненти і в тих самих пропорціях, що і тестовий, крім екстракту плюща. Отримані результати показали відсутність впливу допоміжних речовин на визначення гедеракозиду С.

Лінійність, межа виявлення та межа кількісного визначення. Визначення лінійності проводили, аналізуючи серію розчинів, які містили різну концентрацію гедеракозиду С. Результати визначення лінійності наведені в табл. 8.38; хроматограми вивчення лінійності для ВЕРХ та УВЕРХ методів — на рис. 8.30, 8.31.

Таблиця 8.38

Результати вивчення лінійності, межа виявлення та межа кількісного визначення для розроблених методів

Метод	Калібрувальна крива	R^2	Діапазон концентрацій, (мкг/мл)	Межа виявлення (нг/мл)	Межа кількісного визначення (нг/мл)
ВЕРХ	y = 1,0029x – 0,2421	0,9999	48-72	0,93	2,83
УВЕРХ	y= 0,9907x + 1,4288	0,9999	48-72	1,59	4,83
ВЕТШХ	y = 1,0068x – 0,4124	0,9988	800-1200	50,24	150,74

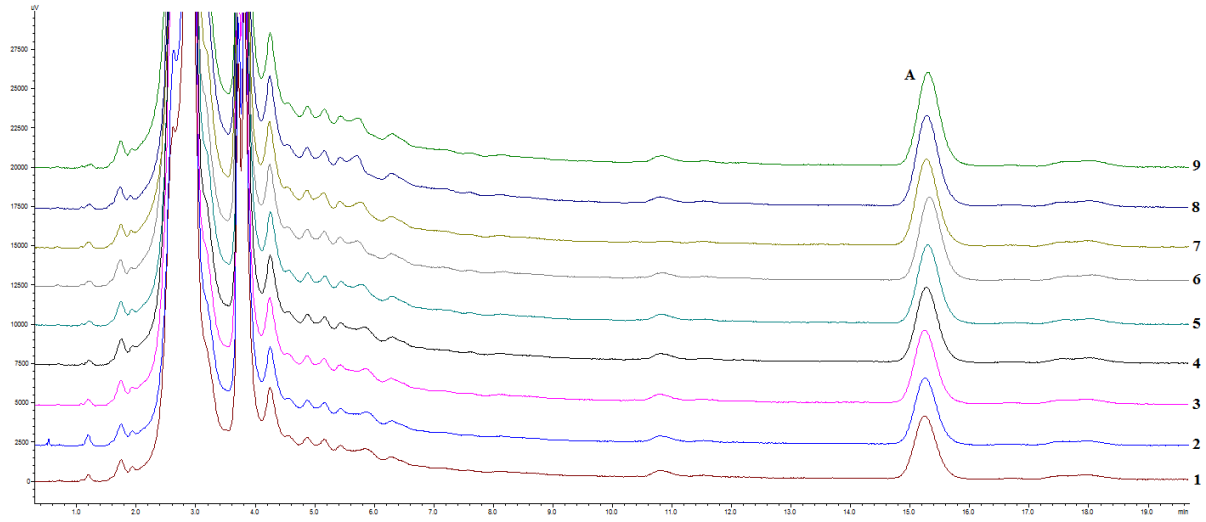


Рис. 8.30. Типові хроматограми для дослідження лінійності методики ВЕРХ:
А– гедеракозид С; 1 — 80 %; 2 — 85 %; 3 — 90 %; 4 — 95 %; 5 — 100 %;
6 — 105 %; 7 — 110 %; 8 — 115 %; 9 — 120 %

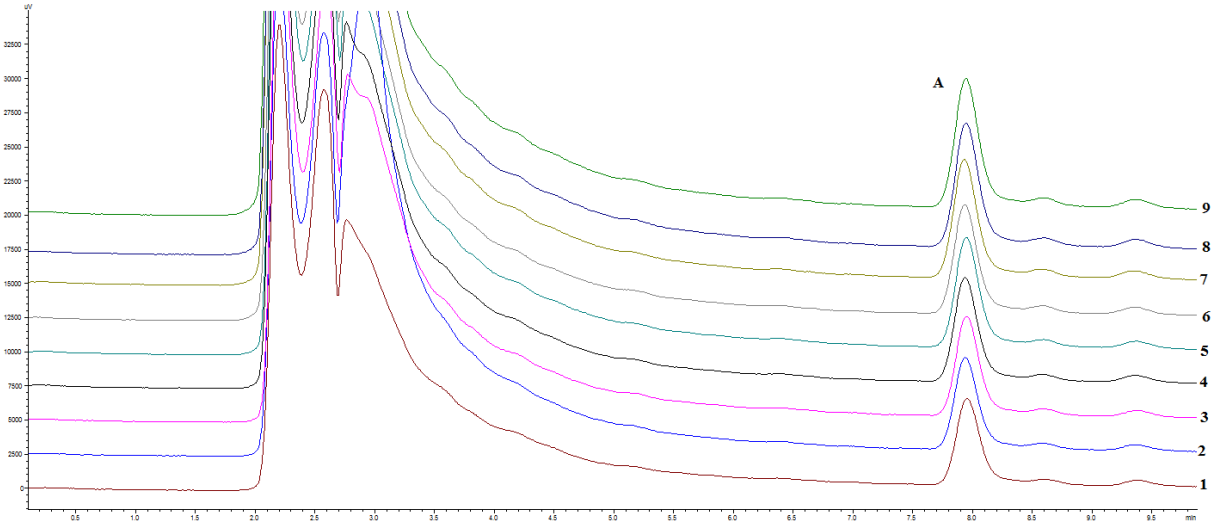


Рис. 8.31. Типові хроматограми для дослідження лінійності методики УВЕРХ:
А– гедеракозид С; 1 — 80 %; 2 — 85 %; 3 — 90 %; 4 — 95 %; 5 — 100 %;
6 — 105 %; 7 — 110 %; 8 — 115 %; 9 — 120 %

Правильність. Дослідження правильності оцінювали шляхом виміру розчинів із відомою концентрацією досліджуваної речовини. Кількість гедеракозиду С у зразках становила 80, 100 та 120 %. Отримані дані були в діапазоні 99,10–100,70, що свідчить про те, що запропоновані методи є точними для визначення гедеракозиду С.

Таблиця 8.39

Результати вивчення правильності розроблених методик

Концентрація (%)	Знайдено (%)			RSD (%)			Знайдено (%)		
	ВЕРХ	УВЕРХ	ВЕТШХ	ВЕРХ	УВЕРХ	ВЕТШХ	ВЕРХ	УВЕРХ	ВЕТШХ
80	80,1	79,87	79,28	0,11	0,05	0,37	100,12	99,84	99,1
100	100,02	100,01	100,04	0,09	0,21	0,25	100,02	100,01	100,04
120	118,96	119,87	120,84	0,1	0,11	0,17	99,13	99,89	100,7

Прецизійність. Дослідження було проведено протягом двох днів різними аналітиками з використанням розчину зі 100 % концентрацією гедеракозиду С. У результаті були отримані значення RSD та похибки для кожного з методів.

Таблиця 8.40

Результати вивчення прецизійності для розроблених методів

Метод	Концентрація (мкг/мл)	Intra-Day (n = 6)			Inter-Day (n = 12)		
		Знайдено ± S.D., %	RSD, %	Похибка, %	Знайдено ± S.D., %	RSD, %	Похибка, %
ВЕРХ	60	100,28 ± 0,42	0,52	0,83	100,14 ± 0,25	0,98	1,35
УВЕРХ	60	100,95 ± 0,48	0,46	1,23	101,13 ± 0,14	0,91	1,91
ВЕТШХ	1000	100,14 ± 0,21	0,53	0,61	100,30 ± 0,37	0,59	0,76

Вивчення *стабільності* розчину гедеракозиду С здійснювали протягом 24-х годин для стандартного розчину. Встановлено, що розчин був стабільній для всіх методів, ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ, оскільки відхилення площ речовини становило 0,395, 0,138 та 0,387 % відповідно.

Усі методи показали задовільні результати під час проведення валідації, тому можуть бути рекомендовані для визначення гедеракозиду С у різних лікарських формах.

8.8. РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ САЛЬБУТАМОЛУ СУЛЬФАТУ ТА КАЛІЮ СОРБАТУ

(за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1])

Для кількісного визначення субстанції сальбутамолу сульфату ЄФ пропонує використовувати неводне потенціометричне титрування із застосуванням перхлоратної кислоти. Проте цей спосіб є неприйнятним для аналізу багатокомпонентних ЛФ. Крім того, деякі літературні джерела пропонують використовувати різні ВЕРХ методики. Ці методики пропонують проводити дослідження в ізократичному режимі з використанням колонки, заповненої С18 сорбентом, з різними рухомими фазами: суміш ацетонітрилу з водою або фосфатним буферним розчином. Також у літературних даних зустрічаються спектрофотометричні методи та капілярний електрофорез. Оскільки запропоновані спектрофотометричні методи засновані на реакції сальбутамолу з іншими реагентами, це може призвести до втрати досліджуваної речовини через неповноту взаємодії або небажаних побічних реакцій. Одним з основних недоліків капілярного електрофорезу є відтворюваність.

Такі методи, як ГХ, ВЕРХ, ВЕРХ з мас-детектором та капілярний електрофорез, використовувались для кількісного визначення калію сорбату в різних фармацевтичних препаратах.

Незважаючи на те, що всі зазначені вище методи були успішно валідовані та застосовані в рутинному контролі фармацевтичних препаратів, жоден з них не давав можливості для одночасного визначення обох компонентів (сальбутамолу сульфату та калію сорбату) в одному аналізі. Для кількісного виміру речовин був обраний метод ВЕРХ, оскільки він має високу специфічність і дозволяє проводити оцінку кількох компонентів за умови правильного добору хроматографічних параметрів.

Для розробки методики одночасного визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату попередньо досліджено вплив різних параметрів (градієнтні режими, розчинники, pH та склад рухомої фази) з використанням стандартного розчину сальбутамолу сульфату (табл. 8.41).

Під час розроблення методики досліджували різні pH фосфатних буферних розчинів. Оскільки сальбутамолу сульфат має основні властивості, в кислих умовах він стає протонованим, як результат спостерігається зменшення його часу утримування (раннього елюювання). Зі свого боку, це може заощадити час аналізу, що є перевагою

під час рутинного контролю ЛФ. Тому для проведення цього дослідження були використані фосфатні буферні розчини з pH 3,0, 3,5 та 4,0. Оскільки за pH фосфатного буферного розчину 3,0 параметри піка (кількість теоретичних тарілок та симетрія піка) були найкращими (табл. 8.41), саме цей розчин застосовувався в подальших дослідженнях як компонент рухомої фази.

Таблиця 8.41

Вплив різних параметрів рухомої фази на аналіз сальбутамолу сульфату

Параметр		Кількість теоретичних тарілок (N)	Фактор асиметрії (T)	RSD, % (n = 3)
pH буферного розчину (БР)	3,0	6251	1,42	0,22
	3,5	6061	1,53	0,29
	4,0	6160	1,51	0,23
Розчинник	*Вода Р*	6983	1,2	0,09
	Метанол Р	4035	1,36	0,17
	Рухома фаза А	6323	1,21	0,16
	БР із pH 3.0	2595	1,27	0,21
Склад рухомої фази А	MeCN/БР (5/95 *об/об*)	5268	1,53	0,36
	MeCN/MeOH/БР (4/6/90 *об/об/об*)	4657	1,33	0,27
	MeOH/БР (10/90 *об/об*)	6251	1,42	0,22
	MeCN/MeOH/БР (2/8/90 *об/об*)	6323	1,2	0,16
	MeCN/MeOH/БР (8/12/80 *об/об/об*)	2994	1,27	0,18
	MeCN/MeOH/БР (5/5/90 *об/об/об*)	3567	1,39	0,21

Для встановлення оптимального складу рухомої фази А були досліджені фосфатний буферний розчин із pH 3,0 (БР), *метанол Р* (MeOH) та *ацетонітрил Р* (MeCN) у різних співвідношеннях. За результатами експериментальних досліджень найбільш придатною для аналізу (табл. 8.41) виявилась суміш: *ацетонітрил Р — метанол Р* — фосфатний буферний розчин із pH 3.0 (20 : 80 : 900 об/об/об). Оптимальна швидкість потоку становила 1 мл/хв. Як сорбент було обрано С18, у запропонованих умовах час утримування сальбутамолу сульфату складав приблизно 5 хв, тому загальний час аналізу становив 15 хв.

Для визначення оптимальної пробопідготовки для розчинення проби використовували *метанол Р, воду Р,* фосфатний буферний розчин із pH 3,0 та рухому фазу А. З усіх перелічених найкращим розчинником була вода, тому для подальшого аналізу її використовували для розчинення стандартів та сиропу.

Проте під час дослідження сиропу в тих же умовах калію сорбат мав значно більший час утримування і заважав аналізу наступних хроматограм. Тому нами був використаний градієнтний режим з *ацетонітрилом Р* як рухома фаза Б. У разі додавання цього елюенту час утримування калію сорбату зменшився і з'явилася можливість визначити його протягом 15 хв аналізу. Для досягнення прийнятного розділення між компонентами були досліджені різні градієнтні режими. Крім того, з-поміж різних типів сорбентів намагалися вибрати такий, що найбільше підійшов би для аналізу. Розглядали такі варіанти колонок: Symmetry C18 (150 × 4,6, розмір частинок 5 мкм) і Supelcosil C8 (150 × 4,6 мм, розмір частинок 3 мкм). Основна відмінність між колонками полягала в утримуванні речовин. У разі використання октилсилільного сорбенту час утримування був коротшим, разом з тим досягалося прийнятне розділення. Тому для методики визначення був обраний цей сорбент, оскільки зменшення часу аналізу може бути перевагою у рутинному контролі ЛЗ.

Найбільш прийнятні умови хроматографування, які використовувались для подальшого аналізу, були викладені в *методиці 4.*

Методика 4. Для дослідження використовували колонку Supelcosil C8 (150 × 4,6 мм, з розміром частинок 3 мкм). Як рухому фазу А використовували суміш *ацетонітрил Р — метанол Р — фосфатний буферний розчин* у співвідношенні 20 : 80 : 900 (об/об/об).

Фосфатний буферний розчин готували таким чином: 3,45 г *натрію дигідрофосфату Р* поміщали у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, розчиняли у 900 мл 0,05 % водного розчину *триетиламіну Р,* доводили *pH* розчину до 3,0 ± 0,05 *фосфорною кислотою розведеною Р,* доводили об'єм 0,05 % водним розчином *триетиламіну* до позначки і перемішували.

Швидкість рухомої фази складала 1,0 мл/хв, температура колонки — 40 °С. Детектування відбувалося за довжини хвилі 277 нм, об'єм інжекції 10 мкл. Програма градієнта наведена у табл. 8.42.

Усі розчини фільтрували крізь 0,45 мкм мембранний фільтр.

Розчини були приготовлені таким чином:

Розчин порівняння. Стандарти сальбутамолу сульфату та калію сорбату розчиняли у *воді Р,* для одержання розчинів з концентрацією 20 та 80 мкг/мл відповідно.

Таблиця 8.42

Градієнтна програма для *методики 11 «Кількісне визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату методом ВЕРХ»*

Час (хв)	Рухома фаза А (%)	Рухома фаза Б (%)
0:00	87	13
4:00	87	13
4→7	87→80	13→20
10:00	80	20
10→11	80→87	20→13

Випробовуваний розчин. 5,0 мл препарату поміщали у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводили об'єм розчину *водою Р* до позначки та перемішували. Відбирали 10,0 мл отриманого розчину та доводили до позначки в колбі місткістю 25,0 мл.

Хроматограма тестового зразка сиропу в запропонованих умовах наведена на рис. 8.32.

Показники придатності хроматографічної системи наведені в табл. 8.43.

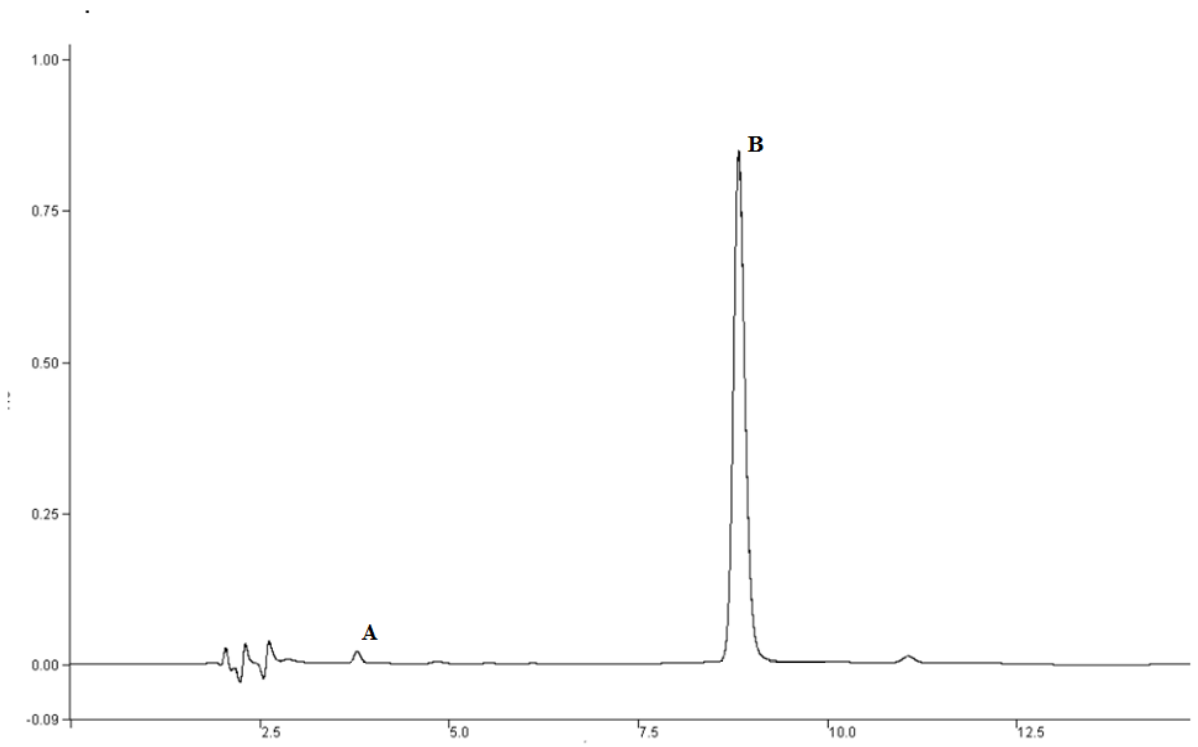


Рис. 8.32. Типова хроматограма випробовуваного розчину сиропу:
А — сальбутамол сульфат; В — калію сорбат

Таблиці 8.43

Придатність хроматографічної системи для стандартного розчину сальбутамолу сульфату та калію сорбату

Критерій	Отримані результати		Вимоги
	сальбутамол сульфат	калій сорбат	
Кількість теоретичних тарілок (N)	8369	14971	Не менше 3000
Фактор асиметрії	1,16	1,19	В межах 0,8-1,5
RSD	0,64 %	0,50 %	Не більше 1,0 %
Фактор розділення	21,0		Не менше 6,0

Розроблений метод був валідований відповідно до вимог ДФУ та настанови ІСН за лінійністю, точністю, специфічністю, стабільністю, межами виявлення та межами кількісного визначення.

Специфічність досліджували із застосуванням стандартного розчину сальбутамолу сульфату та калію сорбату, тестових розчинів, плацебо та бланк-розчину. Отримані результати показали відсутність впливу сиропної матриці на визначення досліджуваних піків речовин.

Дослідження *лінійності* проводилось на 9 модельних розчинах у діапазоні концентрацій 80-120 % від номінального вмісту. Дані, одержані в ході дослідження лінійності, наведені в табл. 8.44. Також у таблиці наведені результати вивчення межі виявлення (МВ) та межі кількісного визначення (МКВ).

Таблиця 8.44

Показники лінійності, межі виявлення та межі кількісного визначення

Речовина	Калібрувальна крива	R^2 (n = 6)	Концентрація (мкг/мл)	МВ (мкг/мл)	МКВ (мкг/мл)
Сальбутамол сульфат	y =1,0117x – 1,3073	0,9997	16-24	0,42	1,28
Калію сорбат	y = 1,0079x – 0,6512	0,9997	64-96	0,017	0,053

Правильність визначали шляхом аналізу 9 модельних розчинів, у такому самому діапазоні концентрацій, що і *лінійність*. Розчини аналізували тричі на кожному рівні, відсоток визначення та RSD розраховували для кожної концентрації. RSD кожного рівня концентрацій був менше 0,51 % для обох речовин, що підтверджує придатність методу. Аналітичні дані наведені в табл. 8.45.

Таблиця 8.45

Параметри правильності розробленого методу

Концентрація (%)	Виміряний вміст (%)		RSD (%)		Знайдено (%)	
	сальбутамол сульфат	калію сорбат	сальбутамол сульфат	калію сорбат	сальбутамол сульфат	калію сорбат
80 %	79,82	80,06	0,44	0,19	99,77	100,07
85 %	84,38	84,9	0,23	0,34	99,27	99,88
90 %	89,52	90,19	0,42	0,02	99,46	100,21
95 %	94,78	95,05	0,26	0,71	99,77	100,05
100 %	100,29	100,1	0,58	0,33	100,29	100,1
105 %	105,06	105,07	0,22	0,46	100,05	100,07
110 %	110,07	110,02	0,61	0,05	100,07	100,02
115 %	114,99	115,8	0,57	0,66	100	100,69
120 %	119,89	120,06	0,18	0,43	99,91	100,05
Середнє значення, Z, %					99,84	100,13
Відносне стандартне відхилення, S_Z, %					0,32	0,23
Критичне значення для збіжності результатів, Δ_{AS}, %					1,6	
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z, % = t(95 %,8)·Sz					0,16	0,13
Систематична похибка, δ, %					0,16	0,14
Критерій статистичної незначущості систематичної похибки, δ, %					≤0,51	

Стабільність розчинів досліджували протягом 24 годин. Установлено, що розчини залишаються стабільними протягом цього часу, відхилення вмісту сальбутамолу сульфату та калію сорбату становили 0,44 та 0,26 % відповідно.

Прецизійність методу оцінювали протягом 2-х різних днів двома різними аналітиками. Дослідження проводили з використанням розчину, що мав концентрацію 100 % усіх досліджуваних компонентів, аналізували 6 разів. Відхилення вмісту для сальбутамолу сульфату та калію сорбату в перший день становило 0,53 та 0,61 % відповідно; на другий день — 1,15 та 0,98 % (табл. 8.46). За отриманими результатами, запропонований метод відповідає вимогам, оскільки критерії були менше 1,6 %.

Таблиця 8.46

Дані вивчення внутрішньолабораторної прецизійності

Речовина	Концентрація (мкг/мл)	Intra-day (n = 6)			Inter-day (n = 12)		
		знайдено ± S.D.	RSD, %	Δ intra, %	знайдено ± S.D.	RSD, %	Δ intra, %
Сальбутамолу сульфат	20	97,53 ±0,56	0,61	0,53	96,56 ± 0,16	0,58	1,15
Калію сорбат	80	97,95 ± 0,48	0,43	0,61	97,70 ± 1,37	0,50	0,98

На підставі отриманих результатів було визначено, що методика відповідає встановленим вимогам і може бути використаною для кількісного дослідження сальбутамолу сульфату та калію сорбату.

8.9. РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ДОМІШОК САЛЬБУТАМОЛУ СУЛЬФАТУ МЕТОДОМ ВЕРХ

(*за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1]*)

Можливі домішки сальбутамолу дуже схожі на нього за фізико-хімічними властивостями, що ускладнює проведення аналізу. Для досягнення відповідної роздільної здатності з-поміж усіх компонентів були протестовані різні умови хроматографування.

Зокрема було вивчено вплив сорбентів різних стаціонарних фаз (С8 та С18), а також розмір їх частинок (3 та 5 мкм). Стаціонарна фаза С18 з розміром частинок 5 мкм була визнана найбільш придатною для поділу компонентів досліджуваної комбінації. Також були досліджені дві різні солі в різних концентраціях — ацетат амонію (5-25 ммоль) та натрію дигідрогенфосфат (5-50 ммоль) з різними значеннями pH 3,0-6,0 як можливі компоненти рухомої фази. Проте розділення деяких домішок з іншими компонентами комбінації залишалося незадовільним. Солі були замінені на триетиламін або трифтороцтову кислоту. За результатами експерименту найбільшу роздільну здатність з-поміж інших рухомих фаз показав водний розчин із триетиламіном, доведеним оцтовою кислотою до pH 5,5.

Метанол Р та *ацетонітрил Р* були обрані як компоненти рухомої фази В. Чистий *метанол Р* давав погану базову лінію та неприйнятну форму досліджуваних піків. Тому для поліпшення результату був використаний *ацетонітрил Р*. Оптимальне співвідношення було встановлено як 50:50 (*об/об*).

Хроматографічний аналіз було здійснено як описано в методиці 12. Приготування розчинів виконували таким чином:

Розчин порівняння. Усі речовини були розчинені у воді так, щоб отримати такі концентрації: сальбутамол сульфат — 400 мкг/мл, калію сорбат — 2 мг/мл і по 1,8 мкг/мл для кожної домішки сальбутамолу D, F та G.

Випробовуваний розчин. 15,0 мл сиропу переносили у мірну колбу місткістю 20,0 мл та доводили до мітки *водою Р*, після чого його ретельно перемішували.

Розроблений метод було валідовано відповідно до ДФУ.

Специфічність. Дослідження підтвердили відсутність вливу на визначення основних речовин у сиропі. Ідентифікація компонентів проводилася шляхом порівняння часу утримування піків з тестового розчину та часу утримування піків з розчину порівняння.

Межа виявлення. Дослідження чутливості проводили шляхом аналізу приготованого розчину з концентрацією сальбутамолу сульфату (36 нг/мл), що становило 0,01 % від його кількості в досліджуваному розчині. Отримане співвідношення сигнал/шум для основного піка було більше 3/1, тобто метод може вважатися чутливим.

Робасність. Дослідження робасності проводилось за зміни температури колонки (30-40 °С), швидкості потоку (0,9-1,1 мл/хв) та pH мобільної фази А (5,0-6,0) (табл. 8.47, рис. 8.34). Отримані результати показали, що основний вплив на систему має pH мобільної фази, оскільки за високих значень pH не спостерігалося поділу між піками сальбутамолу сульфату та допоміжних речовин.

Таблиця 8.47

Вивчення робасності методики для визначення домішок сальбутамолу сульфату

Зміни	Параметри	Сальбутамол сульфат	Домішка D	Калію сорбат	Домішка G	Домішка F
1	2	3	4	5	6	7
0.9 мл/хв	Час утримування	11,03 хв	14,43 хв	15,05 хв	15,59 хв	19,49 хв
	Розділення	–	13,694	2,596	2,2	17,603
	Кількість теоретичних тарілок (КТТ)	26018	66838	55667	73383	133671
	Фактор асиметрії	1,595	0,849	0,881	1,055	1,257
1.1 мл/хв	Час утримування	9,95 хв	13,16 хв	13,58 хв	14.42 хв	18,49 хв
	Розділення	–	14,552	1,948	3,559	20,556
	КТТ	27507	68813	51471	63125	196818
	Фактор асиметрії	1,493	1,272	0,98	1,560	1,301
30 С	Час утримування	10,85 хв	14,33 хв	14,60 хв	15,26 хв	19,43 хв
	Розділення	–	17,437	1,372	2,674	18,386
	КТТ	30670	143687	54499	62339	138268
	Фактор асиметрії	1,486	0,727	0,958	1,109	1,332
40 С	Час утримування	10,05 хв	13,18 хв	13,89 хв	14,68 хв	18,53 хв
	Розділення		13,488	3,177	3,976	25,42
	КТТ	26344	59661	54474	143619	236692
	Фактор асиметрії	1,493	1,437	0,963	0,966	1,418

Продовження табл. 8.47

1	2	3	4	5	6	7
pH 6.0	Час утримування	11,18 хв	–	11,54 хв	–	–
	Розділення	–	–	1,578	–	–
	КТТ	42542	–	39994	–	–
	Фактор асиметрії	1,351	–	1,140	–	–
pH 5.0	Час утримування	10,56 хв	13,69 хв	13,97 хв	16,16 хв	17,44 хв
	Розділення	–	11,307	0,903	7,721	2,162
	КТТ	35157	27997	35222	57158	5879
	Фактор асиметрії	1,491	–	0,907	–	–

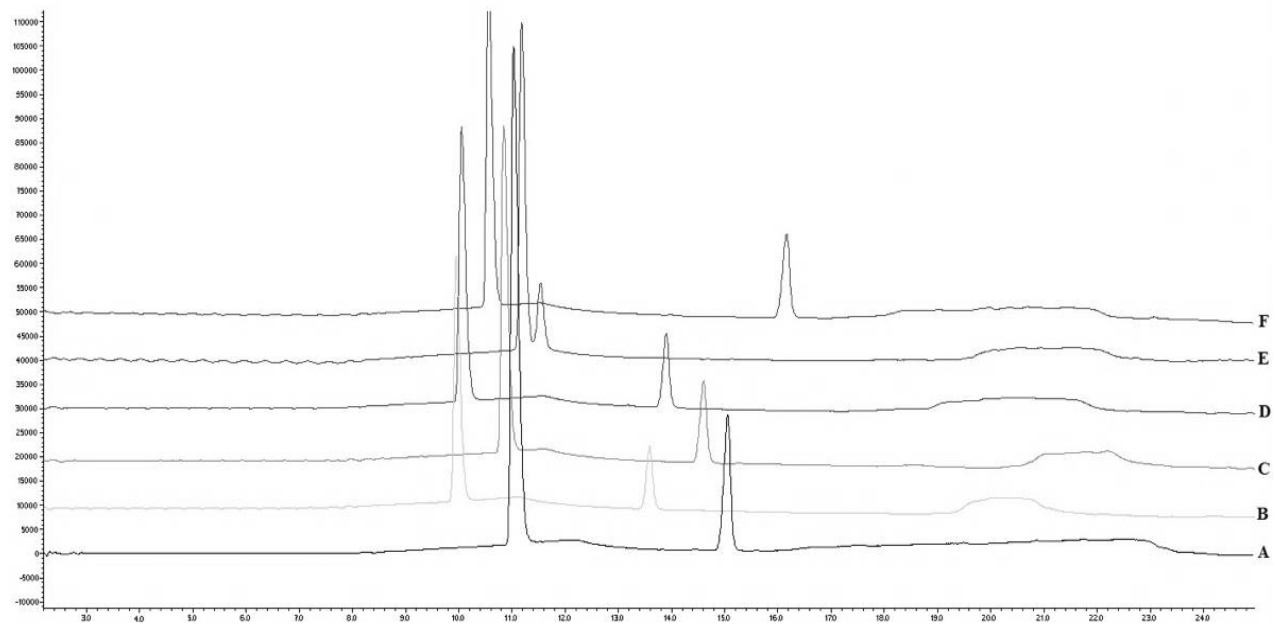


Рис. 8.34. Хроматограми вивчення робастності: A — 0,9 мл/хв; B — 1,1 мл/хв; C — 30 °C; D — 40 °C; E — 6,0 pH; F — 5,0 pH

Вивчення деградації. Для підтвердження специфічності та визначення профілю можливих домішок проводили деградацію субстанції сальбутамолу сульфату в стресових умовах. Було зроблено чотири різні деградації: лужна, кислотна, температурна та пероксидна. За дослідженням деградації було визначено, що жодні інші компоненти та потенційні продукти деградації і домішки не впливали на результати визначення. Результати наведені в табл. 8.48 та на рис. 8.35.

Таблиця 8.48

Результати проведеної деградації для субстанції сальбутамолу сульфату

	0.1 M NaOH	0.1 M HCl	3 % H_2O_2	Температура (100°)
Невизначена домішка (НД) 1 (14,47 хв)	–	0,18 %	–	–
НД 2 (9,69 хв)	–	–	1,91 %	–
НД 3 (10,44 хв)	–	–	1,49 %	–
НД 4 (13,59 хв)	–	–	0,26 %	–
НД 5 (13,72 хв)	–	–	0,27 %	–
НД 6 (15,99 хв)	–	–	0,86 %	–
НД 7 (16,82 хв)	–	–	0,95 %	–
Домішка D (13,43 хв)	1,59 %	–	0,24 %	2,66 %
Домішка G (15,55 хв)	3,15 %	–	0,78 %	–
Домішка F (18,35 хв)	–	–	–	–
Сума домішок	4,74 %	0,18 %	6,79 %	2,66 %

Як видно з результатів, сальбутамол сульфат не був стійким до впливу температури, лужного гідролізу та окиснення. Вплив перекису був найбільшим, водночас детектувалася найбільша кількість неідентифікованих домішок. З іншого боку, найбільша кількість домішок D і G була знайдена після оброблення розчину лугом.

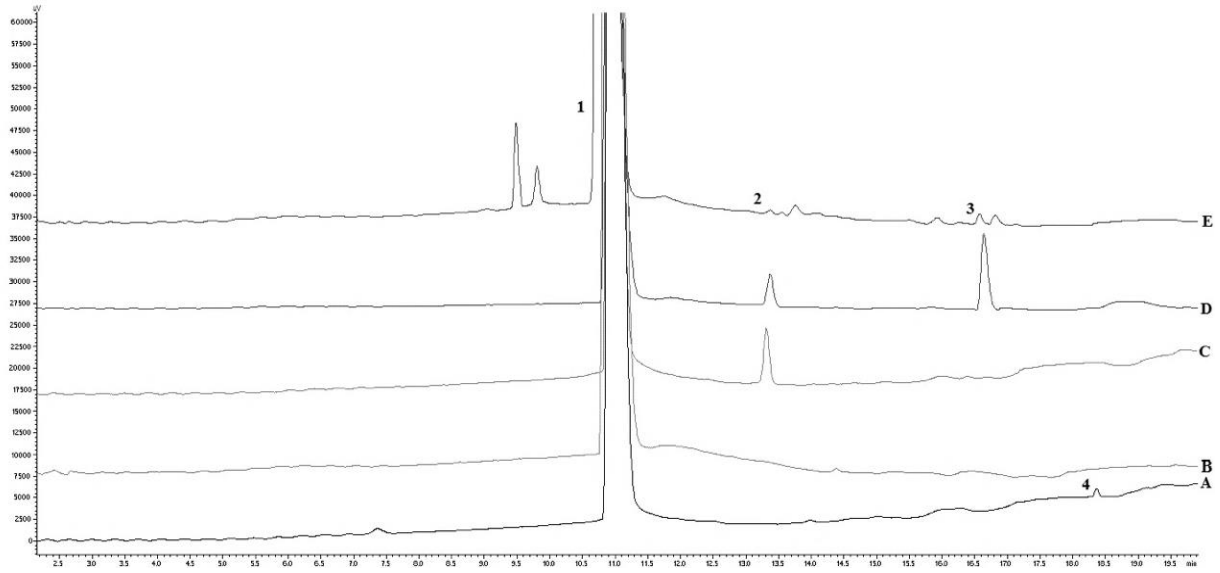


Рис. 8.35. Хроматограми дослідження деградації: A — субстанція сальбутамолу сульфату; B — в умовах кислотної деградації; C — в умовах температурної деградації; D — в умовах лужної деградації; E — в умовах пероксидної деградації; 1 — сальбутамол сульфат; 2 — домішка D; 3 — домішка G; 4 — домішка F

Тема 9. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ У ДФУ

ДФУ 2.2.26. ХРОМАТОГРАФІЯ НА ПАПЕРІ

Висхідна хроматографія на папері

Обладнання: складається з відповідної за розміром використовуваному хроматографічному паперу скляної камери зі щільно припасованою кришкою. Камера у верхній частині має бути споряджена пристроєм для закріплення хроматографічного паперу, за допомогою якого його можна опускати, не відкриваючи камери. На дні камери розташована ємність (кювета) для рухомої фази, у яку може бути занурений нижній край паперу. Хроматографічний папір являє собою відповідний фільтрувальний папір, розрізаний на смужки достатньої довжини і завширшки не менше 2,5 см; папір має бути розрізаний так, щоб рухома фаза рухалася уздовж напрямку волокон паперу.

Методика. Зазначену в монографії рухому фазу поміщають у човник у кількості, достатній для утворення шару завглибшки 2,5 см. Якщо зазначено в монографії, між стінками камери та кювети поміщають хроматографічний папір. Для насичення камеру закривають кришкою і витримують звичайно протягом 24 год за температури від 20 до 25 °С. Підтримують таку температуру камери протягом всього випробування. На відстані 3 см від одного краю по всій ширині смужки паперу олівцем наносять тонку горизонтальну лінію. Зазначений у монографії об'єм розчину наносять на одержану лінію за допомогою мікропіпетки. Якщо увесь зазначений об'єм розчину утворить пляму діаметром понад 10 мм, розчин наносять невеликими порціями, даючи кожній з них висохнути перед нанесенням наступної. Якщо на одній смужці паперу має бути одержана більше як одна хроматограма, розчини наносять уздовж лінії так, щоб відстань між точками нанесення окремих проб була не менше 3 см. Папір поміщають у камеру, закривають камеру кришкою і витримують протягом 1 год 30 хв. Папір опускають у рухому фазу і проводять елюювання протягом зазначеного часу або на зазначену відстань, яку має пройти рухома фаза. Протягом усього процесу елюювання папір захищають від дії прямих сонячних променів. Смужку паперу виймають з камери і сушать на повітрі.

Низхідна хроматографія на папері

Обладнання: складається з відповідної за розміром використовуваному хроматографічному паперу скляної камери зі щільно припасованою кришкою. У центрі кришки має бути отвір з діаметром близько 1,5 см, закритий важкою скляною пластиною або пробкою. У верхній частині камери розташована кювета для рухомої фази, споряджений пристроєм для закріплення хроматографічного паперу. З кожного боку кювети паралельно йому і трохи вище його верхнього краю розташовані два напрямних скляних стрижні, що підтримують папір у такому положенні, щоб він не торкався стінок камери. Хроматографічний папір являє собою відповідний фільтрувальний папір, розрізаний на смужки достатньої довжини і завширшки не менше 2,5 см і не більше за довжину кювети; папір має бути ро зрізаний таким чином, щоб рухома фаза рухалася уздовж напрямку волокон паперу.

Методика. Зазначену в монографії рухому фазу поміщають на дно камери в кількості, достатній для утворення шару завглибшки 2,5 см. Для насичення камеру закривають кришкою і витримують звичайно протягом 24 год за температури від 20 до 25 °С. Підтримують таку температуру камери протягом проведення всього випробування. По всій ширині смужки паперу олівцем наносять тонку горизонтальну лінію від закріпленого в кюветі краю на такій відстані, щоб лінія була розташована паралельно напрямним скляним стрижням і декількома сантиметрами нижче їх. Зазначений у монографії об'єм розчину наносять на одержану лінію за допомогою мікропіпетки. Якщо увесь зазначений об'єм розчину утворить пляму діаметром понад 10 мм, розчин наносять невеликими порціями, даючи кожній з них висохнути перед нанесенням наступної. Якщо на одній смужці паперу має бути одержана більше як одна хроматограма, розчини наносять уздовж лінії так, щоб відстань між точками нанесення окремих проб була не менше 3 см. Папір поміщають у камеру, закривають камеру кришкою і витримують звичайно протягом 1 год 30 хв. Через отвір у кришці в кювету поміщають достатню кількість рухомої фази і проводять елюювання протягом зазначеного часу або на зазначену відстань, яку має пройти рухома фаза. Протягом усього процесу елюювання папір захищають від дії прямих сонячних променів.

ДФУ 2.2.27.ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ

Тонкошарова хроматографія являє собою метод розділення, в якому використовується нерухома фаза, що складається з придатного матеріалу, нанесеного у вигляді стандартизованого тонкого шару і зафіксованого на основі (пластинці або пластині) зі

скла, металу або пластмаси. Перед хроматографуванням розчини речовин, що аналізуються, наносять на пластинку. Розділення засноване на процесах адсорбції, розподілу, іонного обміну або на їх комбінації і здійснюється за допомогою переміщення в тонкому шарі (нерухомій фазі) випробовуваних речовин, розчинених у розчиннику або у підхожій суміші розчинників (рухомій фазі).

Обладнання *Пластинки.*Хроматографування проводять з використанням пластинок, одержаних я к зазначено у *4.1.1 ДФУ.*

Попередня підготовка пластинок. Іноді може знадобитися промивання пластинок перед хроматографуванням, яке може бути виконане з допомогою попереднього елюювання чистих пластинок у підхожому розчиннику. Пластинки можуть бути також імпрегновані (просочені) з допомогою таких процедур, як елюювання, занурення або обприскування. Перед використанням пластинки активують, якщо необхідно, за допомогою нагрівання у термостаті за температури 120 °С протягом 20 хв.

Хроматографічна камера являє собою ємність зі щільно припасованою кришкою і з плоским дном або дном з двома жолобами з інертного прозорого матеріалу, відповідними за розміром використовуваним пластинкам. Для горизонтального елюювання хроматографічна камера має жолоб для рухомої фази і додатково містить пристрій для подачі рухомої фази до нерухомої фази.

Мікропіпетки, мікрошприци,калібровані капіляри або інші пристрої, придатні для нанесення розчинів.

Пристрій для виявлення або гасіння флуоресценції.

Проявні пристрої або реактиви. Підхожі пристрої, використовувані для перенесення реактивів на пластинку шляхом обприскування, оброблення парою або занурення, що забезпечують, якщо необхідно, нагрівання для виявлення розділених речовин.

Документування. Для документування виявлених хроматограм можуть бути використані, наприклад, фотографічні знімки або комп'ютерні файли.

Методика. *Нанесення зразка.* Наносять зазначений об'єм на лінію, паралельну нижньому краю, на відповідній відстані від нижнього краю і від боків пластинки; допускають відстань мінімум 10 мм (5 мм для високоефективних пластинок) між центрами округлих плям і 5 мм (2 мм для високоефективних пластинок) між боками смуг. Розчини наносять якомога меншими порціями, одержуючи круглі плями від 2 до 5 мм у діаметрі (від 1 до 2 мм для високоефективних пластинок) або смуги завдовжки від 10 до 20 мм (від 5 до 10 мм для високоефективних пластинок) і завширшки від 1 до 2 мм. У монографії, якщо допускається можливість використання як звичайних, так і високоефективних пластинок, експериментальні умови для високоефективних

пластинок зазначають у дужках після їх зазначення для звичайних пластинок. *Вертикальне елюювання.* Стінки хроматографічної камери вистилають фільтрувальним папером. Рухому фазу наливають у камеру в кількості, достатній для того, щоб після змочування фільтрувального паперу покрити дно камери шаром рідини, необхідним для хроматографування. Для насичення хроматографічну камеру з рухомою фазою закривають кришкою і витримують протягом 1 год за температури від 20 до 25 °C. Якщо немає інших зазначень у монографії, хроматографічне розділення проводять у насиченій камері. Певні об'єми розчинників наносять, як зазначено вище. Після випаровування розчинників з нанесених проб пластинку поміщають у хроматографічну камеру якомога більш вертикально, стежачи за тим, щоб плями або смуги знаходилися вище поверхні рухомої фази. Камеру закривають, залишають її за температури від 20 до 25 °C у захищеному від прямих сонячних променів місці. Пластинку виймають після того, як рухома фаза пройде зазначену в монографії відстань, вимірювану між точками нанесення зразків і фронтом розчинника. Пластинку висушують і проявляють плями способом, зазначеним у монографії. У разі двовимірної хроматографії після першого хроматографування пластинку висушують і виконують друге хроматографування у напрямку, перпендикулярному до першого. Горизонтальне елюювання. Об'єми розчинів випробовуваних речовин, зазначені в монографії, наносять як описано вище. Після випаровування розчинників з нанесених проб у жолоб хроматографічної камери уводять за допомогою шприца або піпетки достатню кількість рухомої фази, поміщають пластинку горизонтально в хроматографічну камеру і приєднують пристрій для подачі рухомої фази відповідно до інструкції виробника. Якщо зазначено в монографії, пластинку елюють, починаючи одночасно з двох кінців. Камеру закривають і проводять хроматографування за температури від 20 до 25 °C. Після того, я к рухома фаза пройде відстань, зазначену в монографії, пластинку виймають, висушують і проявляють плями зазначеним способом. У разі двовимірної хроматографії після першого хроматографування пластинку сушать і виконують друге хроматографування у напрямку, перпендикулярному до першого.

Візуальна оцінка

Ідентифікація. Основну пляму на хроматограмі, одержаній для випробовуваного розчину, порівнюють візуально з відповідною плямою на хроматограмі, одержаній для розчину стандартного зразка (розчину порівняння), порівнюючи забарвлення, розмір і коефіцієнт утримування (R_f) обох плям.

Коефіцієнт утримування визначають як відношення відстані від точки нанесення проби до центру плями після хроматографування до відстані, пройденої фронтом розчинника від точки нанесення. *Перевірка розділювальної здатності нерухомої фази для ідентифікації.* Звичайно для оцінки придатності досить випробування на придатність нерухомої фази, зазначеного у *4.1.1 ДФУ*. В особливих випадках додаткові вимоги зазначають у монографіях.

Випробування на супровідні домішки. Додаткову пляму (плями) на хроматограмі, одержаній для випробовуваного розчину, порівнюють візуально з плямою (плямами) на хроматограмі, одержаній для розчину порівняння. Як стандартний зразок для приготування розчину порівняння використовують як саму домішку (домішки), так і різні розведення випробовуваного розчину.

Перевірка розділювальної здатності. Вимоги для перевірки розділювальної здатності наводять у відповідних монографіях.

Перевірка чутливості. Чутливість вважається задовільною, якщо пляма або смуга чітко виявляються на хроматограмі, одержаній з найбільш розведеним розчином порівняння.

Кількісні вимірювання

Вимоги до визначення і розділення речовин наводять у монографіях. Якщо речовини, розділювані методом тонкошарової хроматографії, поглинають або флуоресціюють в ультрафіолетовому або видимому світлі, їх можна кількісно визначити безпосередньо на пластинці, використовуючи відповідне обладнання. Для цього вимірюють відбиття або пропускання світла, що падає, пересуваючи пластинку або вимірювальний пристрій. Аналогічно, використовуючи відповідне оптичне обладнання, можна вимірювати флуоресценцію. Речовини, які містять радіонукліди, можуть бути кількісно визначені трьома способами:

- ✓ безпосередньо на пластинці — пересуванням пластинки уздовж придатного лічильника радіоактивності або лічильника радіоактивності уздовж пластини;
- ✓ розрізанням пластинки на смуги і вимірюванням радіоактивності на кожній смузі, використовуючи відповідний лічильник радіоактивності;
- ✓ зіскрібанням нерухомої фази, розчиненням її у підхожому сцинтиляційному коктейлі і вимірюванням радіоактивності з використанням рідинного сцинтиляційного лічильника.

Обладнання для вимірювань безпосередньо на пластинці містить:

✓ пристрій для прямого нанесення у певному місці пластинки необхідної кількості речовини;

✓ механічний пристрій для пересування пластинки або вимірювального пристрою вздовж осей X або Y;

✓ самописець та інтегратор або комп'ютер;

✓ *для речовин, що поглинають або флуоресціюють в ультрафіолетовому або видимому світлі:* для вимірювання відбиття або пропускання використовуються фотометр з джерелом світла, оптичним пристроєм, що генерує монохроматичне світло, і фотокомірку відповідної чутливості; коли вимірюється флуоресценція, потрібен додатково монохроматичний фільтр для вибору відповідної спектральної ділянки випромінюваного світла;

✓ *для речовин, що містять радіонуклиди:* підхожий лічильник радіоактивності; для нього необхідно перевірити лінійність діапазону вимірювання.

Методика. Зазначеним у монографії способом готують розчин випробовуваної речовини (випробовуваний розчин) і, якщо необхідно, розчини стандартних зразків випробовуваної речовини у тому самому розчиннику (розчини порівняння). Наносять однаковий об'єм кожного розчину на пластинку і хроматографують.

Для речовин, що поглинають або флуоресціюють в ультрафіолетовому або видимому світлі. Готують і наносять не менше 3 розчинів порівняння, концентрації яких охоплюють очікуване значення концентрації у випробовуваному розчині (близько 80, 100 і 120 % від цієї концентрації). Обприскують, якщо необхідно, зазначеним реактивом і реєструють відбиття, пропускання або флуоресценцію на хроматограмах, одержаних для випробовуваного розчину і розчинів порівняння. За одержаними даними розраховують кількість речовини у випробовуваному розчині.

Для речовин, що містять радіонуклиди. Готують і наносять випробовуваний розчин, що містить близько 100 % очікуваного значення концентрації. Вимірюють радіоактивність я к функцію довжини шляху і записують радіоактивність кожного одержаного піка у відсотках від сумарної радіоактивності.

Критерії оцінки придатності хроматографічної системи зазначені у *2.2.46 ДФУ.* У цій статті також зазначений діапазон варіювання параметрів хроматографічної системи для відповідності критеріям придатності хроматографічної системи.

ДФУ 2.8.25. ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ І ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Високоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ) використовується для якісного аналізу ЛРС й лікарських рослинних препаратів. Для цього варіанта методу ТШХ (2.2.27) зазвичай використовують скляну пластинку, яка вкрита однорідним пористим шаром (середній розмір пор — 6 нм) зазвичай товщиною 200 мкм; тонкий шар складається із силікагелю, розмір частинок якого варіює від 2 до 10 мкм і в середньому становить 5 мкм, полімерної зв'язувальної речовини і флуоресцентного індикатора (F254). Результати випробування перевіряють, використовуючи тест на придатність хроматографічної системи.

Обладнання для якісної ВЕТШХ зазвичай містить:

— скляні пластинки, як зазначено вище, зазвичай розміром 20 см Å~ 10 см;

— підхожий пристрій для нанесення зазначених об'ємів розчинів у вигляді смуг, який дозволяє контролювати розміри і положення зони нанесення;

— підхожий пристрій для кондиціювання нерухомої фази за зазначеної відносної вологості;

— підхожу хроматографічну камеру (наприклад, камеру з двома жолобами);

— підхожий пристрій, який забезпечує відтворюване висушування пластинки після елюювання;

— підхожий пристрій для нанесення реактивів і нагрівання пластинки для проведення процедури дериватизації;

— підхожу систему для електронного документування хроматограм в УФ-світлі за довжин хвиль 254 і 366 нм або в білому світлі.

Примітка. Допускається застосування звичайних варіантів методу ТШХ з використанням скляних пластинок або листків, що вкриті частинками з розміром від 5 до 40 мкм, або ВЕТШХ-листків з алюмінієвою основою за умови, що одержані результати задовольняють такі загальні вимоги тесту на придатність системи: смуги елюються перпендикулярно до нижнього краю пластинки, фронт рухомої фази є паралельним до верхнього краю пластинки, а також за умови виконання вимог тесту на придатність хроматографічної системи, зазначених в окремій монографії.

Методика. Приготування випробовуваного розчину. Випробовуваний розчин описаний в окремій монографії і зазвичай його готують, як наведено нижче. Для сухої ЛРС і сухих рослинних екстрактів: змішують 0.5 г здрібненої на порошок ЛРС або 0.1 г сухого рослинного екстракту з 5.0 мл *метанолу Р* й обробляють ультразвуком протягом 15 хв; фільтрують або центрифугують і використовують фільтрат або надосадову рідину як випробовуваний розчин. Для ефірних олій: розчиняють 50 мкл ефірної олії в 1.0 мл *толуолу Р* і використовують цей розчин як випробовуваний.

Приготування розчинів порівняння. Розчини порівняння описані в окремій монографії і зазвичай їх готують, як наведено нижче. Готують розчин 1 мг/мл (позначений як «R» на хроматограмах, наведених у монографії) відповідного реактиву(ів) або стандартного зразка(ів) у *метанолі Р* або (для ефірних олій) у толуолі Р. Готують другий розчин порівняння (розведений розчин порівняння позначений як «R 1/4» на хроматограмах, наведених у монографії) змішуванням 1 об'єму одержаного розчину і 3 об'ємів того самого розчинника (інколи замість цього розчину може бути описаний інший розведений розчин порівняння, наприклад, «R 1/20»). Обидва розчини використовують як еталони інтенсивності.

Маркер інтенсивності. Використовують одну або більше речовин у розчині порівняння та розведеному розчині порівняння як маркер(и) інтенсивності для оцінювання хроматограми.

Приготування розчину для тесту на придатність хроматографічної системи. Розчин готують, як зазначено в окремій монографії.

Нанесення зразків і розмітка пластинки. Зразки зазвичай наносять у вигляді вузьких смуг довжиною 8 мм на відстані 8 мм від нижнього краю пластинки. Центр першого треку, який використовують для розчину для тесту на придатність хроматографічної системи, має бути на відстані 20 мм від лівого краю пластинки. Мінімальна відстань між треками (від центру до центру) має бути 11 мм. На стандартну пластинку наносять не більше 15 треків. Якщо не використовується електронний пристрій для детектування фронту рухомої фази, відстань, що має пройти рухома фаза, позначають олівцем біля лівого або правого краю пластинки.

Кондиціювання пластинки. Після нанесення зразків і якщо в окремій монографії не зазначено інше, пластинку витримують на повітрі за підхожої відносної вологості, яку забезпечують, використовуючи насичений розчин *магнію хлориду Р* (наприклад, пластинку витримують протягом 1 год у закритій камері, яка містить такий розчин, або використовують попередньо кондиційоване повітря).

Підготовка камери й елюювання пластинки. Якщо в окремій монографії не зазначено інше, хроматографічне розділення проводять у насиченій камері. У разі

використання камери з двома жолобами фільтрувальний папір поміщають у дальній жолоб. Заповнюють камеру достатньою кількістю рухомої фази так, щоб фільтрувальний папір повністю просочився та рівень рідини в обох жолобах становив 5 мм. Камеру закривають кришкою і витримують протягом 20 хв для насичення. Пластинку поміщають у передній жолоб камери вертикально, тонкий шар за такої умови має бути розвернутий до фільтрувального паперу. Коли рухома фаза пройде зазначену дистанцію (зазвичай це 70 мм від нижнього краю пластинки), пластинку виймають із камери і сушать у вертикальному положенні в потоці повітря за кімнатної температури. Інші форма камери і відстань проходження рухомої фази можуть бути зазначені в окремій монографії.

Примітка. Інші камери можуть бути застосовані за умови, що одержані результати відповідають усім вимогам придатності хроматографічної системи. Візуалізація. Хроматограми на пластинці візуалізують, як зазначено в окремій монографії в умовах виявлення. У разі використання дериватизаційних реактивів пластинку розміром 20 см Å~ 10 см рівномірно обприскують зазвичай 3.5 мл розчину реактиву або занурюють пластинку в розчин реактиву, зазвичай зі швидкістю 5 мм/с і часом затримки 1 с. Спостереження може бути проведено в УФ-світлі за довжини хвилі 254 або 366 нм або в білому світлі до й/або після дериватизації. У разі цифрового запису хроматограм час експозиції слід регулювати, орієнтуючись на трек розчину для тесту на придатність хроматографічної системи. Тест на придатність хроматографічної системи. Цей тест заснований на розділенні двох речовин, які мають близькі коефіцієнти затримки (R_f) і ледь розділяються за зазначених хроматографічних умов (наприклад, хлорогенова кислота й гіперозид у хроматографічній системі, використовуваній для флавоноїдів). Результати, одержані для випробовуваного розчину й розчину порівняння, є придатними, якщо результати хроматографування розчину для тесту на придатність хроматографічної системи задовольняють вимоги до розділення, зазначені в окремій монографії. Візуальне оцінювання. Хроматограми випробовуваного розчину й розчинів порівняння порівнюють з описом, наданим у розділі «Результати» окремої монографії, оцінюють положення зон, їх колір, а також — на хроматограмі випробовуваного розчину — їх інтенсивність. На хроматограмі випробовуваного розчину зони, для яких у таблиці результатів надано опис «еквівалентні» або для яких не надано опису інтенсивності, мають інтенсивність, близьку до інтенсивності зони маркера на хроматограмі розчину порівняння (R). Зони, описані як «інтенсивні», візуально більш інтенсивні, ніж зона маркера інтенсивності на хроматограмі розчину порівняння; зони, описані як «слабі», візуально менш інтенсивні, ніж зона маркера інтенсивності на хроматограмі розчину порівняння, і рівні за інтенсивністю або більш інтенсивні, ніж зона маркера інтенсивності на хроматограмі розведеного розчину порівняння (R 1/4, R 1/20 тощо); зони, описані як «дуже слабі», візуально менш інтенсивні, ніж зона маркера інтенсивності на хроматограмі розведеного розчину порівняння.

ДФУ 2.2.28. ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ

Газова хроматографія (ГХ) являє собою метод розділення, у якому рухомою фазою є газ (газ-носій), а нерухомою фазою, поміщеною у колонку, є тверда речовина або рідина, що нанесені на твердий інертний носій або рівномірно покривають внутрішні стінки колонки.

ГХ заснована на механізмах адсорбції і/або розподілу.

Обладнання: складається із системи подачі газу, пристрою введення проби, хроматографічної колонки, детектора і реєструвального пристрою. Колонки звичайно виготовляють зі скла або неіржавної сталі й заповнюють нерухомою фазою. Газ-носій проходить із заданою швидкістю через блок вводу проби, колонку, а потім через детектор.

Визначення проводять за постійної температури або відповідно до заданої температурної програми.

Інжектори. Пряме введення (інжекція) розчинів є звичайним способом уведення, якщо немає інших зазначень у монографії. Введення може бути проведене безпосередньо в верхню частину колонки з використанням шприца або ін'єкційного пневмоапарата, або через пароутворювальну камеру, яка може бути споряджена роздільником потоку.

Уведення парової фази може бути здійснено шляхом статичної або динамічної парофазної системи вводу.

Динамічна парофазна система (продувка і уловлювач) вводу містить барботувальний пристрій, шляхом якого леткі речовини у розчині продуваються через абсорбівну колонку, в якій підтримується невелика температура. Утримувані речовини потім десорбуються у рухому фазу за швидкого нагрівання абсорбівної колонки.

Статична парофазна система вводу містить нагріту термостатовану камеру для зразків, до якої поміщені закриті віали з твердими або рідкими зразками на фіксований період часу, шо дозволяє летким компонентам зразка досягти стану рівноваги між негазовою та паровою фазами. Після встановлення рівноваги наперед задана кількість парової фази з віал уводиться у газовий хроматограф.

Нерухомі фази помішають у колонки, які можуть бути:

- ✓ капілярними колонками з плавленого кварцу, стінки яких покриті нерухомою фазою;
- ✓ колонками, заповненими інертними частинками, імпрегнованими нерухомою фазою;
- ✓ колонками, заповненими твердою нерухомою фазою.

Капілярні колонки мають внутрішній діаметр від 0,1 до 0,53 мм і довжину від 5 до 60 м. Рідина, або нерухома фаза, яка може бути хімічно зв'язаною з внутрішньою поверхнею, являє собою плівку від 0,1 до 5,0 мкм завтовшки.

Набивні колонки, зроблені зі скла або металу, звичайно мають довжину від 1 до 3 м і внутрішній діаметр від 2 до 4 мм. Нерухома фаза звичайно являє собою пористий полімер або твердий носій, імпрегнований рідкою фазою.

Носії для аналізу полярних сполук на колонках, набитих малоємною, малополярною нерухомою фазою, мають бути інертними для запобігання утворенню хвостатих піків. Активність носіїв може бути зменшена їх силанізуванням перед покриттям рідкою фазою. Часто використовують промиті кислотою, прожарені діатомітові землі. Доступними є матеріали з різним розміром частинок, з-поміж яких найбільш використовувані матеріали з розміром частинок у діапазонах від 150 до 180 мкм і від 125 до 150 мкм.

Рухомі фази. Час утримування та ефективність піка залежать від швидкості потоку газу-носія; час утримування прямо пропорційний довжині колонки, а ступінь розділення пропорційний квадратному кореню довжини колонки. Для набивних колонок швидкість потоку газу-носія звичайно виражають у мілілітрах за хвилину за атмосферного тиску та кімнатної температури. Швидкість потоку вимірюють на виході детектора за допомогою каліброваного автоматичного пристрою або бульбашкової трубки за робочої температури колонки. Ліній на швидкість газу-носія через набивну колонку зворотно пропорційна квадратному кореню внутрішнього діаметра колонки для цього об'єму потоку. Швидкості потоку 60 мл/хв у колонці із внутрішнім діаметром 4 мм та 15 мл/хв у колонці з внутрішнім діаметром 2 мм дають ідентичні швидкості й аналогічний час утримування.

Звичайно застосовують гелій або азот як газ-носій для набивних колонок, тоді як для капілярних колонок звичайно використовують азот, гелій і водень.

Детектори. Звичайно застосовують полуменево-іонізаційні детектори, але додатково можуть використовуватися такі детектори: електронного захоплення, азотно-фосфорні, мас-спектрометричні, тер-мокондуктометричні, ІЧ-спектрофотометричні з Фур'є-перетворенням інші залежно від мети аналізу.

Методика. Колонку, інжектор і детектор термостатують за температури та швидкості потоку газу, зазначених у монографії, до одержання стабільної базової лінії. Готують випробовуваний розчин і розчин(и) порівняння, як зазначено в монографії. Розчини не мають містити твердих частинок.

Критерії оцінки придатності хроматографічної системи зазначені у статті *«Методи хроматографічного розділення» (2.2.46).* У цій статті також зазначений діапазон варіювання параметрів хроматографічної системи для відповідності критеріям придатності хроматографічної системи.

Статична парофазна газова хроматографія є методом, найбільш придатним для розділення і визначення летких сполук, присутніх у твердих або рідких зразках. Метод заснований на аналізі парової фази, шо перебуває у рівновазі з твердою або рідкою фазою.

Обладнання: складається з газового хроматографа, оснащеного пристроєм вводу парової фази, що розташований над випробовуваним зразком. Пристрій вводу може бути приєднаний до блока, що автоматично контролює і регулює тиск і температуру. Якщо необхідно, використовують пристрій для видалення розчинників.

Випробовувану пробу вводять у віалу, оснащену придатною пробкою і клапанною системою, яка регулює проходження газу-носія. Віалу поміщають у термостатовану камеру з температурою, що становлюється відповідно до властивостей аналізованого зразка.

Пробу витримують за заданої температури протягом часу, достатнього для становлення рівноваги між твердою або рідкою фазою і паровою фазою.

У віалу вводять газ-носій і після закінчення зазначеного часу відкривають клапан, щоб газ надходив у хроматографічну колонку, переносячи з собою компоненти, що перейшли в парову фазу.

Замість використання хроматографа, спеціально оснащеного пристроєм для вводу парової фази, можливе також використання герметичних шприців і хроматографа без зазначеного пристрою. У цьому разі рівновага установлюється в окремій камері, і парова фаза переноситься в колонку з дотриманням необхідних застережних заходів для запобігання будь-яким змінам рівноважного складу.

Методика. Налаштовують прилад для одержання необхідного сигналу, використовуючи підготовані зразки порівняння.

Метод прямого калібрування. В однакові віали нарізно поміщають випробовувану пробу і кожний зі зразків порівняння, приготовані, як зазначено в монографії, уникаючи контакту між пристроєм вводу проб і зразками.

Віали герметично закривають і поміщають у термостатовану камеру з температурою і тиском, за значеними в монографії. Після установлення рівноваги парову фазу хроматографують у зазначених умовах.

Метод стандартних добавок. Рівні об'єми випробовуваної проби поміщають в однакові підхожі віали. В усі віали, крім однієї, додають зазначені кількості розчину

порівняння, що містить відому концентрацію випробовуваної речовини, для одержання низки зразків з концентраціями цієї речовини, що рівномірно збільшуються.

Віали герметично закривають і помішають у термостатовану камеру з температурою і тиском, зазначеними в монографії. Після установлення рівноваги парову фазу хроматографують у зазначених умовах.

Рівняння лінійної залежності розраховують методом найменших квадратів. За одержаним рівнянням визначають концентрацію випробовуваної речовини у випробовуваній пробі.

Допускається визначення концентрації з використанням графічного методу. Для цього по осі ординат відкладають середні значення одержаних результатів, а по осі абсцис — концентрації стандартних добавок випробовуваної речовини. Екстраполюють лінію, що проходить через одержані точки, до перетину з віссю абсцис. Відстань між цією точкою і початком координат являє собою концентрацію випробовуваної речовини у випробовуваному розчині.

Метод послідовних доборів (багаторазова парофазна екстракція). Якщо зазначено, метод послідовних доборів повністю описують у монографії.

ДФУ 2.2.29. РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ

Рідинна хроматографія (РХ) являє собою метод хроматографічного розділення, заснований на різниці у розподілі молекул речовини між двома фазами, що не змішуються, в якому рухомою фазою є рідина, що переміщається через нерухому фазу, поміщену в колонку.

Рідинна хроматографія заснована на механізмах адсорбції, масового розподілу, іонного обміну, розподілу за розмірами молекул або стереохімічних взаємодій.

Якщо немає інших зазначень, уся наведена нижче інформація застосовна як для класичної РХ, так і для РХ, в якій використовуються колонки з меншим розміром частинок (наприклад, до 2 мкм).

В останньому випадку потрібні прилади, що дозволяють застосовувати більш високий тиск (зазвичай до 100 МПа, тобто 15 000 фунт/кв.дюйм), з більш вузькою позаколонковою зоною розмивання, поліпшеним градієнтним змішуванням і більш високою частотою аналогово-цифрового перетворення в системі детектування.

Обладнання: звичайно складається з пристрою п о давання рухомої фази, інжектора, хроматографічної колонки (можуть бути використані пристрої, що контролюють температуру колонки), детектора і системи реєстрації даних (або інтегруючого пристрою,

або пристрою запису спектрів). Рухома ф аза звичайно подається під тиском з однієї або декількох ємностей і протікає через колонку звичайно із п остійною швидкістю, а потім через детектор.

Пристрій для подавання рухомої фази необхідний для подавання рухомої фази з регульованою швидкістю потоку. Коливання тиску при цьому зводиться до мінімуму, наприклад шляхом пропускання розчинника, що є під тиском, через пристрій зменшення імпульсів. Трубопроводи та з'єднання здатні витримувати тиск, що створюється в результаті роботи пристрою для подавання рухомої фази. Насоси можуть бути обладнані системою пристроїв для відведення бульбашок захопленого повітря.

Насосні системи, що контролюються мікропроцесором, здатна точно подавати рухому фазу постійного складу (ізократичне елюювання) або складу, шо змінюється (градієнтне елюювання), відповідно до певної програми. За градієнтного елюювання є пристрій для подавання рухомої фази, шо подає розчинник(и) з декількох ємностей, водночас змішування розчинників відбувається на боці високого або низького тиску відносно насоса(ів).

Інжектори. Розчин випробовуваного зразка вводять у рухому фазу, що протікає, в/або близько верхньої частини колонки, використовуючи блок вводу проби, що може функціонувати за високого тиску. Використовують петльові дозатори або пристрої з регульованим об'ємом, які приводяться у дію вручну або за допомогою автосемплера. Ручне часткове н аповнення петель може призвести до зниження точності введення об'єму проби.

Нерухомі фази. Є багато таких різновидів нерухомих фаз, що застосовують у рідинній хроматографії, як:

- ✓ силікагель, окис алюмінію або пористий графіт, використовувані у нормальнофазовій хроматографії, в якій розподіл заснований на різниці в адсорбції і/або масовому розподілі (розподільна хроматографія);
- ✓ смоли або полімери з кислотними або основними групами, що використовуються в іонно-обмінній хроматографії, в якій розподіл заснований на конкуруванні між поділюваними іонами та іонами рухомої фази;
- ✓ пористі силікагелі та полімери, що використовуються в ексклюзійній хроматографії, в якій розподіл заснований на розбіжностях у розмірах молекул, відповідних стеричній ексклюзії;
- ✓ безліч хімічно модифікованих носіїв, одержаних із полімерів, силікагелю або пористого графіту, використовуваних у нормально-фазовій (адсорбційна хроматографія)

і обернено-фазовій рідинній хроматографії, в якій розподіл заснований на розподілі молекул речовини між рухомою та нерухомою фазами;

✓ спеціальні хімічно модифіковані нерухомі фази, наприклад, похідні целюлози або амілози, білків або пептидів, циклодекстринів тощо, для розподілу енантіомерів (хроматографія на хіральних нерухомих фазах).

Найчастіше розділення засноване на механізмах розподілу між хімічно модифікованими силікагелями, що використовуються як нерухома фаза, і полярними розчинниками, що використовуються як рухома фаза. Поверхня твердого носія, наприклад, силанольні групи силікагелю, взаємодіють з різними силановими реагентами, створюючи ковалентнозв'язані силільні похідні, що охоплюють варіаційну кількість активних ділянок поверхні твердого носія. Природа зв'язаних фаз є важливою характеристикою для визначення розділювальних властивостей хроматографічної системи. Звичайно застосовують зв'язані фази, зазначені нижче:

октильна $Si\text{-}(CH_2)_7\text{-}CH_3$ (C_8)

октадецильна $Si\text{-}(CH_2)_{17}\text{-}CH_3$ (C_{18})

фенільна $Si\text{-}(CH_2)_n\text{-}C_6H_5$ (C_6H_6)

ціанопропільна $Si\text{-}(CH_2)_3\text{-}CN$ (CN)

амінопропільна $Si\text{-}(CH_2)_3\text{-}NH_2$ (NH_2)

діольна $Si\text{-}(CH_2)_3\text{-}0\text{-}CH(0H)\text{-}CH_2\text{-}OH$

Якщо немає інших зазначень виробника, оберненофазові колонки на основі силікагелю вважаються стійкими у рухомих фазах, що мають значення pH у діапазоні від 2,0 до 8,0. Колонки, наповнені пористим графітом або частинками полімерного матеріалу, такого, як співполімер стиролдивінілбензолу, стійкі у більш широкому діапазоні pH.

Іноді застосовують нормально-фазову хроматографію з немодифікованими силікагелями, пористим графітом або полярними хімічно модифікованими силікагелями, наприклад, ціанопропільними або діольними, як нерухому фазу, з неполярною рухомою фазою.

Для розділення з аналітичною метою частіше використовують нерухомі фази з розміром частинок від 2 до 10 мкм. Частинки можуть бути сферичними або неправильної форми, з різною пористістю та питомою поверхнею. Ці властивості визначають хроматографічні властивості конкретних нерухомих фаз. Для обернених нерухомих фаз природа нерухомої фази, ступінь зв'язування, виражений як вміст вуглецю, а також наявність «ендкепіювання» нерухомих фаз (тобто частина залишкових силанольних груп) є додатковими визначальними факторами. Якщо наявні залишкові силанольні

групи, може виникати асиметрія піків, особливо для речовин з основними властивостями. Поряд з матеріалами з пористими частинками можуть бути використані поверхнево-пористі або монолітні матеріали.

В аналітичній хроматографії використовують колонки, вироблені з неіржавної сталі, якщо немає інших зазначень у монографії, з довжиною і внутрішнім діаметром, шо варіюються. Колонки з внутрішнім діаметром менше 2 мм часто відносять до мікроколонок. Температура рухомої фази та колонки має підтримуватися постійною протягом усього аналізу. Здебільшого хроматографування проводять за кімнатної температури, але іноді для оптимального режиму розподілу потрібна інша температура.

Рухомі фази. Для нормальнофазової хроматографії звичайно застосовують малополярні органічні розчинники. Для отримання відтворюваних результатів у розчинниках, використовуваних для приготування рухомих фаз, суворо контролюється вміст води. В обернено-фазовій рідинной хроматографії застосовують водні рухомі фази з органічними модифікаторами або без. Компоненти рухомої фази звичайно фільтрують з метою видалення частинок понад 0,45 мкм (або 0,2 мкм, якщо нерухома фаза складається із частинок менше 0,2 мкм і якщо використовуються спеціальні детектори, наприклад, нефелометричні). Багатокомпонентні рухомі фази готують змішуванням необхідних об'ємів (якщо не зазначено змішування мас) індивідуальних компонентів. Як альтернатива розчинники можуть бути подані окремими насосами або одним насосом з дозувальним клапаном, з допомогою яких здійснюється змішування в необхідних пропорціях. Розчинники звичайно дегазують перед подаванням, щоб уникнути утворення бульбашок газу в кюветі детектора, шляхом барботування гелієм, обробки ультразвуком та/або використовуючи мембранно-вакуумні модулі у режимі «online».

Розчинники для приготування рухомої фази звичайно вільні від стабілізаторів, якщо застосовується ультрафіолетовий детектор, вони прозорі за довжини хвилі детектування. Використовувані розчинники та інші компоненти мають бути відповідної якості. Коригування pH, якщо необхідно, здійснюється для водного компонента рухомої фази, а не для суміші. Якщо використовуються буферні розчини або ізотонічні сольові розчини, то проводиться відповідне промивання системи сумішшю води та органічної частини рухомої фази в невеликій концентрації (5 %) для запобігання кристалізації солей після завершення процесу аналізу.

Рухомі фази можуть містити інші компоненти, наприклад, протиіони для іонопарної хроматографії або хіральні модифікатори для хроматографії, що використовує ахіральні нерухомі фази.

Детектори. В ультрафіолетовій і видимій ділянках спектра частіше застосовуються спектрофотометри, зокрема діодно-матричні пристрої. Можуть використовуватися флуоресцентні спектрофотометри, диференціальні рефрактометри (ДР, RI), електрохімічні детектори (ЕХД, ECD), нефелометричні детектори, детектори зарядженого аерозолю (АЗД; CAD), масспектрометри (МС, MS), детектори радіоактивного випромінювання або інші спеціальні детектори.

Методика. Колонку врівноважують за зазначених складі та швидкості потоку рухомої фази за кімнатної температури або за температури, зазначеній у монографії, до того моменту, коли буде одержана стабільна базова лінія. Готують випробовуваний розчин і розчин(и) порівняння, як зазначено в монографії. Розчини не мають містити твердих частинок.

Критерії оцінки придатності хроматографічної системи зазначені у статті *«Методи хроматографічного розділення» (2.2.46).* У цій статті також зазначений діапазон варіювання параметрів хроматографічної системи для відповідності критеріям придатності хроматографічної системи.

ДФУ 2.2.30. ЕКСКЛЮЗІЙНА ХРОМАТОГРАФІЯ

Ексклюзійна хроматографія являє собою хроматографічний метод, у якому процес розподілу молекул у розчині відбувається відповідно до їх розмірів. У разі використання органічної рухомої фази метод називають *гель-проникною хроматографією,* а у разі використання водної рухомої фази — *гель-фільтраційною хроматографією.* Проба вводиться в колонку, заповнену гелем або пористими частинками наповнювача, і переноситься рухомою фазою через колонку. Розподіл за розмірами відбувається за рахунок багаторазових обмінів молекул розчиненої речовини між розчинником рухомої фази і цим самим розчинником у нерухомій рідкій фазі (нерухома фаза) у порах матеріалу, яким заповнена колонка. Діапазон розмірів розділюваних молекул визначається діапазоном розмірів пор наповнювача.

Досить маленькі молекули, що здатні проникати в усі пори матеріалу, елюються в повному об'ємі колонки *(V_t — повний проникний об'єм або межа ексклюзії*). Молекули з розмірами, що перевищують розмір усіх пор матеріалу колонки, мігрують лише крізь простір між частинками наповнювача без утримування й елююються у вільному об'ємі колонки (V_0 — *об'єм ексклюзії або «мертвий» об'єм).* Розподіл молекул за розмірами відбувається між об'ємом ексклюзії і повним проникальним об'ємом колонки;

найбільш ефективний розподіл звичайно відбувається в перших двох третинах певного діапазону.

Обладнання. Обладнання містить хроматографічні колонки з довжиною і внутрішнім діаметром, що варіюються, заповнені матеріалом, що забезпечує розподіл молекул за розмірами у потрібному діапазоні. Якщо необхідно, колонку термостатують. Через колонку з постійною швидкістю пропускають елюент. До одного кінця колонки звичайно приєднують пристрій уведення проби, наприклад, інжектор із припиненням потоку, шприцевий інжектор з мембраною для уведення проби без припинення потоку або петльовий інжектор з клапаном, що перемикає потік. До цього кінця колонки також може бути приєднаний відповідний насос для подачі елюенту з контрольованою швидкістю. Проба може також наноситися безпосередньо на суху поверхню матеріалу колонки або, якщо густина проби перевищує густину елюенту, проба може нашаровуватися на поверхню матеріалу колонки під елюент. Інший кінець колонки звичайно приєднують до відповідного детектора з автоматичним пристроєм, що реєструє і забезпечує контроль відносних концентрацій розділених компонентів проби. Звичайно використовують такі детектори: фотометричний, рефрактометричний або люмінісцентний. Якщо необхідно, може бути приєднаний автоматичний колектор фракцій.

Як наповнювач може використовуватися або такий м'який матеріал, як набряклий гель, або такий жорсткий, як пористе скло, силікагель або підхожий для певного розчинника поперечнозшитий органічний полімер. У використанні жорстких матеріалів звичайно застосовують примусову подачу рухомої фази під тиском, що прискорює розподіл. Рухому фазу вибирають, виходячи з природи проби, наповнювача і методу детектування. Зазначення щодо оброблення матеріалу для заповнення колонки перед виконанням розподілу й пакування колонки надані у відповідній монографії або інструкції виробника.

Критерії оцінки придатності хроматографічної системи зазначені у статті *«Методи хроматографічного розділення» (2.2.46).* У цій статті також зазначений діапазон варіювання параметрів хроматографічної системи для відповідності критеріям придатності хроматографічної системи.

Визначення відносного компонентного складу сумішей. Розподіл проводять, як описано в монографії. Якщо можливо, записують хроматограму, одержану в процесі розподілу, і вимірюють площі відповідних піків. Якщо чутливість однакова для всіх компонентів проби (наприклад, вони мають однакове питоме оптичне поглинання), відносний вміст кожного компонента обчислюють як відношення площі піка відповідного

компонента до суми площ піків усіх компонентів. Якщо для різних компонентів проби чутливість різна, вміст кожного компонента розраховують за допомогою калібрувальних кривих, одержаних із використанням відповідних стандартних речовин для калібрування, як зазначено в монографії.

Визначення молекулярних мас. Ексклюзійна хроматографія може бути використана для визначення молекулярних мас речовин шляхом порівняння з відповідними стандартними речовинами для калібрування, зазначеними в монографії. Для стандартних речовин для калібрування будують графік залежності об'єму утримування від логарифма молекулярних мас. Графік, обмежуваний значеннями об'єму ексклюзії та загального проникного об'єму, звичайно апроксимують до прямої лінії для певної колонки в певних експериментальних умовах. З цього графіка можуть бути одержані значення молекулярних мас. Використання методу калібрування для молекулярно-масового розподілу дозволяє одержати вірогідні результати лише для окремих випадків систем «високомолекулярна речовина / розчинник» в описаних експериментальних умовах.

Визначення молекулярно-масового розподілу полімерів. Ексклюзійна хроматографія може бути використана для визначення молекулярно-масового розподілу полімерів. Однак порівнювати між собою результати можна лише за однакових експериментальних умов. Стандартні речовини, використовувані для калібрування, і методики аналізу описані у відповідних монографіях.

ДФУ 2.2.31. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ

Загальний принцип

Під дією електричного поля заряджені частинки, розчинені або дисперговані в розчині електроліту, мігрують у напрямку до електрода протилежної полярності. У гель-електрофорезі рух частинок сповільнюється внаслідок взаємодій з матрицею, що оточує гель, яка діє як молекулярне сито. Зустрічні взаємодії електричної сили і молекулярного сита приводять до диференціації швидкостей міграції частинок залежно від їх розмірів, форм і зарядів. У ході електрофорезу через розбіжності фізико-хімічних властивостей різні макромолекули суміші мігрують з різною швидкістю, у такий спосіб поділяючись на дискретні фракції. Електрофоретичний розподіл може бути проведений у системах без нерухомих фаз (наприклад, вільний розподіл розчину в капілярному електрофорезі) й у стабілізованих середовищах, таких, як тонкошарові пластинки, плівки або гелі.

Електрофорез з вільною чи рухливою межею

Цей метод звичайно використовується для визначення електрофоретичної рухливості, експериментальної характеристики речовин, безпосередньо вимірюваної і відтворюваної. Цей метод звичайно застосовується для речовин з високою молекулярною масою, шо мають слабку дифузію. Межі первісно визначаються фізичними методами, наприклад, рефрактометрією або кондуктометрією. Під дією певного електричного поля протягом точно виміряного часу визначають нові межі та їх відносне положення. Умови випробування підбирають так, щоб можна було визначати стільки меж, скільки речовин присутньо у випробовуваному зразку.

Зональний електрофорез з використанням фази носія

Цей метод звичайно застосовується лише для невеликих зразків випробовуваних речовин. Природа носія, наприклад папір, агар-гель, целюлози ацетат, крохмаль, агароза, поліакриламід, змішаний гель, спричиняє низку додаткових факторів, що модифікують рухливість:

а) через наявність каналів у фазі носія середня відстань, яку проходить речовина, стає меншою за реально пройдену відстань;

б) деякі фази носія електрично не нейтральні. Оскільки носій є нерухомою фазою, це іноді може призводити до значного збільшення електро-ендосмотичного струму;

в) будь-яке нагрівання внаслідок ефекту Джоуля може викликати деяке випаровування рідини з фази носія, що внаслідок капілярності приводить до руху розчину в напрямку від країв до центру. Іонна сила у такий спосіб прагне поступово зростати.

Отже, швидкість міграції залежить від таких головних факторів: рухливості зарядженої частинки, потоку електроендоосмосу і випаровування рідини з фази носія, а також сили (напруги поля). Тому необхідно проводити випробування у суворо визначених експериментальних умовах і, якщо можливо, використовувати стандартні речовини.

Прилад для електрофорезу складається:

- ✓ *з джерела постійного струму,* напруга якого може контролюватися і, бажано, стабілізуватися;
- ✓ *з електрофоретичної камери.* Це звичайно прямокутний відсік зі скла або твердої пластмаси, що складається з двох окремих резервуарів — анодного і катодного, які містять розчин електроліту. У кожний резервуар занурюється електрод, наприклад,

платиновий або графітовий. Вони приєднуються відповідною ізольованою схемою до відповідного виходу джерела живлення, щоб сформувати анод і катод. Рівень рідини у двох резервуарах підтримується рівним для запобігання переливанню через сифон.

Електрофоретична камера обладнана повітронепроникною кришкою, шо підтримує атмосферу насиченої вологості протягом випробування і зменшує випаровування розчинника. Коли знімають кришку, струм вимикають запобіжником. Якщо електрорушійна сила, вимірювана по смузі, перевищує 10 Вт, бажано охолодити носій.

✓ *з пристрою установлення носія:*

Електрофорез у смужках. Смужки з носієм, попередньо змоченим електродним розчином, занурюють у кожний кінець електродного резервуара, закріплюють і фіксують відповідним тримачем для запобігання дифузії електроліту. Такими тримачами можуть бути горизонтальна рамка, направлений V-подібний штатив або однорідна поверхня з точками контакту через певні інтервали.

Гель-електрофорез. Пристрій в основному складається зі скляної пластини, над усією поверхнею якої нанесений шар гелю, який міцно прилипає, однакової товщини. З'єднання гелю з електродним розчином здійснюється різними способами залежно від типу використовуваного приладу. Треба вжити застережних заходів для запобігання конденсації вологи або висушуванню твердого шару.

✓ *з вимірювального пристрію або засобу детектування.*

Методика. Розчин електроліту помішають в електродний резервуар. Відповідним чином імпрегнований носій з електролітним розчином поміщають у камеру за зазначених для використовуваного приладу умов. Визначають лінію старту і наносять зразок. Подають електричний струм протягом зазначеного часу. Після вимикання струму носій виймають з камери, висушують і проявляють.

ЕЛЕКТРОФОРЕЗ У ТРУБКАХ З ПОЛІАКРИЛАМІДНИМ ГЕЛЕМ

За електрофорезу в трубках з поліакриламідним гелем нерухомою фазою є гель, приготований із суміші акриламіду і N, N′-метиленбісакриламіду. Трубки з гелем готують з використанням трубок завдовжки 7,5 см і внутрішнім діаметром 0,5 см.

Прилад. Складається з двох резервуарів для буферного розчину, виготовлених з підхожого матеріалу, наприклад полі(метил метакрилату), і встановлених вертикально один над одним. Кожний резервуар обладнаний платиновим електродом. Електроди приєднані до джерела струму, що дозволяє проводити випробування або за постійного струму або за постійної напруги. В основі верхнього резервуара є ряд тримачів, рівновіддалених від електрода.

Методика. Звичайно розчини дегазують до початку полімеризації і гелі використовують відразу після приготування. Таким чином готують суміш компонентів, заливають у відповідні скляні трубки, які закупорені знизу, до однакового рівня і залишають для полімеризації. Гелеутворення звичайно відбувається протягом близько 30 хв і завершується, коли з'являється чіткий поділ поверхонь гелю і водного шару. Водний шар видаляють. Нижній резервуар наповнюють зазначеним буферним розчином. Трубки розкупорюють і встановлюють у тримачі верхнього резервуара так, щоб дно трубок було занурене в буферний розчин нижнього резервуара. Трубки обережно наповнюють зазначеним буферним розчином. Готують випробовувані зразки і зразки порівняння, що містять зазначений маркерний барвник, й ущільнюють їх за допомогою розчинення в них, наприклад, *сахарози Р.* Приготовані зразки нашаровують на поверхню гелю, використовуючи для кожного зразка окрему трубку. Верхній резервуар наповнюють тим самим буферним розчином, електроди приєднують до джерела струму і запускають процес електрофорезу за зазначених умов: температури, постійних напрузі або струму. Джерело струму вимикають, коли маркерний барвник майже переходить у нижній резервуар. Кожну трубку відразу виймають з приладу і витягають гель. Локалізують положення смуг на електрофореграмі, як зазначено.

ЕЛЕКТРОФОРЕЗ З НАТРІЮ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ У ПОЛІАКРИЛАМІДНОМУ ГЕЛІ (ДСН-ПАГ)

Галузь застосування. Електрофорез у поліакриламідному гелі застосовується для якісної ідентифікації білків у біологічних препаратах, контролю їхньої чистоти і кількісних визначень.

Мета. Аналітичний гель-електрофорез — метод, що дозволяє ідентифікувати й оцінювати гомогенність білків у фармацевтичних лікарських засобах. Метод звичайно використовується для визначення молекулярних мас білкових субодиниць і субодиничного складу очищених білків.

На ринку є різноманітний асортимент готових до використання гелів і реактивів, що можуть бути використані для аналізу.

Властивості поліакриламідних гелів. Ситові властивості поліакриламідних гелів обумовлені тривимірною мережею ланцюгів і пор гелю, що утворюються біфункціональним бісакриламідом, поперечно зшитим із сусідніми акриламідними ланцюгами. Процес полімеризації каталізується вільнорадикалгенерувальною системою, що складається з амонію персульфату і тетраметилетилендіаміну.

У разі збільшення концентрації акриламіду в гелі зменшується ефективний розмір пор. Ефективний розмір пор гелю визначається робочими ситовими властивостями, тобто тим опором, що докладається під час міграції макромолекул. Визначені допустимі межі вмісту акриламіду в гелі. За високих концентрацій акриламіду гелі частіше ламаються і є важкими в обробці. Оскільки розмір пор гелю зменшується, зменшується швидкість міграції білка через гель. Регулюючи розмір пор гелю, змінюючи концентрацію акриламіду, можна оптимізувати умови поділу випробовуваного білкового продукту. Тобто цей гель характеризується вмістом та масовим співвідношенням акриламіду і бісакриламіду.

Крім складу гелю, важливим компонентом електрофоретичної рухливості є структура білка. У разі визначення білків електрофоретична рухливість залежить від значення pK заряджених груп і розміру молекули. На це впливають тип, концентрація і pH буфера, температура і сила електричного поля, а також природа матеріалу носія.

Денатурувальний електрофорез у поліакриламідному гелі

Цей метод являє приклад аналізу мономерних поліпептидів з молекулярною масою в ділянці від 14 000 до 100 000 дальтон. Можливе розширення меж молекулярних мас (наприклад, шляхом використання градієнтних гелів, особливо буферною системою), але методики аналізу таких поліпептидів не обговорюються.

Денатурувальний електрофорез у поліакриламідному гелі з використанням натрію додецилсульфату (ДСН-ПАГ; SDS-PAGE) є найбільш загальним методом електрофорезу, який використовується для оцінки якості білкових лікарських засобів і описаний нижче як приклад зазначеного методу. Звичайно аналітичний електрофорез білків проводять у поліакриламідних гелях в умовах, що забезпечують дисоціацію білків на окремі поліпептидні субодиниці і мінімізують їхню агрегацію. Найчастіше до нанесення на гель білки піддають дисоціації, нагріваючи їх із сильним аніонним детергентом — ДСН. Денатуровані поліпептиди зв'язуються з ДСН, перетворюючись на негативно заряджені частинки з постійним відношенням маси до заряду незалежно від типу білка. Оскільки кількість зв'язаного ДСН майже завжди пропорційна молекулярній масі поліпептиду і не залежить від його послідовності, ДСН-поліпептидні комплекси мігрують у поліакриламідному гелі зі швидкістю, що залежить від розміру поліпептиду.

Електрофоретична рухливість одержаних детергент-поліпептидних комплексів перебуває в такому самому функціональному взаємозв'язку з їх молекуляними масами. Міграція ДСН-комплексів відбувається в напрямку до анода прогнозовано: комплекси

з низькими молекулярними масами рухаються швидше за високомолекулярні. Тобто молекулярна маса білка може бути визначена калібруванням ДСН-ПАГ, а наявність одиничної смуги в гелі є критерієм чистоти білка.

Однак модифікації поліпептидного ланцюга, наприклад, *N*- або *O*-зв'язаним глікозилуванням, призводять до значної зміни середньої молекулярної маси білка, тому що ДСН не зв'язується з карбогідратним компонентом так, як з поліпептидним. У цьому разі постійне відношення заряду до молекулярної маси не зберігається. Уявна молекулярна маса білків, підданих посттрансляційній модифікації, не є справжнім відображенням маси поліпептидного ланцюга.

Відновні умови. Склад і тривимірна структура білків часто підтримується присутністю дисульфідних зв'язків. Метою ДСН-ПАГ-випробування у відновних умовах є руйнування структури білка відновленням дисульфідних зв'язків. Повна денатурація і дисоціація білків обробкою 2-меркаптоетанолом або дитіотреїтолом (ДТТ) сприяє розгортанню поліпептидного ланцюга і подальшому комплексоутворенню з ДСН. За цих умов молекулярну масу поліпептидних субодиниць можна розрахувати лінійною регресією у присутності відповідного стандарту молекулярних мас.

Невідновні умови. Для деяких випробувань повна дисоціація білка на субодиничні пептиди небажана. За відсутності відновних агентів, таких, як 2-меркаптоетанол або ДТТ, дисульфідні ковалентні зв'язки залишаються недоторканними, зберігаючи олігомерну форму білка. Олігомерні ДСН-білок комплекси мігрують повільніше, ніж їх ДСН-поліпептидні субодиниці. Крім того, невідновні білки не можуть бути цілком насичені ДСН, а отже, не можуть зв'язувати детергент з постійним співвідношенням мас. Це робить молекулярно-масове визначення цих молекул за допомогою ДСН-ПАГ непрямим порівняно з аналізом повністю денатурованих поліпептидів, тому що необхідна наявність стандартів, що мають ідентичну з випробовуваним невідомим білком конфігурацію для адекватного порівняння. Проте прояв однієї смуги в такому гелі є критерієм чистоти білка.

Властивості електрофорезу в гелі з переривчастою буферною системою

Найбільш поширений електорофоретичний метод дослідження складних білкових сумішей полягає у використанні переривчастої буферної системи, шо складається з двох окремих дотичних гелів: розрізнювального або роздільного (нижнього) і концентрувального (верхнього) гелів. Два гелі відрізняються пористістю, pH та іонною силою. Крім того, використовують різні за рухливістю іони в гелій-електродних буферах. Буферна переривчастість призводить до концентрації зразків з великим

об'ємом у концентрувальному гелі і до поліпшення ступеня їх розділення. Під час проходження струму через випробовуваний розчин падає напруга, що вносить білки в концентрувальний гель. Іони гліцинату з електродного буфера рухаються за білками у концентрувальний гель. Швидко утворюється ділянка рухомої межі з високорухомими іонами хлориду попереду і відносно повільними іонами гліцинату позаду. Утворюється локалізований високовольтний градієнт між фронтами головних і хвостових іонів, примушуючи ДСН-білок комплекси формувати тонкі зони (смуги) і мігрувати між фазами хлориду і гліцинату. У широких межах, незалежно від висоти нанесеного зразка, усі ДСН-білки конденсуються в дуже вузьку ділянку і входять у розділювальний гель у вигляді чітко визначуваної, тонкої зони з високою густиною білка. Великопористий концентрувальний гель не затримує міграцію більшості білків і в основному служить антиконвекторним середовищем. На поверхні як концентрувального, так і роздільного гелів білки зустрічаються з різким зростанням ефекту гальмування внаслідок обмеженого розміру пор роздільного гелю. Одночасно рух білків у роздільному гелі продовжує сповільнюватися внаслідок ситових властивостей матриксу. Іони гліцинату доганяють білки, шо потім пересуваються у просторі з постійним pH, утвореним трис(гідроксиметил)амінометаном і гліцином. Молекулярно-ситові властивості фази призводять до поділу ДСН-поліпептидних комплексів за їх молекулярними масами.

Приготування вертикальних переривчасто-буферних ДСН-поліакриламідних гелів

Складання касети, що формує гель. Дві скляні пластинки (наприклад, розміром 10×8 см), політетрафторетиленовий гребінець, дві прокладки і гумові силіконові трубки (наприклад, діаметром 0,6 мм та завдовжки 35 см) миють із м'яким детергентом і споліскують водою. Усе сушать паперовим рушником або тканиною. Прокладки і трубки змащують несиліконовим мастилом. Прокладки укладають вздовж двох коротких сторін скляних пластин на відстані 2 мм від їх країв і 2 мм від довгої сторони, що відповідає дну гелю. Використовуючи одну прокладку як основу, починають укладати трубку. Обережно просовують трубку донизу прокладки і протягують вздовж довгої сторони скляної пластинки. Притримуючи трубку уздовж довгої сторони пластинки одним пальцем, укладають трубку по короткій стороні скляної пластинки, використовуючи прокладку як спрямовувальну. Накривають іншою скляною пластинкою, щільно притискуючи касету руками. Встановлюють два затискачі на кожні дві короткі сторони касети. Обережно встановлюють чотири затискачі на довгу сторону касети гелю, формуючи дно касети. Слід упевнитися, що трубка проходить вздовж краю скляної пластинки і ніде не видавлена у разі розміщення затискачів. Касета готова до заливання гелю.

Приготування гелю. У разі переривчастого буферного ДСН-поліакриламідного гелю рекомендовано залити роздільний гель, дочекатися його полімеризації і потім залити концентрувальний гель, оскільки гелі відрізняються вмістом акриламіду-бісакриламіду, буфером і pH.

Приготування роздільного гелю. У конічній колбі готують підхожий об'єм розчину з необхідною концентрацією акриламіду для формування гелю, використовуючи значення, наведені у табл. 8.1. Компоненти змішують у зазначеній послідовності. Якщо необхідно, перед додаванням розчину амонію персульфату і тетраметилетилендіаміну (ТЕМЕД) розчин фільтрують під вакуумом крізь ацетатцелюлозну мембрану (діаметр пор — 0,45 мкм); розчин витримують під вакуумом, збовтуючи фільтраційний пристрій до припинення утворення в розчині бульбашок. Додають відповідні кількості амонію персульфату розчину і ТЕМЕД, як зазначено в табл. 9.1, збовтують і відразу заливають у щілину між двома скляними пластинками касети. Залишають достатньо місця для концентрувального гелю (до довжини зубця гребеня додають 1 см). Використовуючи загострену скляну піпетку, обережно нашаровують насичений водою розчин ізобутанолу. Гель витримують у вертикальному положенні за кімнатної температури до полімеризації.

Таблиця 9.1

Приготування роздільного гелю

Компоненти розчину	Об'єми компонента (мл) на 1 касету гелю місткістю							
	5 мл	10 мл	15 мл	20 мл	25 мл	30 мл	40 мл	50 мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9
6 % акриламід								
Вода Р	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
Акриламіду розчин(1)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
1,5 М трис (pH 8,8)(2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Розчин 100 г/л ДСН(3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Розчин 100 г/л АПС(4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЕД(5)	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8 % акриламід								
Вода Р	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Акриламіду розчин(1)	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
1,5 М трис (pH 8,8)(2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Розчин 100 г/л ДСН(3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Розчин 100 г/л АПС(4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЕД(5)	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10 % акриламід								
Вода Р	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Акриламіду розчин[(1)]	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
1,5 М трис (pH 8,8)[(2)]	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Розчин 100 г/л ДСН[(3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Розчин 100 г/л АПС[(4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЕД[(5)]	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12 % акриламід								
Вода Р	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Акриламіду розчин[(1)]	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
1,5 М трис (pH 8,8)[(2)]	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Розчин 100 г/л ДСН[(3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Розчин 100 г/л АПС[(4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЕД[(5)]	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
14 % акриламід								
Вода Р	1,4	2,7	3,9	5,3	6,6	8,0	10,6	13,8
Акриламіду розчин[(1)]	2,3	4,6	7,0	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
1,5 М трис (pH 8,8)[(2)]	1,2	2,5	3,6	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Розчин 100 г/л ДСН[(3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Розчин 100 г/л АПС[(4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЕД[(5)]	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15 % акриламід								
Вода Р	1,1	2,3	3,4	4,5	5,7	6,9	9,2	11,5
Акриламіду розчин[(1)]	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
1,5 М трис (pH 8,8)[(2)]	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Розчин 100 г/л ДСН[(3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Розчин 100 г/л АПС[(4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЕД[(5)]	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Примітка. [(1)] — Акриламіду розчин: акриламіду/бісакриламіду (29:1) 30 % розчин *Р*; [(2)] — 1,5 М трис (pH 8,8): 1,5 М трис-гідрохлориду буферний розчин pH 8,8 *Р*; [(3)] — Розчин 100 г/л ДСН: розчин 100 г/л натрію додецилсульфату *Р*; [(4)] — Розчин 100 г/л АПС: розчин 100 г/л амонію персульфату *Р*. Амонію персульфат доставляє вільні радикали, що прискорюють полімеризацію акриламіду і бісакриламіду. Оскільки розчин амонію персульфату повільно розпадається, слід готувати свіжі розчини щотижня; [(5)] — ТЕМЕД: тетраметилетилендіамін *Р*.

Примітка. Кислотно-спиртові розчини, що використовуються в зазначених методиках, не повністю фіксують білки в гелі. Це може призвести до втрати деяких низькомолекулярних білків у процесі забарвлювання і знебарвлювання тонких гелів. Стійка фіксація забезпечується витримуванням гелю в суміші трихлорооцтова кислота *Р* — метанол *Р* — вода *Р* (1:4:5) протягом 1 год перед зануренням гелю в кумасі забарвлювальний розчин *Р*.

Приготування концентрувального гелю. Після завершення полімеризації (близько 30 хв) зливають ізобутанол і промивають верхню поверхню гелю кілька разів водою для видалення нанесеного ізобутанолу та будь-яких неполімеризованих залишків акриламіду. Видаляють якомога більше рідини з поверхні гелю і потім залишки води промокають кінчиком паперової серветки. У конічній колбі готують відповідний об'єм концентрувального гелю з необхідною концентрацією акриламіду, використовуючи значення, наведені у табл. 9.1. Компоненти змішують у зазначеній послідовності. Якщо необхідно, перед додаванням амонію персульфату розчину і ТЕМЕД розчин фільтрують під вакуумом крізь ацетатцелюлозну мембрану (діаметр пор — 0,45 мкм); розчин витримують під вакуумом, збовтуючи фільтраційний пристрій до припинення утворення в розчині бульбашок. Додають відповідну кількість амонію персульфату розчину і ТЕМЕД, як зазначено в табл. 8.1, збовтують (струшують обертальними рухами) і відразу заливають у щілину між двома скляними пластинами касети прямо на поверхню полімеризованого роздільного гелю. У розчин концентрувального гелю відразу вкладають чистий полі-тетрафторетиленовий гребінець, уникаючи появи повітряних бульбашок. Додають ще розчин концентрувального гелю до повного заповнення простору гребінця. Гель витримують у вертикальному положенні за кімнатної температури до полімеризації.

Складання електрофоретичного приладу та проведення електрофоретичного розподілу. Після завершення полімеризації (близько 30 хв) обережно видаляють політетрафторетиленовий гребінець. Відразу сполоскують стінки водою або ДСН-ПАГ *буферним робочим розчином Р* для видалення залишків неполімеризованого акриламіду. Якщо необхідно, поправляють зубець концентрувального гелю тупою гіподермічною голкою, надітою на шприц. Видаляють затискачі з однієї короткої сторони, обережно висмикуючи трубку. Аналогічно видаляють затискачі з другої короткої сторони. Потім видаляють трубку з дна гелю. Поміщають гель в електрофоретичний прилад. Верхній і нижній резервуари наповнюють буфером для електрофорезу. Видаляють усі

бульбашки, що утворюються на поверхні гелю між двома скляними пластинами. Це найкраще робиться за допомогою тупої голки, надітої на шприц. Не слід проводити попередній електрофорез до нанесення зразків, тому що це призведе до порушення перевірчастості буферної системи. Перед нанесенням зразків обережно сполоскують щілину *ДСН-ПЛГ-буферним робочим розчином Р.* Готують випробовувані розчини і розчини порівняння в рекомендованому буфері для зразків і обробляють, як зазначено в монографії. Наносять відповідну кількість кожного розчину в «кишеньки» концентрувального гелю. Починають електрофорез в умовах, зазначених в інструкції до приладу. Виробники ДСН-ПАГ-приладів можуть постачати гелі різних розмірів і товщини. Для одержання оптимального розділення треба підбирати час проведення електрофорезу, а також силу струму/напруги згідно з описом виробника приладів. Слід упевнитися, що забарвлений фронт входить у роздільний гель. Коли барвник доходить нижнього кінця гелю, електрофорез зупиняють. Касету гелю витягають з приладу і відокремлюють скляні пластинки. Витягають прокладки, відрізають, викидають концентрувальний гель і забарвлюють одержаний гель.

Визначення білків у гелях

Найбільш широко застосовується метод забарвлювання білків барвником кумасі, що дозволяє визначати від 1 до 10 мкг білка в одній смузі. Забарвлювання сріблом — найбільш чутливий метод для забарвлювання білків у гелях, водночас визначаються смуги, шо містять від 10 до 100 нг білка.

Усі стадії забарвлювання гелю проводять за кімнатної температурі, обережно струшуючи (наприклад, на платформі шейкера) у відповідному посуді. Для забарвлювання гелів слід надягати рукавички, тому що на гелі залишаються відбитки пальців.

Забарвлювання кумасі. Гель занурюють у великий надлишок *кумасі забарвлювального розчину Р*, витримують протягом не менше 1 год. Потім зливають розчин для забарвлювання.

Гель знебарвлюють великим надлишком *знебарвлювального розчину Р.* Знебарвлювальний розчин міняють кілька разів до чіткого прояву білкових смуг на прозорому тлі. Чим ретельніше знебарвлюють гель, тим меншу кількість білків можна знайти цим методом. Знебарвлювання можна прискорити використанням кількох грамів аніонообмінної смоли або маленької губки, змоченої *знебарвлювальним розчином Р.*

Забарвлювання сріблом. Гель занурюють у великий надлишок *фіксувального розчину Р* і витримують протягом 1 год. Фіксувальний розчин зливають, гель заливають свіжим фіксуючим розчином і витримують протягом не менше 1 год і, якщо можливо,

залишають на ніч. Фіксуючий розчин зливають і гель промивають великим надлишком *води Р* протягом 1 год. Потім гель витримують у розчині 1 % (об/об) *глутарового альдегіду Р* протягом 15 хв, двічі промивають великим надлишком *води Р* щоразу протягом 15 хв, занурюють у свіжоприготований реактив *срібла нітрату Р* і витримують протягом 15 хв у темному місці. Потім тричі промивають великим надлишком *води Р* щоразу протягом 5 хв. Гель витримують у *проявника розчині Р* близько 1 хв до достатнього забарвлення. Проявлення припиняють, інкубуючи гель у *блокувальному розчині Р* протягом 15 хв. Споліскують гель *водою Р*.

Висушування забарвлених ДСН-ноліакриламідних гелів

Залежно від використаного методу забарвлювання гелі висушують по-різному. Забарвлені кумасі гелі після стадії знебарвлювання витримують у розчині 100 г/л *гліцерину Р* протягом не менше 2 год (можливе інкубування на ніч). У разі забарвлювання сріблом на кінцевій стадії споліскування витримують гель у розчині 20 г/л *гліцерину Р* протягом 5 хв.

Два листки пористої целюлозної плівки занурюють у *воду Р* і витримують протягом від 5 до 10 хв. Один з листків поміщають на рамку висушування, обережно кладуть на нього гель, видаляють повітряні бульбашки і нашаровують кілька мілілітрів *води Р* навколо країв гелю, накривають другим листком, видаляють бульбашки повітря і завершують складання рамки висушування. Рамку поміщають у сушарку та залишають за кімнатної температури до висушування гелю.

Визначення молекулярної маси

Молекулярну масу білків визначають, порівнюючи їх рухливість з кількома маркерними білками з відомими молекулярними масами. Є попередньо змішані суміші білків з відомими молекулярними масами для рівномірного забарвлення та калібрування гелів. Вони доступні в різному інтервалі молекулярних мас. Концентровані вихідні розчини білків з відомою молекулярною масою розводять відповідним буферним розчином для зразків і наносять на той самий гель, що і випробовуваний білок (табл. 9.2).

Відразу після проведення електрофорезу відзначають електрофоретичний фронт барвника бромфенолового синього. Це можна зробити нанесенням насічки на краї гелю або введенням голки, змоченої індигокарміном на фронті барвника. Після забарвлювання вимірюють відстані міграції кожної білкової смуги (маркерів і невідомих) від краю роздільного гелю. Відстань міграції кожного білка поділяють на відстань, що пройшов супровідний барвник. Одержані відстані міграції називаються відносними

рухливостями білків (відносно до фронту барвника) і умовно позначаються R_f. Будують криву залежності логарифма відносних молекулярних мас (*М.м.*) білкових стандартів від умовно позначених значень R_f. Звичайно крива злегка сигмоїдна. Невідомі молекулярні маси визначають методом лінійної регресії інтерполяцією кривої залежності log *М.м.* від R_f, якщо значення, одержані для невідомих зразків, розташовані на лінійній частині кривої.

Таблиця 9.2

Приготування концентрувального гелю

Компоненти розчину	Об'єми компонента (мл) на 1 касету гелю місткістю							
	1 мл	2 мл	3 мл	4 мл	5 мл	6 мл	8 мл	10 мл
Вода Р	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Акриламіду розчин(1)	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
1,0 М трис (pH 6,8)(2)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
Розчин 100 г/л ДСН(3)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
Розчин 100 г/л АПС(4)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
ТЕМЕД(5)	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,041

Примітка. (1) — Акриламіду розчин: 30 % розчин акриламіду/бісакриламіду (29:1) *Р*; (2) — 1,0 М трис (pH 6,8): 1,5 М буферний розчин трис-гідрохлориду pH 8,8 *Р*; (3) — Розчин 100 г/л ДСН: розчин 100 г/л натрію додецилсульфату *Р*; (4) — Розчин 100 г/л АПС: розчин 100 г/л амонію персульфату *Р*. Амонію персульфат доставляє вільні радикали, що прискорюють полімеризацію акриламіду і бісакриламіду. Оскільки розчин амонію персульфату повільно розпадається, слід готувати свіжі розчини щотижня; (5) — ТЕМЕД: тетраметилетилендіамін *Р*.

Валідація випробування

Результати випробування вважаються вірогідними, якщо маркери молекулярних мас розподілені уздовж 80 % довжини гелю і по всій ділянці необхідного розподілу (тобто ділянки, що покриває зразок та його димери або зразок і супровідні домішки), розділення відповідних білкових смуг проявляє лінійну залежність від логарифма молекулярної маси і R_f. Додаткові вимоги до валідації до випробовуваних розчинів зазначаються в монографії.

Кількісне визначення домішок

Якщо в монографії зазначають граничний вміст домішки, слід використовувати розчин порівняння відповідним розведенням випробовуваного розчину. Наприклад, якщо граничний вміст домішки становить 5 %, розчин порівняння готують розведенням

по відношенню до випробовуваного розчину у співвідношенні 1:20. На електрофореграмі випробовуваного розчину жодна домішка (жодна смуга, крім основної) не має бути інтенсивнішою за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння.

Для валідованої методики вміст домішок може визначатися методом внутрішньої нормалізації по відношенню до основної смуги з використанням інтегрувального денситометра. Для валідації методики необхідно підтвердити лінійність відгуків.

ДФУ 2.4.24. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗАЛИШКОВИХ РОЗЧИННИКІВ І КОНТРОЛЬ ЇХ КІЛЬКОСТЕЙ

Методики випробувань, наведені у цій загальній статті, можуть бути використані:

1) для ідентифікації більшої частини залишкових розчинників класів 1 і 2 у субстанціях, допоміжних речовинах і готових лікарських засобах, якщо залишкові розчинники невідомі;

2) для випробування на граничний вміст розчинників класів 1 і 2, якщо вони присутні в субстанціях, допоміжних речовинах і готових лікарських засобах;

3) для кількісного визначення розчинників класу 2, якщо межі їх вмісту вище *1000 ppm* (0,1 %), або, якщо необхідно, для кількісного визначення розчинників класу 3.

Залишкові розчинники класів 1, 2 і 3 перелічені у статті 5.4 «Залишкові кількості органічних розчинників» ДФУ.

Для приготування випробовуваних розчинів нижче наведені три розчинники, а також умови уведення газових проб у парофазній газовій хроматографії. Хоча описані дві хроматографічні системи, краще використовувати систему А. Систему В застосовують звичайно лише для ідентифікації. Вибір методики приготування випробовуваних розчинів залежить від розчинності випробовуваної речовини й іноді від класу контрольованого залишкового розчинника.

Під час виявлення органічних розчинників у наведених нижче умовах парофазного аналізу можуть виникати труднощі для таких залишкових розчинників: формамід, 2-етоксіетанол, 2-метоксіетанол, етиленгліколь, TV-метилпіролідон і сульфолан. Для їх контролю слід застосовувати інші підхожі методики.

Якщо наведену нижче методику випробувань застосовують для кількісного визначення залишкових розчинників у конкретній речовині, вона має бути валідована.

Методика. Випробування проводять методом парофазної газової хроматографії (2.2.28).

Пробопідготовка 1. Застосовують для визначення залишкових розчинників у речовинах, розчинних у воді. Вихідний розчин випробовуваного зразка (1).

0.200 г випробовуваного зразка розчиняють у *воді Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20.0 мл.

Пробопідготовка 2. Застосовують для визначення залишкових розчинників у речовинах, не розчинних у воді.

Вихідний розчин випробовуваного зразка (2). 0.200 г випробовуваного зразка розчиняють у *диметилформаміді Р* (ДМФ) і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20.0 мл.

Пробопідготовка 3. Застосовують для контролю диметилацетаміду і/або диметилформаміду, якщо відомо або припускається, що один або обидва ці розчинники присутні у випробовуваному зразку.

Вихідний розчин випробовуваного зразка (3). 0.200 г випробовуваного зразка розчиняють у *1,3-диметил-2-імідазолідиноні Р* (ДМІ) і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20.0 мл.

Якщо не підходить жодна з вищенаведених методик пробопідготовки, слід довести придатність пропонованих умов парофазного аналізу.

Розчин залишкового розчинника (*a*). 1.0 мл ФСЗ розчину залишкового розчинника класу 1 доводять водою Р до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до 10.0 мл.

Розчин залишкових розчинників (*b*). Підхожі кількості залишкових розчинників класу 2 розчиняють у *диметилсульфоксиді Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 100.0 мл. Об'єм одержаного розчину доводять *водою Р* до концентрації, що дорівнює 1/20 значень меж концентрації, зазначених у табл. 9.3 або 9.4 статті 5.4 «Залишкові кількості органічних розчинників».

Таблиця 1 статті 5.4 «Залишкові кількості органічних розчинників».

Таблиця 9.3

Розчинники класу I, використання яких у виробництві лікарських засобів слід уникати[(1)]

Розчинник	Межа концентрації (ppm)	Характеристика
Бензол	2	Канцерогенний
Чотирихлористий вуглець	4	Токсичний і небезпечний для навколишнього середовища
1,2-Дихлоретан	5	Токсичний
1,1-Дихлоретан	8	Токсичний
1,1,1-Трихлоретан	1500	Небезпечний для навколишнього середовища

Таблиця 2 статті 5.4 «Залишкові кількості органічних розчинників».

Таблиця 9.4

Регламентація розчинників класу 2 у лікарських засобах

Розчинник	ДДД (мг/добу)	Межа концентрації (ppm)
Ацетонітрил	4,1	410
Гексан	2,9	290
N,*N*-диметилацетамід	10,9	1090
N,*N*-диметилформамід	8,8	880
1,2-Диметоксіетан	1,0	100
1,4-Діоксан	3,8	380
Дихлорметан	6,0	600
1,2-Дихлоретен	18,7	1870
Етиленгліколь	6,2	620
2-Етоксіетанол	1,6	160
Ксилол*	21,7	2170
Метанол	30,0	3000
Метилбутилкетон	0,5	50
N-метилпіролідон	5,3	530
Метилциклогексан	11,8	1180
2-Метоксіетанол	0,5	50
Нітрометан	0,5	50
Піридин	2,0	200
Сульфолан	1,6	160
Тетралін	1,0	100
Толуол	8,9	890
1,1,2-Трихлоретен	0,8	80
Форамід	2,2	220
Хлорбензол	3,6	360
Хлороформ	0,6	60
Циклогексан	38,8	3880

Примітка. * — звичайно містить 60 % *м*-ксилолу, 14 % *п*-ксилолу, 9 % *о*-ксилолу та 17 % етилбензолу.

Розчин залишкових розчинників (*c*). 1.00 г розчинника або розчинників, присутніх у випробовуваному зразку, розчиняють у диметилсульфоксиді Р або *воді Р* і доводять об'єм розчину водою Р до 100.0 мл. Об'єм одержаного розчину доводять *водою Р* до концентрації, що дорівнює 1/20 значень меж концентрації, зазначених у табл. 9.3 або 9.4 проєкту статті 5.4 «Залишкові кількості органічних розчинників».

Контрольний розчин. Готують аналогічно до розчину залишкових розчинників (*c*), але без додавання залишкових розчинників (застосовують для перевірки відсутності піків, що заважають).

Випробовуваний розчин. 5.0 мл вихідного розчину випробовуваного зразка, що відповідає методиці пробопідготовки, і 1.0 мл контрольного розчину поміщають у флакон.

Розчин порівняння (*a*) (клас 1). 1.0 мл розчину залишкового розчинника (*a*) і 5.0 мл підхожого розчинника поміщають у флакон.

Розчин порівняння (клас 1). 5.0 мл вихідного розчину випробовуваного зразка, що відповідає методиці пробопідготовки, і 1.0 мл розчину залишкового розчинника (*a*).

Розчин порівняння (клас 2). 1.0 мл розчину залишкового розчинника (*a*) і 5.0 мл підхожого розчинника поміщають у флакон.

Розчин порівняння (*c*). 5.0 мл вихідного розчину випробовуваного зразка, що відповідає методиці пробопідготовки, і 1.0 мл розчину залишкового розчинника (*c*) поміщають у флакон.

Розчин порівняння (*d*). 1.0 мл контрольного розчину і 5.0 мл підхожого розчинника поміщають у флакон.

Флакони щільно закривають гумовими мембранними пробками, покритими політетрафторетиленом, і обтискують алюмінієвими ковпачками. Струшують до одержання гомогенного розчину.

Для проведення хроматографічного аналізу можуть бути використані такі системи.

Система А:

— колонка кварцова капілярна розміром 30 м × 0.32 мм або 30 м × 0.53 мм, покрита шаром поперечнозшитого полімеру з 6 % поліціанопропілсилоксану і 94 % полідиметилсилоксану завтовшки 1.8 або 3 мкм;

— газ-носій: *азот для хроматографії Р* або *гелій для хроматографії Р;*

— поділ потоку 1:5;

— лінійна швидкість газу-носія близько 35 см/с;

— полуменево-іонізаційний детектор (для хлоровмісних залишкових розчинників класу 1 можуть бути також використані масспектрометричний детектор або детектор електронного захоплювання);

— температуру колонки програмують: 40 °С — протягом 20 хв, потім підвищення температури зі швидкістю 10 °С/хв до 240 °С, за температури 240 °С витримують протягом 20 хв;

— температура блока вводу проб 140 °С;

— температура детектора 250 °С.

Якщо можливий вплив матриці, використовують систему В.

Система В:

— колонка капілярна кварцова розміром 30 м × 0.32 мм або 30 м × 0.53 мм, покрита шаром макроголу 20 000 Р завтовшки 0.25 мкм;

— газ-носій: *азот для хроматографії Р або гелій для хроматографії Р;*

— поділ потоку 1:5;

— лінійна швидкість газу-носія близько 35 см/с;

— полуменево-іонізаційний детектор (для хлоровмісних залишкових розчинників класу 1 можуть бути також використані масспектрометричний детектор або детектор електронного захоплювання);

— температуру колонки програмують: 50 °С протягом 20 хв, потім підвищення температури зі швидкістю 6 °С/хв до 165 °С, за температури 165 °С витримують протягом 20 хв;

— температура блока вводу проби 140 °С;

— температура детектора 250 °С.

1 мл рівноважної газової фази над розчином порівняння (*a*) уводять у колонку в умовах, наведених для системи А, і записують хроматограму таким чином, щоб можна було виміряти співвідношення сигнал/шум для піка 1,1,1-трихлорметану. Співвідношення сигнал/шум має бути не менше 5.

1 мл рівноважної газової фази над розчином порівняння (*a*) уводять у колонку в умовах, наведених для системи А. Піки, відповідні залишковим розчинникам класу 1, мають ще виявлятися.

1 мл рівноважної газової фази над розчином порівняння (*b*) уводять у колонку в умовах, наведених для системи А, і записують хроматограму таким чином, щоб можна було визначити коефіцієнт розділення піків ацетонітрилу та хлористого метилену. Хроматографічна система вважається придатною, якщо одержана хроматограма має вигляд хроматограми, поданої на рис. 9.1, а коефіцієнт розділення піків ацетонітрилу та хлористого метилену має бути не менше 1.0.

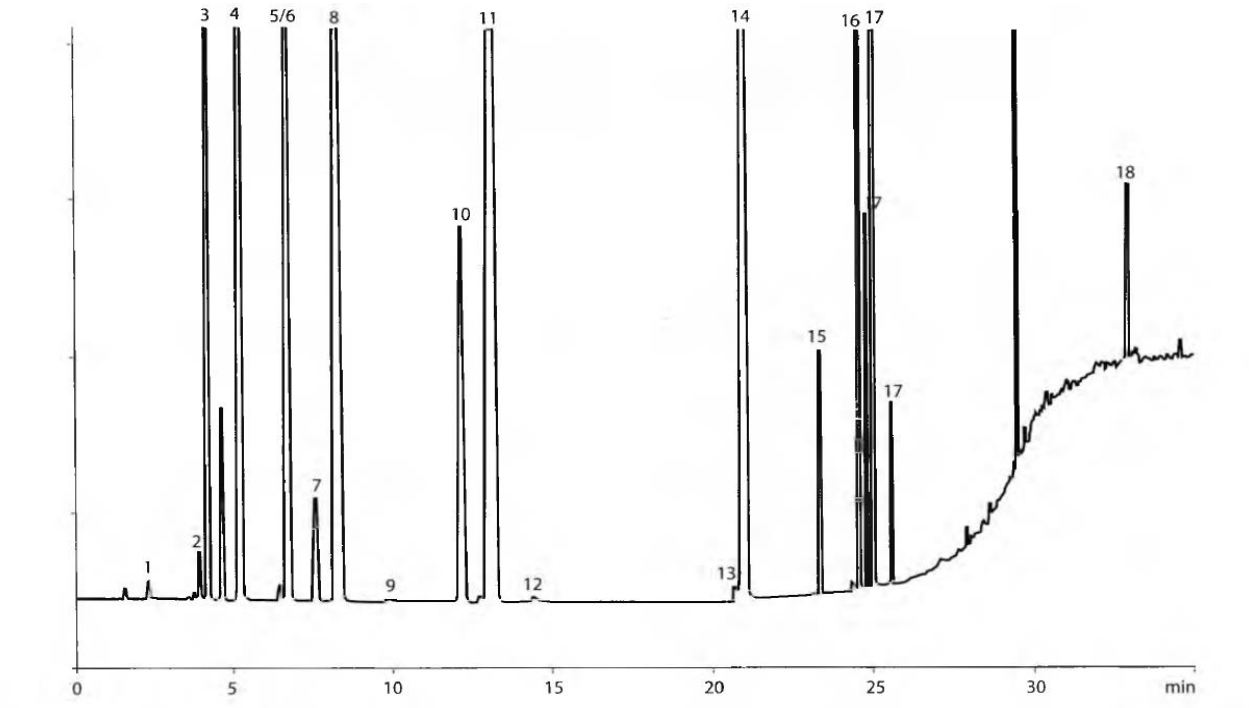


Рис. 9.1. Хроматограма залишкових розчинників класу 2 в умовах, описаних для системи А і пробопідготовки 1. Полуменево-іонізаційний детектор: 1 — метанол; 2 — ацетонітрил; 3 — дихлорметан; 4 — гексан; 5 — *цис*-1,2-дихлоретилен; 6 — нітрометан; 7 — хлороформ; 8 — циклогексан; 9 — 1,2-диметоксіетан; 10 — 1,1,2-трихлоретилен; 11 — метилциклогексан; 12 — 1,4-діоксан; 13 — піридин; 14 — толуол; 15 — 2-гексанон; 16-хлорбензол; 17 — *орто-, мета- і пара*ксилоли; 18 — тетралін

1 мл рівноважної газової фази над випробовуваним розчином уводять у колонку в умовах, наведених для системи А. Якщо на одержаній хроматограмі немає піків, відповідних одному з піків залишкових розчинників на хроматограмах газової фази над розчином порівняння (*a*) або розчином порівняння (*b*), випробовуваний зразок витримує випробування. Якщо будь-який пік на хроматограмі газової фази над випробовуваним розчином відповідає одному з піків залишкових розчинників на хроматограмі газової фази над розчином порівняння (а) або розчином порівняння (*b*), слід використовувати систему В.

1 мл рівноважної газової фази над розчином порівняння (*a*) уводять у колонку в умовах, описаних для системи В, і записують хроматограму таким чином, щоб можна було виміряти співвідношення сигнал/шум для піка бензолу. Співвідношення сигнал/шум має бути не менше 5.

1 мл рівноважної газової фази над розчином порівняння (*a*) уводять у колонку в умовах, наведених для системи В. Мають виявлятися піки, відповідні залишковим розчинникам класу 1.

1 мл рівноважної газової фази над розчином порівняння (*b*) уводять у колонку в умовах, описаних для системи B, і записують хроматограму таким чином, щоб можна було визначити коефіцієнт розділення піків трихлоретилену й ацетонітрилу. Хроматографічна система вважається придатною, якщо одержана хроматограма має вигляд хроматограми, поданої на рис. 9.2, а коефіцієнт розділення піків ацетонітрилу та трихлоретилену має бути не менше 1.0.

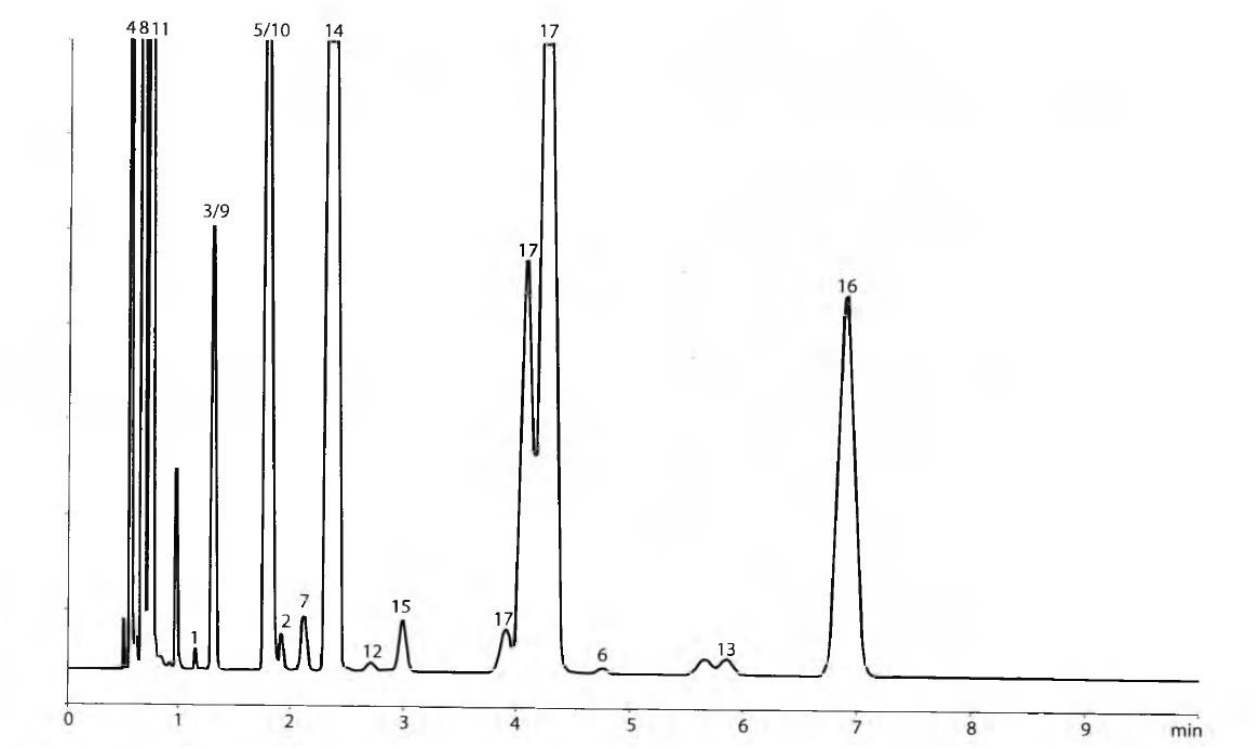


Рис. 9.2. Хроматограма залишкових розчинників класу 2 в умовах, описаних для системи B і пробопідготовки 1. Полуменево-іонізаційний детектор: 1 — метанол; 2 — ацетонітрил; 3 — дихлорметан; 4 — гексан; 5 — *цис*-1,2-дихлоретилен; 6 — нітрометан; 7 — хлороформ; 8 — циклогексан; 9 — 1,2-диметоксіетан; 10 — 1,1,2-трихлоретилен; 11 — метилциклогексан; 12 — 1,4-діоксан; 13 — піридин; 14 — толуол; 15 — 2-гексанон; 16-хлорбензол; 17 — *орто-*, *мета-* і *пара*ксилоли; 18 — тетралін (t_R = 28 хв)

1 мл рівноважної газової фази над випробовуваним розчином уводять у колонку, наведену для системи B.

Якщо на одержаній хроматограмі немає піків, відповідних одному з піків залишкових розчинників на хроматограмах газової фази над розчином порівняння (*a*) або розчином порівняння (*b*), випробовуваний зразок витримує випробування. Якщо будь-який пік на хроматограмі газової фази над випробовуваним розчином відповідає

одному з піків залишкових розчинників на хроматограмі газової фази над розчином порівняння (*a*) або розчином порівняння (*b*) і це підтверджується під час хроматографування у системі А, роблять так:

1 мл рівноважної газової фази над розчином порівняння (*c*) уводять у колонку в умовах, описаних для системи А або системи В. Якщо необхідно, чутливість системи регулюють таким чином, щоб висота піка залишкового розчинника або розчинників, що ідентифікуються, становила не менше 50 % шкали реєструвального пристрою.

1 мл рівноважної газової фази над розчином порівняння (*d*) уводять у колонку. Не має спостерігатися жодних піків, що заважають.

1 мл рівноважної газової фази над випробовуваним розчином і 1 мл газової фази над розчином порівняння (*c*) уводять у колонку не менше трьох разів.

Середня площа піка залишкового розчинника/розчинників на хроматограмі рівноважної газової фази над випробовуваним розчином не має становити більше половини площі піка залишкового розчинника/розчинників на хроматограмі рівноважної газової фази над розчином порівняння (*c*). Хроматографічна система вважається придатною, якщо відносне стандартне відхилення різниць площ піків аналізованої речовини, одержане з трьох повторних парних уведень рівноважної газової фази над розчином порівняння (*a*) і випробовуваним розчином, не перевищує 15 %.

Якщо межа вмісту залишкового розчинника (класів 2 або 3) становить 0.1 % і більше, для його кількісного визначення може бути використаний метод стандартних добавок.

ДФУ 2.2.46. МЕТОДИ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО РОЗДІЛЕННЯ

Методи хроматографічного розділення — це багатостадійні методи розділення, в яких компоненти проби розподіляються між 2 фазами, одна з яких нерухома, а інша — рухома. Нерухома фаза може бути твердою речовиною або рідиною, яка нанесена на твердий носій або гель. Нерухома фаза може бути поміщена в колонку, нанесена у вигляді шару, плівки тощо. Рухома фаза може бути газом, рідиною або флюїдом (речовиною в надкритичному стані). Розділення може ґрунтуватися на процесах адсорбції, масового розподілу (розділення), іонного обміну тощо, а також на відмінності у таких фізико-хімічних властивостях молекул, як розмір, маса, об'єм тощо.

Ця стаття містить визначення і розрахунки загальних параметрів, а також загальні вимоги, що застосовуються до перевірки придатності хроматографічної системи.

Принципи розділення, обладнання і методики подані у відповідних загальних статтях ДФУ, які описують такі загальні методи:

— хроматографія на папері (*2.2.26*);
— тонкошарова хроматографія (*2.2.27*);
— газова хроматографія (*2.2.26*);
— рідинна хроматографія (*2.2.29*)
— ексклюзійна хроматографія (*2.2.30*);
— надкритична хроматографія (*2.2.45*).

Визначення. Критерії прийнятності і критерії оцінки придатності системи, наведені в монографіях, встановлені з використанням характеристик, зазначених нижче. У разі використання певного обладнання такі деякі характеристики, як відношення «сигнал/шум», ступінь розділення, можуть розраховуватися за допомогою програмного забезпечення, що постачається виробником обладнання. Користувач має забезпечити, щоб такі програмні методи розрахунку були сумісні з вимогами фармакопеї, а якщо це не так, то внести необхідні корективи.

Хроматограма є графічним або іншим поданням сигналу детектора, вихідної концентрації або іншої кількісної характеристики, що використовується як міра вихідної концентрації, що виходить, залежно від (часу або об'єму). Ідеальна хроматограма є послідовністю піків, які мають гаусову форму, на базовій лінії (рис. 9.3).

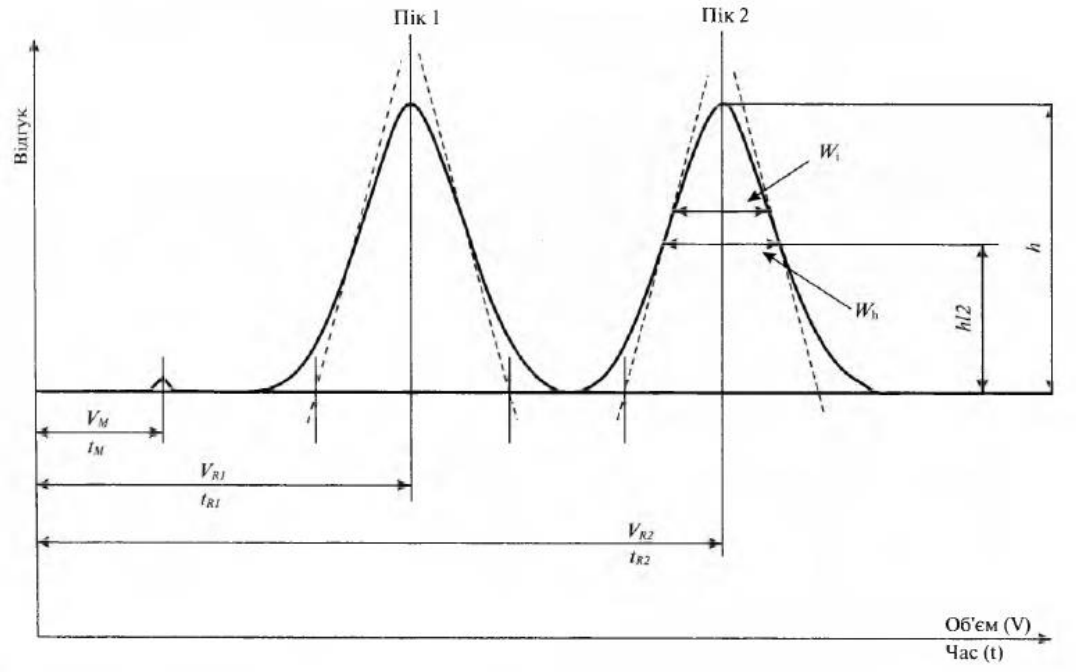


Рис. 9.3. Ідеальна хроматограма

Пік. Ділянка хроматограми, відповідна відгуку детектора у момент елюювання з колонки окремого компонента або 2 і більше неподілених компонентів. Пік може бути охарактеризований площею піка або висотою піка *(h)* і шириною піка на напіввисоті *(w_h)* або висотою піка (h) і шириною піка між точками перегину *(w_i)*. Для піків, які мають гаусову форму (рис. 9.3), виконується співвідношення: $w_h = 1.18\ w_i$.

Час утримування (t_R). Час, потрібний для елюювання компонента (рис. 9.3, шкала базової лінії у хвилинах).

Об'єм утримування (V_R). Об'єм рухомої фази, потрібний для елюювання компонента. Об'єм утримування може бути розрахований за значеннями часу утримування і швидкості потоку (F), мл/хв, за рівнянням: $V_R = t_R \bullet F$.

Мертвий час (t_M). Час, потрібний для елюювання неутримуваного компонента (рис. 9.3, шкала базової лінії у хвилинах). В ексклюзійній хроматографії використовується символ t_0.

Мертвий об'єм (V_M). Об'єм рухомої фази, потрібний для елюювання неутримуваного компонента; може бути розрахований за значеннями «мертвого» часу і швидкості потоку (F), мл/хв, за рівнянням: $V_M = t_M \bullet F$.

В ексклюзійній хроматографії використовується символ V_0.

Фактор утримування (відомий також як коефіцієнт розподілу мас (D_m) або коефіцієнт ємності (k')) визначають як:

$$k = \frac{\text{КРНФ}}{\text{КРРФ}} = K_c \cdot \frac{V_S}{V_M},$$

де: КРНФ — кількість розчиненої речовини в нерухомій фазі; КРРФ — кількість розчиненої речовини в рухомій фазі; K_c — коефіцієнт розподілу (відомий також як рівноважна стала розподілу); V_s — об'єм нерухомої фази; V_M — об'єм рухомої фази.

Фактор утримування компонента може бути розрахований з даних хроматограми з використанням такого рівняння:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Повний час ексклюзії (t_t). В ексклюзійній хроматографії — час утримування компонента, розмір молекул якого не перевищує розмір найменших пор гелю (рис. 9.4).

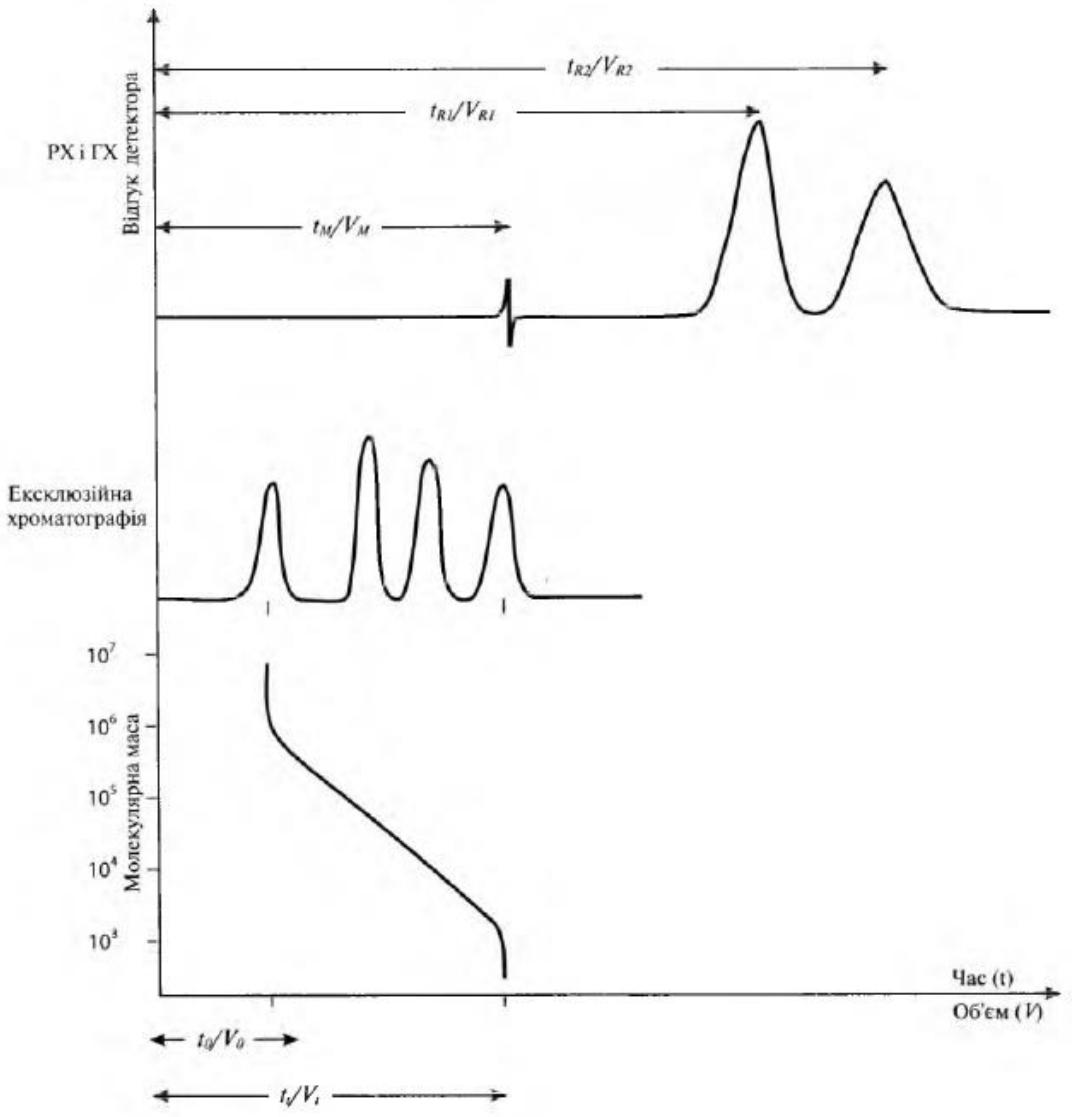


Рис. 9.4. Вигляд хроматограми в рідинній, газовій та ексклюзійній хроматографії

Повний об'єм ексклюзії **(V_t).** В ексклюзійній хроматографії — об'єм утримування компонента, розмір молекул якого не перевищує розмір найменших пор гелю. Може бути розрахований за значеннями повного часу ексклюзії і швидкості потоку (F), мл/хв, за рівнянням: $V_t = t_t \bullet F$.

Час утримування неутримуваного компонента **(t_0).** В ексклюзійній хроматографії — час утримування компонента розмір молекул якого перевищує розмір найбільших пор гелю (рис. 9.4).

Об'єм утримування неутримуваного компонента **(V_0).** В ексклюзійній хроматографії — об'єм утримування компонента, розмір молекул якого перевищує розмір найбільших пор гелю; може бути розрахований за значеннями часу утримування неутримуваного компонента і швидкості потоку (F), мл/хв, за рівнянням: $V_0 = t_0 \bullet F$.

***Константа розподілу* (K_0).** В ексклюзійній хроматографії характеристика елюювання компонента на конкретній колонці може бути подана константою розподілу (відома також як коефіцієнт розподілу), що розраховують за рівнянням:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}.$$

Коефіцієнт затримки (відомий також як коефіцієнт утримування R_f), який використовується в планарній хроматографії, є відношенням відстані між точкою нанесення і центром плями до відстані, пройденої фронтом розчинника від точки нанесення (рис. 9.5).

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

де: b — відстань, пройдена компонентом; a — відстань, пройдена фронтом розчинника.

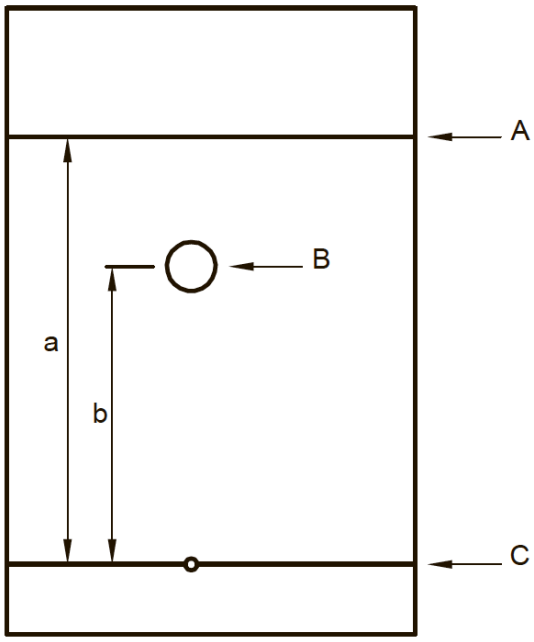


Рис. 9.5. Планарна хроматографія: A — фронт рухомої фази;
B — хроматографічна зона; C — лінія нанесення

Число теоретичних тарілок (N) (ефективність колонки) може бути обчислене з даних, отриманих в ізотермічному, ізократичному або ізоденсивному режимах (залежно від методу), за формулою, в якій значення t_R *і* w_h мають бути виражені в одних і тих самих одиницях:

$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2.$$

Число теоретичних тарілок варіюється зі зміною як компонента, так і колонки, температури колонки, рухомої фази і часу утримування.

Об'ємом затримки (відомий також як ***об'єм затримки градієнта D***) є об'єм між точкою, в якій різні рухомі фази починають змішуватися, і входом у колонку. Він може бути визначений з використанням такої методики.

Колонка: замінюють хроматографічну колонку підхожою капілярною трубкою (наприклад, 1 м × 0,12 мм).

Рухома фаза:

— *рухома фаза А: вода Р;*

— *рухома фаза В*: 0,1 % водний розчин *(об/об) ацетону Р.*

Час (хв)	Рухома фаза А (%, об/об)	Рухома фаза В (%, об/об)
0–20	100→0	0→100
20–30	0	100

Швидкість потоку: встановити до набуття достатнього значення протитиску (наприклад, 2 мл/хв).

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 265 нм.

Визначають час ($t_{0.5}$) у хвилинах, за якого оптична густина зросте на 50 % (рис. 9.6).

$$D = t_D \bullet F,$$

де: t_D — $t_{0.5}$ — $0.5t_G$, хв; t_G — зазначений час градієнта (дорівнює 20 хв); F — швидкість потоку, мл/хв.

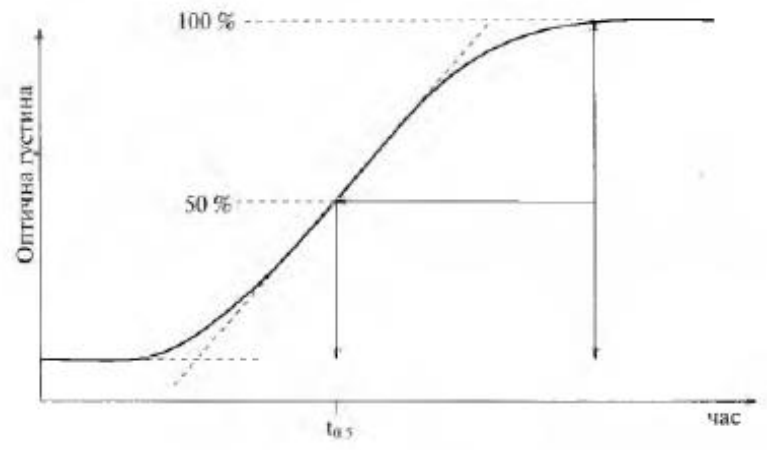


Рис. 9.6. Діаграма визначення часу ($t_{0.5}$) у хвилинах,
за якого оптична густина зросте на 50 %

Коефіцієнт симетрії **(A_S)** піка (рис. 9.7) розраховують за формулою:

$$A_S = \frac{w_{0.05}}{2d},$$

де: $w_{0.05}$ — ширина піка на одній двадцятій висоти піка; d — відстань між перпендикуляром, опущеним з максимуму піка, і передньою межею піка на одній двадцятій висоти піка.

Значення A_S = 1.0 означає повну (ідеальну) симетрію. Якщо A_S > 1,0, у піка є «хвіст» (розмитий задній фронт). Якщо A_S < 1,0, пік має розмитий передній фронт.

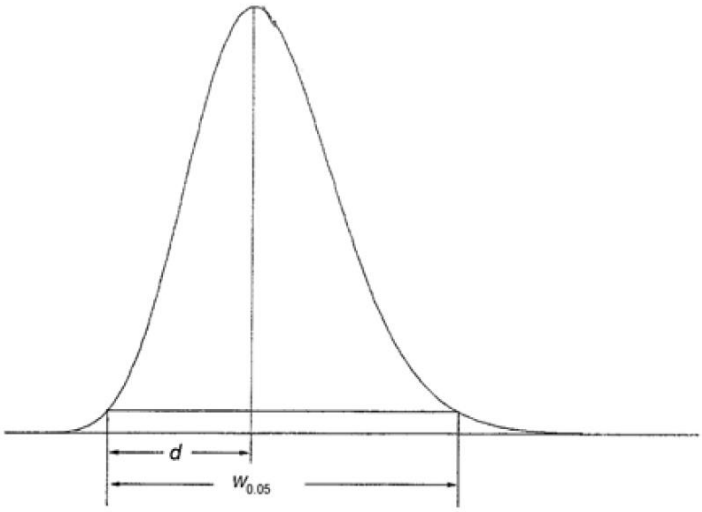


Рис. 9.7. Діаграма визначення коефіцієнта симетрії (A_S) піка

Ступінь розділення **(R_S)** між піками 2 компонентів може бути розрахована за формулою:

$$R_S = \frac{1.18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, t_{R2} > t_{R1}$$

де: t_{R1}, t_{R2} — часи утримування піків; w_{h1}, w_{h2} — ширина піка на напіввисоті.

У кількісній планарній хроматографії, що використовує денситометрію, замість часу утримування використовують відстані, пройдені компонентами, і ступінь розділення між піками 2 компонентів може бути розрахована за формулою:

$$R_S = \frac{1.18 \cdot (R_{F2} - R_{F1})}{w_{h1} + w_{h2}},$$

де: R_{F1}, R_{F2} — коефіцієнти затримки піків; R_{F1}, R_{F2} — ширина піків на напіввисоті; w_{h1}, w_{h2} — ширина піка на напіввисоті; a — відстань, пройдена фронтом розчинника.

Співвідношення «пік/западина» (p/v) може використовуватися як критерій придатності системи у випробуваннях на супровідні домішки, коли між 2 піками не досягнуто розділення до базової лінії (рис. 9.8).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v},$$

де: H_p — висота мінорного піка над екстрапольованою базовою лінією; H_V — висота над екстрапольованою базовою лінією найбільш низької точки кривої, яка розділяє мінорний і основний піки.

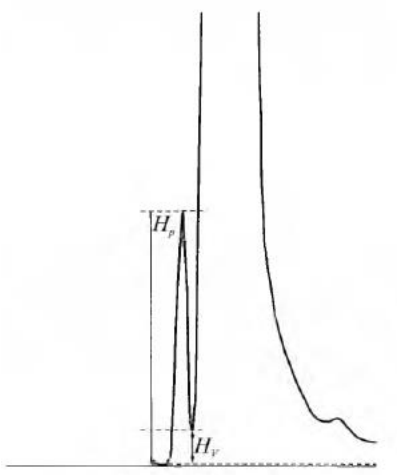


Рис. 9.8. Співвідношення «пік/западина»

Відносне утримування (r_G), використовуване як орієнтовне значення, розраховують за формулою:

$$r_G = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}.$$

Значення відносних утримувань, які наводять в монографіях, якщо немає інших зазначень, відповідають значенням відносних утримувань без урахування «мертвого» об'єму.

У планарній хроматографії замість величин t_{Rsl} *i* /t_{Ri} використовують коефіцієнти затримки R_{Fst} *i* /R_{Fi}.

Співвідношення сигнал/шум (***S/N***) впливає на прецизійність кількісних визначень, цю величину розраховують за формулою:

$$S / N = 2 H / h,$$

де: H — висота піка (рис. 8.7), відповідного аналізованому компоненту на хроматограмі, одержаній для зазначеного розчину порівняння; висоту вимірюють від максимуму піка до екстрапольованої базової лінії сигналу, який спостерігається на відстані, що

дорівнює як мінімум п'ятикратній ширині піка на його напіввисоті; *h* — область фонового шуму на хроматограмі холостого розчину, одержаній після інжекції або нанесення холостого розчину, спостережувана на відстані, яка дорівнює п'ятикратній ширині на напіввисоті піка на хроматограмі зазначеного розчину порівняння, розміщеному, якщо це можливо, рівномірно навколо місцеположення піка.

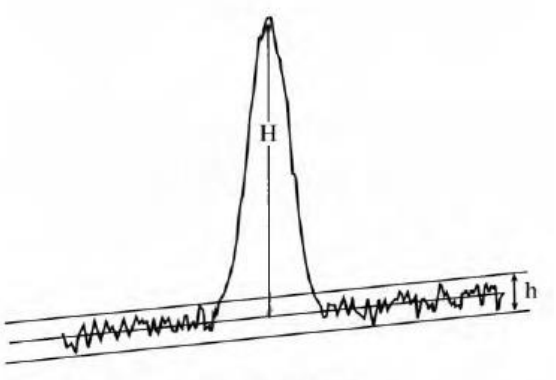


Рис. 9.9. Хроматограма для зазначеного розчину порівняння, де H — висота піка

Збіжність відгуку виражають як оцінку відносного стандартного відхилення у відсотках (s_r, %), яке розраховують з послідовної серії вимірювань для не менше 3 інжекцій або нанесень розчину порівняння за формулою:

$$s_{r(\%)} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n-1}},$$

де: y_i — індивідуальні величини, виражені як площа піка, висота піка або відношення площ або висот піків у визначенні методом внутрішнього стандарту; $\bar{y}$ — середнє індивідуальних значень; n — число індивідуальних значень.

Придатність системи

Різні компоненти використовуваного обладнання мають бути кваліфіковані і здатні забезпечувати рівень функціонування, потрібний для кількісного визначення або інших випробувань. Випробування придатності системи є невід'ємною частиною методики і використовуються для забезпечення необхідної якості функціонування хроматографічної системи. Номінальна ефективність, фактор утримування (коефіцієнт розподілу мас), ступінь розділення, відносне утримування і коефіцієнт симетрії є параметрами, які звичайно використовують для оцінки функціонування колонки. На хроматографічну поведінку системи можуть впливати такі фактори:

— склад рухомої фази, її іонна сила, температура і pH;

— швидкість потоку, розміри колонки, температура колонки і тиск;

— характеристики нерухомої фази, що містять тип хроматографічного носія (що складається з частинок або монолітний), розмір частинок або макропор, пористість, питома площа поверхні;

— обернено-фазові та інші поверхнево-модифіковані нерухомі фази, ступінь хімічної модифікації (ендкепування, відсотковий вміст вуглецю тощо).

Якщо немає інших зазначень у монографії, мають виконуватися такі вимоги:

— у випробуваннях на супровідні домішки або у кількісних визначеннях для піка на хроматограмі, одержаній для розчину порівняння, фактор си метрії основного піка має бути від 0,8 до 1,5, якщо немає інших зазначень в монографії;

— у кількісних визначеннях активних компонентів за передбачуваного значення вмісту 100 % для чистої речовини для відповідних допусків вмісту (B) у серії інжекцій розчину порівняння вимоги до максимально допустимого відносного стандартного відхилення (s_r (%)mm) розраховують за формулою:

$$s_r(\%)_{max} = \frac{K \cdot B \cdot \sqrt{n}}{t_{90\ \%;\ n-1}},$$

де: K — константа (0,349); B — верхня межа вмісту, зазначена в монографії, мінус 100 %; n — кількість паралельних інжекцій розчину порівняння ($3 \le n \le 6$); $t_{90\ \%;\ n-1}$ — коефіцієнт Стьюдента t для двосторонньої вірогідності 90 % і числа ступенів свободи n-1.

Якщо немає інших зазначень у монографії, максимальне допустиме відносне стандартне відхилення не має перевищувати відповідного значення, зазначеного в таблиці. Ця вимога не застосовна для випробувань на супровідні домішки.

Вимоги до збіжності

Кількість паралельних інжекцій				
	3	4	5	6
B (%)	Максимальне допустиме відносне стандартне відхилення (%)			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

— у випробуванні на супровідні домішки межа кількісного визначення (відповідна відношенню «сигнал/шум», що дорівнює 10) має дорівнювати або бути меншою мінімуму, що не враховується.

Під час виконання хроматографічної методики необхідно витримувати вимоги критеріїв придатності системи. Залежно від таких різних факторів, як періодичність використання методики і досвіду роботи з певною хроматографічною системою, аналітик вибирає підхожу схему верифікації для її контролю.

Коректування умов хроматографування

У розділі наведені межі, в яких можуть коректуватися різні параметри хроматографічної системи для відповідності критеріям придатності без фундаментальної переробки методики. Коректування умов хроматографування з градієнтним елююванням критичніше, ніж з ізократичним елююванням, оскільки може спричинити зміни у чергуванні піків для різних ступенів градієнта і таким чином призвести до некоректної ідентифікації піків, маскування або зміщення піків таким чином, що значення часу елюювання буде за межами зазначеного діапазону. Зміни, що виходять за межі, зазначені в цьому розділі, вимагають ревалідації методики. Зазначені умови хроматографування валідують у процесі розробки монографії. Випробування на придатність системи необхідне для одержання прийнятних характеристик випробування або кількісного визначення. Оскільки нерухомі фази описують загально й існує така різноманітність комерційно доступних нерухомих фаз, що відрізняються хроматографічною поведінкою, може знадобитися деяке коректування умов хроматографування для досягнення зазначених вимог придатності системи. Для методик обернено-фазової хроматографії, зокрема коректування різних параметрів, не завжди дає прийнятні результати. У такому разі може бути необхідним замінити колонку іншою такого самого типу (наприклад, октадецилсилілсилікагель), що показує потрібну хроматографічну поведінку. Веб-сайт інформаційної бази даних Європейського директорату з контролю якості лікарських засобів (EDQM), як правило, містить інформацію про колонки, використовувані в процесі розроблення монографій. Коректування критичних параметрів для забезпечення придатності системи чітко визначається в монографії.

Тонкошарова хроматографія і хроматографія на папері

Склад рухомої фази. Кількість мінорного компонента-розчинника може коректуватися до ±30 % відносних або ±2 % абсолютних залежно від того, що є більшим. Наприклад, для мінорного компонента, який становить 10 % рухомої фази, коректування на 30 % відносних дає допустиму ділянку від 7 до 13 %, тоді як коректування на 2 % абсолютних дає допустиму ділянку від 8 до 12 %, тобто відносна величина коректування тут більша. Якщо ж мінорний компонент становить 5 % рухомої фази, коректування на

30 % відносних дає допустиму ділянку від 3,5 до 6,5 %, тоді як коректування на 2 % абсолютних дає допустиму ділянку від 3 до 7 %, тобто абсолютна величина коректування тут більша. Жодний компонент не допускається змінювати більш як на 10 % абсолютних.

pH водного компонента рухомої фази: (± 0,2) pH, якщо немає інших зазначень у монографії, або + 1,0 pH, якщо аналізують неіонізовані речовини.

Концентрація солей у буферному компоненті рухомої фази — ±10 %.

Об'єм, що наноситься: від 10 до 20 % зазначеного об'єму, якщо використовують пластинки з дрібним розміром частинок (від 2 до 10 мкм).

РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ: ІЗОКРАТИЧНЕ ЕЛЮЮВАННЯ

Склад рухомої фази. Кількість мінорного компонента-розчинника може коректуватися до ±30 % відносних або ±2 % абсолютних залежно від того, що є більшим (див. приклад вище). Жоден компонент не допускається змінювати більш як на 10 % абсолютних.

pH водного компонента рухомої фази: ±0,2 pH, якщо немає інших зазначень у монографії, або +1,0 pH, якщо аналізують неіонізовані речовини.

Концентрація солей у буферному компоненті рухомої фази — ±10 %.

Швидкість потоку — ±50 %. Допустимі великі межі коректування, якщо є зміни в розмірах колонки (див. формулу нижче).

Параметри колонки:

Нерухома фаза:

— змінювати ідентичність зазначених замісників у нерухомій фазі не допускається (наприклад, замінювати C18 на C8);

— *розмір частинок:* максимальне зниження розміру — 50 %, збільшення розміру не допускається.

Розміри колонки: довжина — ±70 %; внутрішній діаметр — ±25 %.

У разі зміни розмірів колонки, якщо необхідно, швидкість потоку може бути скоректована з використанням такого рівняння:

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2},$$

де: F_1 — швидкість потоку, зазначена в монографії, мл/хв; F_2 — скоректована швидкість потоку, мл/хв; l_1 — довжина колонки, зазначена в монографії, мм; l_2 — довжина використовуваної колонки, мм; d_1 — внутрішній діаметр колонки, зазначений у монографії, мм; d_2 — внутрішній діаметр використовуваної колонки, мм.

Температура: ±10 °С за специфікованої температури аналізу, якщо немає інших зазначень.

Довжина хвилі детектування: коректування не допускається.

Об'єм інжекції може бути зменшений, якщо детектування і збіжність визначуваних піків залишаються задовільними; збільшення об'єму не допускається.

РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ: ГРАДІЄНТНЕ ЕЛЮЮВАННЯ

Коректування хроматографічних умов системи з градієнтом вимагає більшої обережності, ніж для ізократичної системи.

Склад рухомої фази/градієнтне елюювання: незначне коректування складу мобільної фази і градієнта є прийнятним за умови, шо:

— виконуються вимоги придатності системи;

— основний(і) пік(и) елююється(ються) у межах ±15 % зазначеного часу (часів) утримування;

— елюювальна здатність остаточного складу рухомої фази не менша елюююювальної здатності складу, зазначеного в монографії.

Якщо відповідність вимогам придатності системи не може бути досягнута, слід розглянути правильність об'єму затримки градієнта або замінити колонку.

Об'єм затримки. Конфігурація використовуваного обладнання може значно змінити значення розрізнення, часу утримування або відносних часів утримування, що зазначені в монографії. Якщо це відбувається, то причиною може бути занадто великий об'єм затримки. До методик монографій звичайно вносять ізократичний етап до початку програми хроматографування з градієнтом. Таким чином проводиться адаптація до моменту часу градієнта, зважаючи на відмінності в об'ємі затримки між використовуваною системою в розробленій методиці і тією, яка фактично використовується. Відповідальністю користувача є вибір тривалості ізократичного періоду відповідно до використовуваного аналітичного обладнання. Якщо об'єм затримки був використаний у процесі розроблення монографії, часові точки (t, хв), зазначені в таблиці градієнта, можуть бути замінені скоректованими значеннями часів (t_c, хв), розрахованими з використанням такого рівняння:

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F},$$

де: D — об'єм затримки, мл; D_0 — об'єм затримки, використаний під час розроблення методики; F — швидкість потоку, мл/хв.

Ізократичний період, що запроваджується з цією метою, може бути пропущений, якщо є дані валідації методики без цього етапу.

pH водного компонента рухомої фази: коректування не допускається.

Концентрація солей у буферному компоненті рухомої фази: коректування не допускається.

Швидкість потоку: коректування допускається, якщо проведена заміна колонки на колонку інших розмірів (див. формулу нижче).

Параметри колонки:

Нерухома фаза:

— змінювати ідентичність зазначених замісників у нерухомій фазі не допускається (наприклад, замінювати С18 на С8);

— *розмір частинок:* коректування розміру не допускається.

Розміри колонки: *довжина* — ±70 %; *внутрішній діаметр* — ±25 %.

У разі зміни розмірів колонки, якщо необхідно, швидкість потоку може бути скоректована за рівнянням:

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2},$$

де: F_1 — швидкість потоку, зазначена в монографії, мл/хв; F_2 — скоректована швидкість потоку, мл/хв; l_1 — довжина колонки, зазначена в монографії, мм; l_2 — довжина використовуваної колонки, мм; d_1 — внутрішній діаметр колонки, зазначений у монографії, мм; d_2 — внутрішній діаметр використовуваної колонки, мм.

Температура: ±5 °С за специфікованої температури аналізу, якщо немає інших зазначень.

Довжина хвилі детектування: коректування не допускається.

Об'єм інжекції: може бути зменшений, якщо детектування і збіжність визначуваних піків залишаються задовільними; збільшення об'єму не допускається.

Газова хроматографія

Параметри колонки:

Нерухома фаза:

— розмір частинок: максимальне зниження розміру — 50 %; збільшення розміру не дозволяється (набивні колонки);

— товщина плівки: від –50 до ±100 % (капілярні колонки).

Розміри колонки: довжина — ±70 %; внутрішній діаметр — ±50 %.

Швидкість потоку — ±50 %.

Температура — ±10 %.

Об'єм інжекції і об'єм після ділення потоку може бути скоректовано, якщо детектування і збіжність визначуваних піків залишаються задовільними.

Надкритична хроматографія

Склад рухомої фази. Для набивних колонок кількість мінорного компонента-розчинника може коректуватися до ±30 % відносних або ±2 % абсолютних, залежно від того, що є більшим. Для капілярних колонок коректування не допускається.

Довжина хвилі детектування: коректування не допускається.

Параметри колонки:

Нерухома фаза:

— розмір частинок: максимальне зниження розміру — 50 %; збільшення розміру не дозволяється (набивні колонки).

Розміри колонки: довжина — ±70 %, *внутрішній діаметр:* ±25 % (набивні колонки); ±50 % (капілярні колонки).

Швидкість потоку — ±50 %.

Температура — ±5 % за специфікованої температури аналізу.

Об'єм інжекції може бути зменшений, якщо детектування і збіжність визначуваних піків залишаються задовільними; збільшення об'єму не допускається.

Кількісні визначення

У процесі кількісного визначення не враховують піки, що відповідають розчинникам та реактивам, або компонентам рухомої фази, або матриці зразка.

Чутливість детектора. Чутливість детектора — це сигнал на виході, віднесений до одиниці концентрації або маси речовини у рухомій фазі, яка входить у детектор. Коефіцієнт відносної чутливості детектора, який зазвичай називається коефіцієнтом чутливості, виражає чутливість детектора для певної речовини по відношенню до стандартної речовини. Коефіцієнт перерахунку є величиною, зворотною до коефіцієнта чутливості.

Метод зовнішнього стандарту. Концентрацію аналізованого компонента(ів) розраховують, виходячи з порівняння сигналу(ів) (піка(ів)), одержаного(их) для випробовуваного розчину і розчину порівняння.

Метод внутрішнього стандарту. Однакові кількості компонента (внутрішній стандарт), який відділяють від аналізованої речовини, вводять у випробовуваний розчин

і розчин порівняння. Внутрішній стандарт не має реагувати з аналізованою речовиною. Він має бути стабільним і не містити домішок з часом утримування, близьким до аналізованої речовини. Концентрацію аналізованої речовини розраховують з порівняння відношення площ або висот піків, які відповідають аналізованій речовині і внутрішньому стандарту у випробовуваному розчині, з відношенням площ або висот піків, які відповідають аналізованій речовині і внутрішньому стандарту в розчині порівняння.

Метод внутрішньої нормалізації. Відсотковий вміст одного або декількох компонентів аналізованої речовини розраховують як відсоток площі цього (цих) піка (піків) від загальної площі всіх піків, за винятком піка розчинників або інших доданих реактивів, або піків, обумовлених компонентами рухомої фази або матриці зразка, а також піків, що мають площу меншу за мінімум, що не враховують.

Метод калібрувальної функції. Визначають залежність між виміряним або розрахованим сигналом (y) і кількістю (концентрація, маса тощо) аналізованої речовини (x) і розраховують калібрувальну функцію. Результати випробування розраховують, виходячи з виміряного або розрахованого сигналу аналізованої речовини за допомогою зворотної функції.

У випробуваннях на супровідні домішки як для методу зовнішнього стандарту, якщо для порівняння використовують розведення випробовуваного розчину, так і для методу внутрішньої нормалізації застосовують коефіцієнти перерахунку, зазначені в монографіях (коефіцієнт перерахунку для домішок вводять, коли відгук для цієї домішки виходить за межі від 0,8 до 1,2 для діючої речовини).

Якщо у випробуванні на супровідні домішки визначають суму домішок або проводять кількісне визначення домішки, важливим є вибір відповідних по- рогових настроювань і підхожих умов інтегрування площі піка. У таких випробуваннях мінімум, що не враховується (наприклад, площі піків, які лежать нижче за межу, яка береться в розрахунок) становить зазвичай 0,05 %. Тобто порогові значення системи збору даних відповідають як мінімум половині мінімуму, що не враховується. Інтегрування площ піків домішок, які відділяються не повністю від основного піка, проводять переважно екстраполяцією «западина/западина» (тангенціальне розділення).

Придатність системи

Методика. Використовуючи табл. 9.5, необхідно стежити, щоб повна невизначеність методики аналізу відповідала вимогам статті «*Валідація аналітичних методик і випробувань* (5.3.N.2). D. «Критерії проведення валідації для методик кількісного ви значення». Якщо невизначеність пробопідготовки є незначущою порівняно з повною

невизначеністю методики аналізу (див. там само), до значень s_r (%) рекомендується застосовувати вимоги табл. 9.5.

Поперемінно хроматографують однакову кількість разів розчин порівняння та випробовуваний розчин. Значення s_r (%) не має перевищувати значення, вказане у табл. 9.5.

Для випробовувань «Однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу» (2.9.6), «Однорідність дозованих одиниць» (2.9.40) і «Тест «Розчинення» для твердих дозованих форм» (2.9.3) використовують вимоги табл. 9.5 як для субстанцій з B(%) = 3.

Можливе істотне зменшення величини за рахунок об'єднання вибірок зразка(ів) порівняння і випробовуваного(их) зразка(ів) з розрахунком об'єднаного відносного стандартного відхилення (див. статтю «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» (5.3.N.1)).

Таблиця 9.5

Вимоги до s_r (%) під час проведення кількісного визначення на етапі перевірки придатності хроматографічної системи

Кількість паралельних інжекцій							
n	2	3	4	5	6	7	8
	Максимально допустиме відносне стандартне відхилення $s_r(\%)_{max}$						
B (%)	Субстанції						
1	0,16	0,42	0,60	0,74	0,86	0,96	1,06
1,5	0,24	0,63	0,90	1,11	1,29	1,44	1,58
2	0,32	0,84	1,20	1,48	1,72	1,93	2,11
3	0,48	1,26	1,80	2,23	2,58	2,89	3,17
Півсума верхньої і нижньої меж вмісту випробовуваної речовини у відсотках до номінального значення (%)	Готові лікарські засоби						
5	0,25	0,67	0,96	1,19	1,38	1,54	1,69
7,5	0,38	1,01	1,44	1,78	2,06	2,31	2,53
10	0,51	1,34	1,92	2,37	2,75	3,08	3,38
15	0,76	2,01	2,88	3,56	4,13	4,62	5,07
20	1,01	2,68	3,85	4,75	5,50	6,16	6,76

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Безрук, І. В. Експериментальне обґрунтування підходів та стандартизація препаратів плюща звичайного : дис. … д-ра філософії / І. В. Безрук; НФаУ. — Харків : НФаУ, 2020. — 228 с.

2. Варченко, В. Г. Методи тонкошарової хроматографії для виявлення фальсифікованих або субстандартних лікарських засобів / В. Г. Варченко, С. В. Сур, Н. М. Зволінська. — Київ : Моріон, 2001. — 72 с.

3. Данілов, І. П. Газова та рідинна хроматографія : навч. посіб. з хроматографії для студентів хім.-техн. спец. / І. П. Данілов, Н. В. Базалій, В. П. Бочарова. — Київ : НМК ВО, 1992. — 72 с.

4. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП Український науковий фармакопейний цент якості лікарських засобів. — 2-е вид. — Харків : Державне підприємство Український науковий фармакопейний цент якості лікарських засобів, 2015. — Т. 1. — 1128 с.

5. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП Український науковий фармакопейний цент якості лікарських засобів. — 2-е вид. — Харків : Державне підприємство Український науковий фармакопейний цент якості лікарських засобів, 2014. — Т. 2. — 724 с.

6. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП Український науковий фармакопейний цент якості лікарських засобів. — 2-е вид. — Харків : Державне підприємство Український науковий фармакопейний цент якості лікарських засобів, 2014. — Т. 3. — 732 с.

7. Лисенко, О. М. Вступ до хроматографічного аналізу : навч. посіб. / О. М. Лисенко, Б. Й. Набиванець. — Київ : Корвін-прес, 2005. — 187 с.

8. Набиванець, Б. Й. Основи хроматографічного аналізу : навч. посіб. / Б. Й. Набиванець, В. В. Сухан, О. М. Лисенко. — Київ : ВПЦ Київський університет, 2002. — 203 с.

9. Настанови з якості. Лікарські засоби. Випробування стабільності : Настанова 42-3.3:2004 / МОЗ України. — Офіц. вид. — Київ : Вид-во ТОВ Моріон, 2004. — 60 с.

10. Ракс, В. А. Сучасна хроматографія на гребні хвилі прогресу : навч. посіб. / В. А. Ракс, А. М. Єсауленко. — Київ : Вид-во Аванпост, 2014. — 168 с.

11. Рудакова, О. В. Розробка та стандартизація комбінованого лікарського засобу для фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації : дис. … д-ра філософії / О. В. Рудакова ; НФаУ. — Харків : НФаУ, 2023. — 214 с.

12. Смєлова, Н. М. Розробка методик контролю якості інуліну у субстанціях рослинного походження та сировині *Inula helenium* L. : дис. … канд. фармац. наук : 15.00.02 / Н. М. Смєлова ; НФаУ. — Харків : НФаУ, 2019. — 276 с.

13. Фармацевтичний аналіз : підручник / П. О. Безуглий [та ін.] ; за заг. ред. В. А. Георгіянц. — Харків : НФаУ : Золоті сторінки, 2019. — 568 с.

14. Фармацевтичний аналіз : навч. посіб. для студ. вищ. фарм. навч. закл. / П. О. Безуглий [та ін.] ; за заг. ред. В. А. Георгіянц. — Харків : НФаУ ; Золоті сторінки, 2013. — 552 с.

15. Хроматографія. Аналітична хімія / Д. Д. Луцкевич [та ін.]. — Київ : Здоров'я, 2003. — С. 278–285.

16. Чорний, В. А. Розробка методик контролю якості лікарських препаратів з Бензидаміну гідрохлоридом з позицій зеленої хімії : дис. … канд. фармац. наук : 15.00.02 / В. А. Чорний ; НФаУ. — Харків : НФаУ, 2021. — 185 с.

17. Advances in gas chromatography for the analysis of flavor and fragrance compounds / J. Guo [et al.] // Journal of Chromatography A. — 2021. — Vol. 1639. — P. 461925.

18. Ahmed, S. F. Gas chromatography / S. F. Ahmed, R. Arora, A. Singh // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. — 2020. — Vol. 11, № 7. — P. 2928–2939.

19. Ahuja, S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis / S. Ahuja, M. W. Dong. — 2 nd ed. — San Diego : Academic Press, 2001. — 587 p.

20. Al-Rashida, M. A comprehensive review on thin-layer chromatography and its applications / M. Al-Rashida, S. M. Amer // Journal of Separation Science. — 2018. — Vol. 41, № 5. — P. 1095–1110.

21. Alsharif, S. M. Current trends and recent advances in gas chromatography for the analysis of volatile organic compounds / S. M. Alsharif, S. A. Al-Fulaij, A. M. A. Al-Sharqi // Analytical Chemistry Insights. — 2020. — Vol. 15. — P. 1–25.

22. Amin, A. S. Advances in thin-layer chromatography and its applications in pharmaceutical analysis / A. S. Amin, H. M. Abdel-Mageed, N. H. Mohamed // Journal of Pharmaceutical Analysis. — 2020. — Vol. 10, № 3. — P. 203–218.

23. Bagheri, H. Modern trends in liquid chromatography / H. Bagheri, H. Yazdanpanah // Trends in Analytical Chemistry. — 2017. — Vol. 91. — P. 26–41.

24. Baner, K. Thin-Layer Chromatography / K. Baner, L. Gros, W. Saurev. — Haidelberg : Merk Huting Buch, 1991. — 166 p.

25. BelBruno, J. J. The Origin of Chromatography: Mikhail Tsvet's Discovery of Adsorption Chromatography / J. J. BelBruno // Angew. Chem. Int. Ed. — 2018. — Vol. 57. — P. 14230–14234.

26. Bhushan, R. In Hand Book on Thin-Layer Chromatography / R. Bhushan ; ed. by Sherma J. — New-York : Marcel Dekker, 1999. — 1047 p.

27. Carr, P. W. Understanding Modern HPLC / P. W. Carr // Chemical Analysis. — 2010. — Vol. 157. — P. 22.

28. Cazes, J. Encyclopedia of Chromatography / J. Cazes. — 3rd ed. — New York : CRC Press, 2018. — 281 p.

29. Cherniy, V. A. Development and validation of alternative analytical method for determination of related substances of benzydamine hydrochloride in oral spray by HPLC / V. A. Cherniy, S. N. Gureeva, V. A. Georgiyants // Pharmaceutical Sciences and Technology. — 2016. — Vol. 1, № 5. — P. 25–33.

30. Chornyi, V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in benzydamine dosage form by GC / V. A. Chornyi, V. Georgiyants // Scripta Scientifica Pharmaceutica. — 2019. — Vol. 6, № 1. — P. 28–35.

31. Chornyi, V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in dosage form by HPLC / V. A. Chornyi, O. Chorna, V. Georgiyants // Scientific Journal "ScienceRise: Pharmaceutical Science". — 2020. — № 3 (25). — P. 12–18.

32. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals / by John A. Adamovics. — 2-nd Ed. — New York, 1997. — 470 p.

33. Chromatography: A Science of Discovery / ed. Ikan, Raphael. — Wiley, 2003. — 247 p.

34. Chromatography: Principles and Instrumentation / by A. Braithwaite, F. J. Smith. — New York, 1996. — 270 p.

35. Cimpoiu, C. Mobile phase optimization in TLC / C. Cimpoiu, T. Hodisa // Reviews in Analytical Chemistry. — 1997. — Vol. 16, № 4. — P. 299–322.

36. Considine, D. M. Handbook of Applied Chemistry / D. M. Considine. — New York, 2019. — Vol. 1. — 249 p.

37. Crego, A. L. Recent trends in liquid chromatography detectors / A. L. Crego, V. Cerdà // Analytica Chimica Acta. — 2016. — Vol. 910. — P. 1–24.

38. Cserháti, T. Modern thin-layer chromatography in food analysis / T. Cserháti, E. Forgács // Journal of Chromatography A. — 2019. — Vol. 1594. — P. 1–18.

39. Development and application of liquid chromatography techniques in drug analysis / Z. Zhong [et al.] // Journal of Chromatography A. — 2021. — Vol. 1650. — P. 461787.

40. Development of A Unified Approach To The Method of Identification, Quantitative Determination of Active Substances and Accompanying Impurities In A Combined Drug By HPLC Method / O. V. Rudakova [et al.] // ScienceRise: Pharmaceutical Science. — 2022. — Vol. 2, № 36. — P. 81–89.

41. Egon Stahl. Thin-layer chromatography: a laboratory handbook / Egon Stahl. — New York, 1969. — 553 p.

42. Euerby, M. R. Modern HPLC for Practicing Scientists / M. R. Euerby, P. Petersson. — Wiley, 2006. — P. 268 p.

43. Fang, L. Recent advances in separation of enantiomers by liquid chromatography / L. Fang // Journal of Separation Science. — 2018. — Vol. 41, № 1. — P. 144–158.

44. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide / by O. David Sparkman, Lin X. Yang, John L. Fulton. — New York, 1996. — 632 p.

45. Glavnik, V. Thin-Layer Chromatography. In: Encyclopedia of Analytical Science / V. Glavnik, J. Grdadolnik. — 2-ed. — New York, 2005. — P. 260–272.

46. Gritti, F. Theoretical study of the influences of the kinetic and thermodynamic factors on the chromatographic separation of solutes on adsorbents / F. Gritti, G. Guiochon // J. Chromatogr. A. — 2015. — Vol. 1422. — P. 54–75.

47. Griuberg, N. Modern Thin–Layer Chromatography / N. Griuberg. — London : Marcel Dekker, 1990. — 490 p.

48. Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications / ed. by Hans-Joachim Hübschmann. — New York, 2015. — 637 p.

49. Handbook of HPLC / ed. by D. D. Perrin, J. C. N. Mello. — New York, 2010. — 715 p.

50. Handbook of Thin-Layer Chromatography / ed. by J. Sherma, B. Fried. — New York, 2003. — 1331 p.

51. Handbook of Thin-Layer Chromatography / ed. by J. Sherma, B. Fried. — 2-nd ed. — New-York : Marcel Dekker, 1996. — 1104 p.

52. Hearn, M. T. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography / M. T. W. Hearn. — Wiley, 2010. — 2241 p.

53. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis / by M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska. — London, 2011. — 998 p.

54. Introduction to Modern Liquid Chromatography / by L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch. — London, 2011. — 960 p.

55. Jork, H. Thin-Layer Chromatography, Reagents and Detection Methods / H. Jork, W. Funk, W. Fisher. — Weinheim, 1990. — Vol. 1. — 464 p.

56. Kaiser, R. E. Simple and instrumentalized high performance planar chromatography, HFC-HyperCard Course-paper version, I.F.E.A.R. / R. E. Kaiser. — Bad Duerkheim, 1996. — 157 p.

57. Kalasz, H. The Story of thin-layer chromatography / H. Kalasz, L. Ettre S. // LC and GC. — 2001. — Vol. 19, № 7. — P. 712–721.

58. Kenyon, A. S. Rapid Screening of TB Pharmaceuticals by Thin-Layer Chromatography / A. S. Kenyon. — St. Louis, 1999. — 28 p.

59. Kromidas, S. HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization / S. Kromidas. — Wiley, 2006. — 236 p.

60. Lev, O. Thermodynamic and kinetic aspects of chromatographic separations / O. Lev, I. Kedem // J. Chromatogr. A. — 2015. — Vol. 1422. — P. 76–92.

61. Modern Chromatographic Analysis of Vitamins / by A. Ahuja, S. Scypinski. — New York, 2000. — 606 p.

62. Moyer S. C. Handbook of Ion Chromatography. — New York : CRC Press, 2012. — 212 p.

63. Principles of Instrumental Analysis / by D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman. — Brazil, 2013. — 998 p.

64. Quantitative Thin-Layer Chromatography and its Industrial application / ed. by L. R. Traiber — Marcell Dekker I. — New York, 1998. — 608 p.

65. Recent advances in liquid chromatography for analysis of traditional Chinese medicines / L. Zhou [et al.] // Journal of Separation Science. — 2019. — Vol. 42, № 11. — P. 2057–2068.

66. Recent advances in the liquid chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids / C. Kulsing [et al.] // Journal of Chromatography A. — 2013. — Vol. 1313. — P. 2–17.

67. Ropte, D. Thin-layer chromatography in the German pharmacopoeia / D. Ropte, B. Volkmann // Dtsch Apoth. Ztg. — 1995. — Vol. 135, № 32. — P. 40–42.

68. Schaffner, U. Thin-layer chromatography as a method for drug analysis / U. Schaffner, U. Holzgrabe // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — 2018. — Vol. 410, № 8. — P. 2025–2042.

69. Schoenmaker, P. J. Optimization of Chromatographic Selectivity / P. J. Schoenmaker. — Amsterdam : Elsevier, 1986. — 215 p.

70. Selection of the Optimal conditions for analysis of plant active Pharmaceutical Inulin Ingredients by Thin-layer Chromatography to develop the draft for the National Monograph "Inulin" / N. M. Smielova [et al.] // Research Journal of Pharmacy and Technology. — 2019. — Vol. 12, № 6. — P. 2862–2870.

71. Selection of the optimal conditions for the qualitative analysis of sesquiterpene lactones and inulin in the medicinal plant raw material of elecampane by thin-layer chromatography / I. A. Hurko [et al.] // Topical issues of new drugs development : Abstracts of XXV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (April 18-20, 2018). — Kh. : Publishing Office NUPh, 2018. — P. 91.

72. Shalliker, R. A. Recent advances in the theory and practice of liquid chromatography / R. A. Shalliker, G. Guiochon // Journal of Chromatography A. — 2012. — Vol. 1250. — P. 242–259.

73. Simultaneous determination of benzydamine hydrochloride, methylparaben and peppermint oil in a spray dosage form by gas chromatography / V.A. Chornyi [et al.] // International Journal of Applied Pharmaceutics. — 2019. — Vol. 11, № 6. — P. 147–153.

74. The Selection of "Green" Conditions for Components Identification in a Combined Medicine by TLC/HPTLC Methods / O. V. Rudakova [et al.] // J. Org. Pharm. Chem. — 2022. — Vol. 20. — P. 52–63.

75. Valcarcel, M. Analytical chemistry and quality / M. Valcarcel, A. Rios // Trends Anal. Chem. — 1994. — Vol. 13, № 13. — P. 17–23.

76. Vishnu, R. Gas chromatography / R. Vishnu, R. Satya, R. Ganapathy // International Journal of Analytical Chemistry. — 2020. — Vol. 2020. — P. 8813672.

77. Wang, L. Development and applications of thin-layer chromatography coupled with mass spectrometry / L. Wang, Z. Chen, Y. Peng, // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2021. — Vol. 139. — P. 116317.

78. Weins, C. Advances and development in thin-layer chromatography / C. Weins, H. E. Hauck // LC and GC. — 1996. — Vol. 14, № 6. — P. 456.

79. Zengin, G. Thin-layer chromatography and its applications / G. Zengin, O. Aktas // Handbook of Thin-Layer Chromatography. — New York, 2021. — P. 1–33.

80. Zerr, W. Instrumental HPTLC / W. Zerr, D. Puffe. — Wurzburg, 1985. — 311 p.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА ... 3

РОЗДІЛ 1. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ РОЗДІЛЕННЯ ТА АНАЛІЗУ ... 4

ТЕМА 1. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ РОЗДІЛЕННЯ ТА АНАЛІЗУ (ХРОМАТОГРАФІЯ) ... 4

1.1. Складові хроматографічного процесу: рухома та нерухома фази ... 5

1.2. Загальні особливості хроматографічних методів ... 7

1.3. Історія становлення та розвитку хроматографічних методів ... 7

1.4. Поняття «хроматографія» ... 11

1.5. Основні механізми розділення у хроматографії ... 11

1.6. Фактори, що впливають на розділення речовин ... 16

1.7. Класифікація хроматографічних методів аналізу ... 17

1.8. Застосування хроматографічних методів ... 21

1.9. Переваги та недоліки хроматографічних методів аналізу ... 22

ТЕМА 2. ХРОМАТОГРАФІЯ НА ПАПЕРІ (ПАПЕРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ) ... 25

2.1. Обладнання та устаткування у методі паперової хроматографії. Компоненти хроматографічного процесу ... 26

2.2. Процедура проведення дослідження методом хроматографії на папері ... 32

2.3. Розрахунок параметрів ... 34

2.4. Способи виконання хроматографії на папері ... 35

2.5. Застосування паперової хроматографії ... 40

2.6. Переваги та недоліки методу паперової хроматографії ... 41

ТЕМА 3. МЕТОДИ ТОНКОШАРОВОЇ ТА ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ... 43

3.1. Обладнання та устаткування методів ТШХ/ВЕТШХ. Компоненти хроматографічного процесу ... 45

3.2. Процедура проведення дослідження методами ТШХ/ВЕТШХ ... 56

3.3. Галузі застосування методів ТШХ/ВЕТШХ ... 61

3.4. Переваги та недоліки методів ТШХ/ВЕТШХ ... 62

ТЕМА 4. ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ ... 64

4.1. Обладнання та устаткування у методі рідинної хроматографії. Компоненти хроматографічного процесу ... 69

4.2. Класифікація методів ВЕРХ за механізмом розділення ... 81

4.3. Особливості нормально-фазової та обернено-фазової хроматографії ... 85

4.4. Хроматограма ... 88

4.5. Недоліки методу ВЕРХ ... 90

ТЕМА 5. МЕТОДИ ІОННОЇ, ІОННООБМІННОЇ ТА ЕКСКЛЮЗІЙНОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ 93
5.1. Принцип іонообмінної хроматографії 96
5.2. Теоретичні основи розділення 100
5.3. Обладнання та устаткування методу іоннообмінної хроматографії. Компоненти хроматографічного процесу 101
5.4. Умови та методи аналізу в іонообмінній хроматографії 104
5.5. Процедура хроматографування та її результат 105
5.6. Найважливіші галузі застосування іонообмінної хроматографії 106
5.7. Переваги іонної хроматографії 108
ТЕМА 6. МЕТОД ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ 110
6.1. Історія виникнення та розвитку методу газової хроматографії 112
6.2. Випадки, за яких обирають газову хроматографію. Переваги та недоліки методу 113
6.3. Газовий хроматограф: дизайн та принцип роботи пристрою 115
6.4. Процедура у методі газової хроматографії 122
6.5. Найважливіші галузі застосування газової хроматографії 124
ТЕСТИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ 126
РОЗДІЛ 2. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ У НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ 152
ТЕМА 7. ФАРМАКОПЕЙНІ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ ДЛЯ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ 152
7.1. Методика ідентифікації субстанції ваніліну методом ТШХ 152
7.2. Методика ідентифікації субстанції гідрокортизону ацетату методом ТШХ 153
7.3. Методика визначення чистоти субстанції гліцину методом ТШХ (речовини, які виявляються нінгідрином) 154
7.4. Методика ідентифікація та визначення чистоти субстанції інуліну методом ТШХ 155
7.5. Методика ідентифікації маркерних речовин глоду квітки та листя методом ТШХ 156
7.6. Методика ідентифікації маркерних речовин глоду плоди методом ВЕТШХ 157
7.7. Методика ідентифікації маркерних речовин касії плоди методом ВЕТШХ ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
7.8. Методика ідентифікації маркерних речовин кульбаби лікарської коренів методами ТШХ та ВЕТШХ 160
7.9. Методика кількісного визначення субстанції азитроміцину методом ВЕРХ 161
7.10. Методика визначення супровідних домішок субстанції ампіциліну безводного методом ВЕРХ 162
7.11. Методика визначення залишкових кількостей органічних розчинників (ацетонітрилу) в субстанції флуоксетину гідрохлориду методом газової хроматографії 164

7.12. Методика кількісного визначення субстанції ізопропілміристату методом газової хроматографії ... 165
7.13. Методика кількісного визначення ефірних олій методом газової хроматографії ... 165
7.14. Методика визначення чистоти анісової олії методом газової хроматографії ... 166
7.15. Методика визначення супровідних домішок ацетону методом газової хроматографії ... 168
7.16. Методика визначення домішки А та супровідних домішок гліцерину методом газової хроматографії ... 169
7.17. Методика визначення хроматографічного профілю лавандової олії методом газової хроматографії ... 170
7.18. Методика визначення хроматографічного профілю розмаринової олії методом газової хроматографії ... 172
7.19. Методика визначення хроматографічного профілю олії чайного дерева методом газової хроматографії ... 173
7.20. Методика визначення жирнокислотного складу олії мигдальної нерафінованої методом газової хроматографії ... 175
7.21. Методика визначення вакцини для профілактики менінгококової інфекції (полісахаридна) ... 175
7.22. Методика визначення вакцини для профілактики пневмококової інфекції (полісахаридна) ... 176
7.23. Методика визначення вакцини для профілактики пневмококової інфекції (полісахаридна, кон'югована, адсорбована) ... 177
7.24. Методика визначення вакцини для профілактики тифу (жива, оральна, штаму ТУ 21А) ... 178
7.25. Методика визначення вакцини для профілактики тифу (полісахаридна) ... 178
7.26. Методика визначення вакцини декстрану 40 та натрію хлориду розчин для інфузій ... 179
7.27. Методика визначення вакцини для профілактики дифтерії, правця, кашлюку (ацелюлярна, компонентна) та інфекцій, викликаних Haemophilus Influenzae типу b (кон'югована), (адсорбована) ... 180
7.28. Методика визначення вакцини для профілактики інфекцій, викликаних Haemophilus Influenzae типу b (кон'югована) ... 180
7.29. Методика визначення альбуміну людини розчин ... 181
7.30. Методика визначення гепаринів низькомолекулярних С ... 181
7.31. Методика визначення декстрану 1 для ін’єкцій ... 183
7.32. Методика визначення залишкових кількостей органічних розчинників у декстрані 40 для ін'єкцій ... 185
7.33. Методика визначення декстрану 40 для ін'єкцій ... 186
7.34. Методика визначення вмісту метанолу й 2-пропанолу (метод А) ... 186

7.35. Методика визначення вінілхлориду в матеріалах на основі пластифікованого полівінілхлориду для контейнерів для водних розчинів для внутрішньовенних інфузій 188

ТЕМА 8. ПРИКЛАДИ ВИКОРИСТАННЯ ТА ОФОРМЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. ВАЛІДАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДИК 190

8.1. Валідація методики ідентифікації та визначення чистоти субстанцій інуліну методом ТШХ (за матеріалами дисертаційної роботи Н. М. Смєлової [12]) 191

8.2. Валідація методики визначення супровідних домішок методом ВЕРХ (за матеріалами дисертаційної роботи В. А. Чорного [16]) 200

8.3. Валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом ВЕРХ (за матеріалами дисертаційної роботи В. А. Чорного [16]) 211

8.4. Валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом газової хроматографії (за матеріалами дисертаційної роботи В. А. Чорного [16]) 221

8.5. Валідація методики кількісного визначення гедеракозиду С методами ВЕРХ та УВЕРХ у зразках листя плюща звичайного (за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1]) 230

8.6. Визначення хімічного складу препаратів, що містять екстракт листя плюща звичайного (за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1]) 238

8.7. Дослідження нових лікарських засобів (капсул «Гедерин» та сироп «Гедерин+») з використанням ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ методик (за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1]) 247

8.8. Розроблення методики кількісного визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату (за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1]) 259

8.9. Розроблення методики визначення домішок сальбутамолу сульфату методом ВЕРХ (за матеріалами дисертаційної роботи І. В. Безрука [1]) 265

ТЕМА 9. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ У ДФУ 269

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ 324

Самостійне електронне навчальне видання

Георгіянц Вікторія Акопівна, **Смєлова** Наталія Миколаївна,
Григорів Галина Валеріївна, **Євтіфєєва** Ольга Анатоліївна,
Безрук Іван Володимирович, **Чорний** Василь Анатолійович,
Таран Катерина Анатоліївна, **Грудько** Володимир Олексійович,
Головченко Ольга Сергіївна

ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ У ФАРМАЦІЇ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

Редакторка *Н. І. Голубєва*
Комп'ютерне верстання *О. О. Воробйова, О. М. Білинської*

Формат 60 × 90/8. Ум. друк. арк. 41,75.

Національний фармацевтичний університет
вул. Григорія Сковороди, 53, м. Харків, 61002
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи серії ДК № 3420 від 11.03.2009.