


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Кафедра технології ліків**

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри  
 (Борисюк І.Ю.)  
« 27 » серпня 2021 р

**МЕТОДИЧНА РОЗРОБКА ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ**

Факультет фармацевтичний


Навчальна дисципліна «Розробка лікарських засобів»

Практичне заняття № 4. Тема: «**Рідинна хроматографія у фармацевтичній промисловості**».

для аспірантів

Практичне заняття розробив:

асистент

 (Молодан Ю.О.)

Практичне заняття обговорено на  
методичній нараді кафедри  
«27» серпня 2021 р.

Протокол № 1

Одеса 2021

## Практичне заняття № 4

**Тема:** «Рідинна хроматографія. Методи мікробіологічного контролю лікарських засобів».

**Мета:** ознайомитися з особливостями методу рідинної хроматографії, розширити знання про сучасні методи мікробіологічного контролю лікарських засобів. Орієнтуватися в сучасних етапах мікробіологічного контролю лікарських засобів.

**Основні поняття:** ВЕРХ, детектор, домішки в лікарських препаратах, інжектор, рідинна хроматографія.

**Обладнання:** хроматограф, флуориметричний, оптичний та фотометричний детектори, фотометричний лабораторний посуд тощо.

**Навчальний час:** 8 год.

### I. План практичного заняття

- Поняття про рідинну хроматографію в контролі якості лікарських препаратів.
- Про визначення домішок органічних речовин з використанням хроматографії.
- Характеристику окремих блоків і модулів рідинних хроматографів.
- Характеристику найпоширеніших оптичних детекторів рідинних хроматографів: фотометричного і рефрактометричного.

### Основні завдання практичного заняття:

- поглиблення та уточнення знань, здобутих на лекціях та в процесі самостійної роботи;
- формування навичок і вмінь планування, аналізу й узагальнень, опанування навичок організації професійної діяльності;
- накопичення знань стосовно основних процесів рідинної хроматографії, дізнатися про контроль домішок у лікарських засобів.

### II. Питання для перевірки базових знань за темою практичного заняття

1. В чому основна сутність рідинної хроматографії в контролі якості лікарських препаратів?
2. За якими правилами проходить визначення домішок органічних речовин з використанням хроматографії?
3. Охарактеризуйте окремі блоки та модулі рідинних хроматографів.
4. Охарактеризуйте найпоширеніші оптичні детектори рідинних хроматографів: фотометричного і рефрактометричного.
5. Дайте характеристику проведення якісного і кількісного аналізу за допомогою ВЕРХ.

В даний час в світі використовується велика кількість лікарських препаратів, у зв'язку з цим, найважливіше завдання фармацевтичної хімії - надійний і точний (якісний, кількісний) аналіз речовин, що входять до складу препаратів. Одним із способів встановлення якісного і кількісного складу лікарського препарату є

хроматографічні методи аналізу, які дозволяють також розділяти складні суміші, а саме рідинна хроматографія.

Питання контролю якості та стандартизації лікарських засобів підсилюють свою актуальність в даний час у зв'язку із загальним збільшенням числа зареєстрованих лікарських засобів, що надходять, як правило, від різних виробників.

**Рідинна хроматографія** - це фізико-хімічний процес, суть якого полягає у відмінності швидкостей переміщення компонентів суміші рухомою і нерухомою фази в зв'язку з відмінними силами адсорбції, сил Ван-дер-ваальса, динаміки процесів сорбції і десорбції в системі.

Залежно від того, яку нерухому фазу використовують, існують такі варіанти РХ: **рідинно-рідинна хроматографія (РРХ)** – нерухома фаза - рідина (розподільча хроматографія), і **рідинно-твердофазна (РТФ)** або **рідинно-адсорбційна хроматографія (РАХ)** – нерухома фаза тут є твердим адсорбентом.

Хроматографія була відкрита М.С. Цветом в 1903 р у вигляді колон очного рідинно-адсорбційної методу. У цьому методі використовувалися адсорбенти з розміром зерен більше 50-100 мкм, елюент (розчинник) проходив через колонку самопливом за рахунок сили тяжіння, проточних детекторів не було.

Поділ відбувалося повільно, протягом декількох годин, і в такому режимі рідинна хроматографія не могла бути використана для аналітичних цілей. У 1965-1970 рр. зусилля фахівців в різних країнах були спрямовані на створення експресному рідинної хроматографії. Було ясно, що для збільшення швидкості поділу потрібно скоротити шляхи зовнішньої і внутрішньої дифузії. Цього можна було досягти за рахунок зменшення діаметра зерен адсорбентів. Заповнення колонок дрібними зернами (5-10 мкм) створювало великий вхідний тиск, що вимагало застосування насосів високого тиску. Так з'явилася рідинна хроматографія високого тиску.

При переході до адсорбенту дрібної фракції сильно зросла ефективність колонок, тому сучасну експресну аналітичну рідинну хроматографію назвали високоефективною рідинної хроматографією (ВЕРХ) (рис.1.). Розробка жорстких адсорбентів дрібного зернення (5 або 10 мкм), створення насосів високого тиску (понад 200 атм.) і проточних детекторів - все це забезпечило високі характеристики ВЕРХ. Час од часу поділу вона не поступалася газової хроматографії, а по областях застосування значно її перевершила.

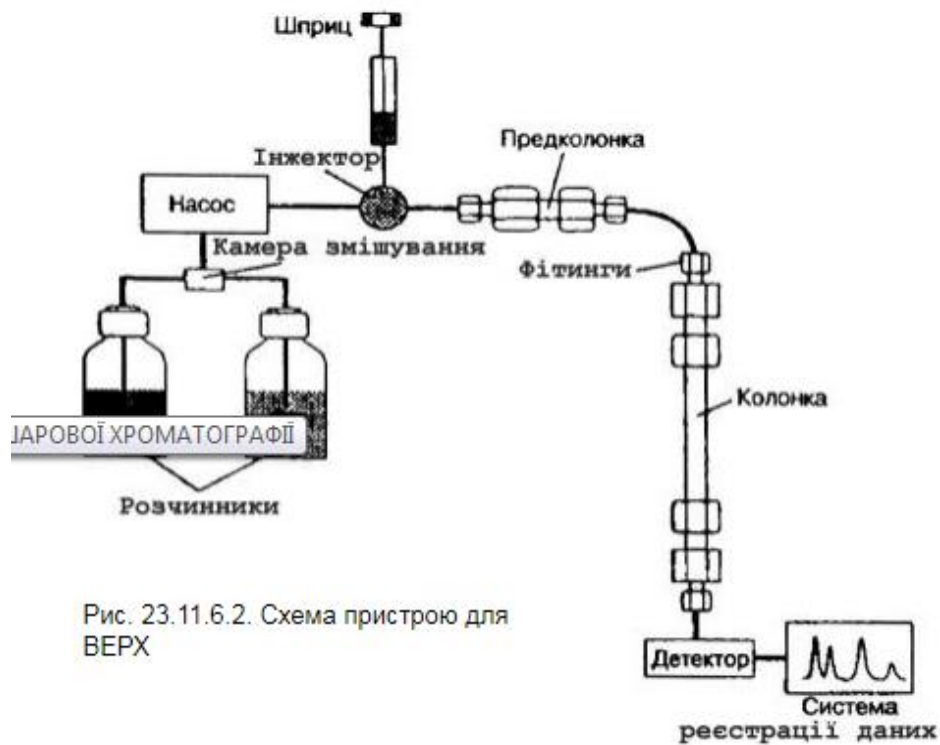


Рис.1. Схема пристрою для ВЕРХ.

ВЕРХ дуже широко застосовується для розділення і визначення самих різноманітних речовин: оптично-активних сполук, білків, нуклеїнових і амінокислот, полісахаридів, барвників, вибухових речовин, біологічних об'єктів, лікарських препаратів і т.д. Метод використовують для проведення профільного хроматографічного аналізу медичнобіологічних об'єктів у випадку їх патологічних відхилень від норми.

**Високоєфективна рідинна хроматографія** (рідинна хроматографія високого тиску) - це метод колонкової хроматографії, в якому рухомою фазою служить рідина, що рухається через хроматографічну колонку, заповнену нерухою фазою (сорбентом). Колонки для високоєфективної рідинної хроматографії характеризуються високим гідравлічним опором на вході.

Збільшити швидкість розділення і підвищити ефективність методу колонкової рідинної хроматографії можна проводячи хроматографічне розділення в довгих вузьких колонках (діаметр 2–6 мм, довжина 0,5–1,0 м) під високим тиском (від 2 до 40 МПа), застосовуючи неперервне детектування. Цей метод, який отримав назву рідинна хроматографія високого тиску (швидкісна рідинна хроматографія або високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)), почав розвиватись на початку 70-

х років. У даному методі можуть бути реалізовані майже всі механізми розділення, що використовуються у хроматографії: адсорбція, розподіл, іонний обмін, ексклюзія. Сучасні рідинні хроматографи забезпечують достатньо високу швидкість аналізу, високу ефективність колонки, можливість розділяти будь-які речовини, крім газів. Нижня межа виявлення речовини складає 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-10</sup> г.

Метод ВЕРХ має ряд переваг над іншими методами хроматографії:

- швидкість проведення аналізу перевищує більшість інших існуючих методів;
- колонки з сорбентом для ВЕРХ багаторазового використання і не потребують відновлення чи регенерації;
- відтворюваність результатів різних проб дуже висока;
- управління дослідом, аналізом, обробкою інформації, та оформлення кінцевих результатів повністю автоматизовані;
- робоча температура термостатування лежить між температурою замерзання і кипіння рухомої фази (частіше в межах 20 – 50 °С).

В даний час РХ займає провідні позиції серед інших методів хроматографії як за обсягом продукції, що випускається апаратури (понад 40000 хроматографів в рік на суму понад 2 млрд. дол.), так і за кількістю публікацій (5-6 тис. Публікацій в рік). Сучасна РХ реалізована в різних варіантах. Ці варіанти дозволяють розділяти різні суміші молекул (включаючи суміші всіх типів ізомерів); макромолекули синтетичних і біополімерів (включаючи віруси і молекули з масами до декількох мільйонів); іони і стійкі радикали. Велика роль РХ і в таких життєво важливих областях науки і виробництва, як біологія, біотехнологія, харчова промисловість, медицина, фармацевтика, судово-медична експертиза, контроль за забрудненням навколишнього середовища та ін. РХ зіграла одну з основних ролей в розшифровці генома людини, в останні роки успішно вирішує завдання протеоміки.

З 70-х років ХХ ст. активно розвивається рідинна хроматографія високого тиску, *швидкісна рідинна хроматографія*. Ці нові методи отримали загальну назву високоефективної рідинної хроматографії (РХ). У варіанті РХ можна зреалізувати майже всі механізми розділення, які застосовують у хроматографії – адсорбцію, розподіл, йонний обмін тощо.

**Головна перевага РХ перед газовою** – можливість розділення за нижчих температур, що дає змогу розділяти термічно нестійкі сполуки (наприклад, білки, які не випаровуються без руйнування).

У класичному варіанті рідинної колоночної хроматографії через колонку у вигляді скляної трубки діаметром 0-5 мм і довжиною 20–100 см, заповнену нерухомою фазою, пропускають елюент (рухома фаза), який рухається під дією сили

тяжіння. Пробу розташовують у верхній частині колонки і через певні проміжки часу відбирають для аналізу фракції елюенту. Головна незручність при такому методі - мала швидкість. З метою її збільшення почали застосовувати насадки, а потім – нагнітаючі насоси або газ високого тиску.

**Домішки в лікарських препаратах** – це небажані хімічні речовини, які містяться в фармацевтичних субстанціях, а також які утворюються під час приготування лікарської форми чи в процесі зберігання активних фармацевтичних інгредієнтів або готових медичних препаратів. Аналіз профілю домішок (тобто ідентифікація, а також кількісне визначення домішок в лікарських препаратах), зараз все більше звертає увагу контролюючих організацій. В остатніх виданнях провідних фармакопей різних країн, таких як Європейська фармакопея (ЄР), Британська фармакопея (ВР), Фармакопея Сполучених штатів Америки (USP) та інші, спостерігається тенденція до поширення номенклатури і кількісному уточненню допустимих меж домішок, присутніх в фармацевтичних субстанціях та готових лікарських формах.

Наявність різних домішок, вододіючих небажаним фармакологічною та токсикологічною дією, може стати причиною безпеки прийому лікарських препаратів, і по дії може бути сильніше позитивного ефекту від прийому ліків. Крім того, домішки можуть заважати проявленню фармацевтичних властивостей лікарської речовини.

До сучасних вимог нижня межа реєструємих органічних домішок в фармацевтичних препаратах складає від 0,05 до 0,1 %, в залежності від препарату. Домішки з концентрацією вище цього рівня мають бути ідентифіковані. Визначення домішок на більш низькому рівні ( $10^{-3}$  % та нижче) потребується лише в ряді випадків, однак все більш актуальним становиться зниження меж виявлення у зв'язку з накопиченням інформації про небажаний вплив домішок, які присутні в фармацевтичних препаратах навіть на рівні  $10^{-4}$  –  $10^{-1}$  %.

Зараз органічні домішки визначають, як правило, хроматографічними методами, з яких високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) застосовується в більшості випадків при визначенні середньо- та мало летучих речовин. Межа виявлення в стандартних фармакопейних методиках складає  $10^{-2}$  –  $10^{-1}$  %.

Для оцінки складу домішок в лікарських препаратах методом ВЕРХ використовується півкількісний та кількісний методи. *Півкількісний метод* – це відносна оцінка забруднення препарату, тобто сума всіх піків (виключаючи пік розчинника) на хроматографі приймається на 100 % та обчислюється відсотковий склад основної речовини та сума відсотків домішок. Такий метод застосовується, якщо лікарський препарат складає тільки одну діючу речовину, та, якщо склад домішок регламентується до 0,1 %.

Кількісне виявлення проводиться в абсолютних одиницях і потребує наявності стандартних зразків. Офіціальний стандартний зразок – фармакопейний стандарт (державний стандартний зразок – ДСЗ). Це особлива серія (партія) лікарської речовини, виготовленої певним чином.

ДСЗ може бути виготовлений або незалежним синтезом, або з використанням додаткової очистки одержуваної речовини. Достовірність високого ступеня чистоти встановлюється аналітичними тестами. Така речовина стає основою для створення робочого стандартного зразка (РСЗ), РСЗ – лікарська речовина встановленої якості та чистоти, одержуваної за допомогою основного стандарту та використана як стандартна речовина в аналізі певних серій, нових лікарських речовин та нових лікарських препаратів.

Для визначення лікарських домішок частіше всього використовують ВЕРХ Agilent серії 1200. Більш або менш стандартна конфігурація приладу для потреб фармакопейного аналізу включає в себе: градієнтний насос з можливістю організації градієнту 2 або 4 розчинників, ручна або автоматична система вводу проби, термостат колонок, спектрофотометричний детектор УФ-видимої області спектру та комп'ютерної станції для контролю приладу, збору та обробки хроматографічних даних. В рідкісних випадках конфігурація може бути доповнена, або флуориметричним детектором, або рефрактометричним детектором. Всі необхідні модулі є в асортименті компанії «Agilent».

Обладнання для ВЕРХ застосовується для таких видів аналізу:

1. Розробка методів оцінки якості даних лікарських препаратів є складною задачею, яка може бути вирішена з застосуванням методів ВЕРХ, дозволяючи поєднувати стадії розділення, ідентифікації і кількісного визначення.
2. Передбачувана специфікація хроматографа:
  - Обладнання введення.
  - Насос (з легазатором).
  - Термостат.
  - Хроматографічна колонка.
  - Детектор.
  - Програмне забезпечення.
  - Система управління та контролю (комп'ютер).
  - Система пробопідготовки.
  - Генератор азота (для детектора світлорозсіюванню, мас-селективному детектору).

**Допоміжні операції по розширенню можливостей обладнання:**

Можливість дооснащення мас-селективним детектором, діодно-матричним детектором, рефрактометричним детектором, флуориметричним детектором, детектором по світлорозсіюванню, бінарним градієнтним насосом, автоподатчиком, колектором фракцій.

Порядок підготовки приміщення для розміщення обладнання: 1) робоче місце має бути підготовлено з дотриманням усіх правил безпеки; 2) оператор має знаходитися на робочому місці в період проведення пуско-нагоджуючих робіт; 3) двері та проходи в приміщенні мають ширину не менше 92 см; 4) присутні столи для розміщення приладів; 5) температура приміщення підтримується в межах 16-30 °С; 6) підтримка вологості в межах 20-80%; 7) наявність вентиляційної системи; 8) достатня кількість розеток та щитків; 9) наявність всіх необхідних реагентів.

Основана частини рідинного хроматографа - насос високого тиску, система введення проби, хроматографічна колонка, детектор, інтегратор і самописець (або спеціальна ЕОМ). Залежно від природи поділюваних речовин, їх концентрацій і складу елюента використовуються різні детектори; ультрафіолетовий зі змінною або постійною (зазвичай 254 нм) довжиною хвилі, рефрактометричний і флуориметричний, рідше - полум'яно-іонізаційний, інфрачервоний, полярографічний і інші. Максимальна чутливість детектора сильно залежить від природи аналізованих речовин і становить  $10^{-2}$ -  $10^3$  г / см.

**Насоси.** Сучасні насоси для рідинної хроматографії є прецизійні пристрої, що забезпечують постійну подачу розчинника в колонку і здатні створювати тиску до декількох десятків мегапаскалей. Продуктивність насосів знаходиться в діапазоні від 1 мкл / хв (мікроколоночняя і капілярна хроматографія) до 25-100 мл / хв (препаративна хроматографія).

Робочий тиск в рідинної хроматографії є дуже важливим параметром, який обов'язково повинен контролюватися. Вимірювачі тиску встановлюють на виході насоса. У комплектних приладах і багатьох насосних системах в якості вимірників тиску використовують тензодатчики з цифровою індикацією показань. Вони мають високу точність і малий внутрішній обсяг, що дозволяє швидко замінювати розчинник в системі. Крім того, інформація про тиск, що передається у вигляді електричного сигналу, дає можливість реалізувати просту схему установки гранично допустимого діапазону тисків, при відхиленні від якого насос автоматично відключається.

Насоси мають задовольняти наступні потреби:

1) металеві деталі, які контактують з рухливою фазою, повинні бути вироблені з нержавіючої сталі, а ущільнення з високоінертних нерозчинних матеріалів.



2) Достатньо високий тиск. Необхідний робочий тиск визначається опором використовуваних колонок зі швидкістю потоку та може коливатися в широких межах.

3) Висока стабільність швидкості потоку. Точність підтримки швидкості потоку визначає результати якісного і кількісного аналізу. Нестабільність потоку не має перевищувати 0,5-1%. Крім того, дуже бажано, щоб насос не давав пульсації потоку і мав малий робочий об'єм для швидкої зміни розчинника в режимі градієнтного елюювання.

Всі насоси для ВЕРХ діляться на дві групи: постійної витрати і постійного тиску. Головними перевагами насосів постійного тиску є висока продуктивність і відсутність пульсації. Найбільш досконалою конструкцією насосів цього типу є насос з пневмопідсилювача, принциповий пристрій якого показано на рис 2. Поршень 1 великого діаметру, що приводиться в дію газом, що надходить по штуцера 2, пов'язаний з поршнем 3 меншого діаметра, який через систему клапанів 4 здійснює подачу рідини з резервуара в колонку. Для швидкого перенаповнення насоса зворотний хід поршня відбувається під дією тиску газу, що надходить через штуцер 5. Максимальний тиск, що розвивається таким насосом, залежить від ставлення площ поршнів і вхідного тиску газу. У відомому насосі фірми «Хаскела», використовуваному для упаковки колонок, воно досягає 100 МПа. Основний недолік насосів постійного тиску - зміна витрати рухомої фази при зміні опору системи. Опір колонки може підвищитися через забруднення вхідного фільтра, насадки або предколонного фільтра. Воно змінюється зі зміною в'язкості розчинника, що відбувається при коливаннях температури і практично завжди спостерігається при градієнтному елюювання. Тому насоси даного типу поступово витісняються насосами постійної витрати (рис. 3) і застосовуються, головним чином, в препаративній хроматографії і для набивання колонок.

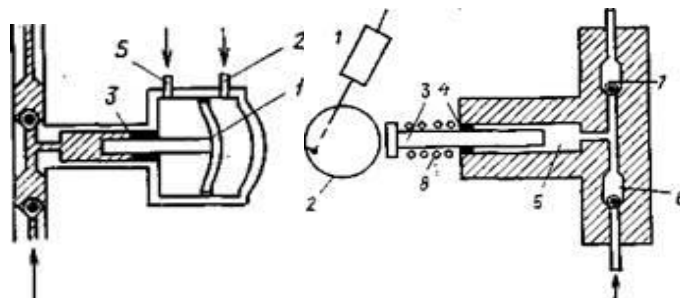


Рис 2.

Рис. 3

Рис. 2.Схема насоса постійного тиску 1 - поршень повітряного циліндра; 2, 5 - штуцери подачі повітря; 3 - поршень насоса, 4 – клапани.

Рис. 3. Схема поршневого насоса постійної витрати: 1 - електродвигун; 2 - ексцентрик; 3 - поршень; 4 - ущільнення; 5 - циліндр; 6 - вхідний клапан; 7 - вихідний клапан; 8 - поворотна пружина

Насоси постійної витрати поділяються на дві основні групи: шприцеві і зворотно-поступальні. Шприцеві насоси, як випливає з їх назви, по конструкції представляють собою шприц досить великої місткості, в якому електродвигун через силову передачу переміщує поршень, який вичавлює розчинник з постійною швидкістю. Після проходження всього робочого об'єму шприца потік переривається для перенаповнення поршня. Через цього недоліку і складності виготовлення ущільнень великого діаметра шприцеві насоси середньої продуктивності (до 5-10 мл / хв) практично вийшли з ужитку. Однак у зв'язку з швидким розвитком мікроколоночної хроматографії, в якій витрата рухомої фази порівняно невеликий, конструктори насосів знову повертаються до цієї системи, важливими достоїнствами якої є висока точність, безпульсаційна подача розчинника і відсутність клапанів.

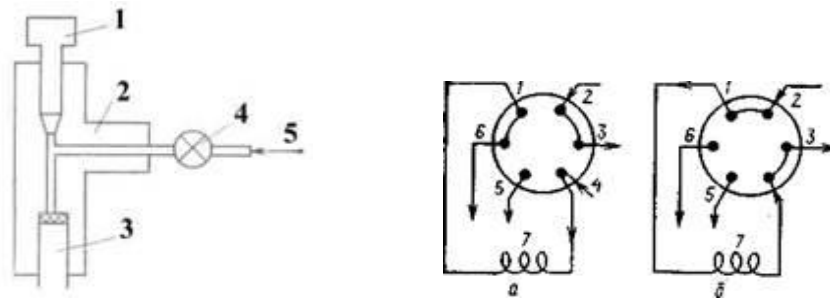
Більшість сучасних насосів забезпечено показниками і обмежувачами нижнього і верхнього меж робочого тиску. Тиск в хроматографічній системі є виключно важливим параметром, і його необхідно контролювати. Для цієї мети зазвичай використовують показчик тиску з проточними тензодатчиками. Обсяг датчиків дуже малий, тому не виникає труднощів при заміні розчинника в градієнтному елюювання. Обмежувачі тиску автоматично відключають насос при виході тиску з встановленого діапазону, що істотно підвищує безпеку роботи. Обмежувач верхньої межі також дуже корисний для запобігання псуванню колонок з деякими сорбентами, які можуть зруйнуватися при перевищенні допустимого для них робочого тиску.

*Інжектори* для введення проби повинні забезпечувати введення проб від 0,1 мкл до декількох мілілітрів (відповідно в мікро- і препаративних колонках) з високою відтворюваністю при тисках до 30-50 МПа. Розмивання проби в інжекторі має бути мінімальним. Інжектори повинні працювати при підвищених температурах і в середовищі активних розчинників і реагентів, при цьому їх ущільнення повинні бути механічно міцними. Було запропоновано велику кількість конструкцій інжекторів різних типів, багато з яких через складність виготовлення, і ненадійність роботи, високу вартість не набули широкого поширення. Розглянемо типи інжекторів, використовуваних у ВЕРХ.

Простим є інжектор із зупинкою потоку («стоп флоу». рис. 4). Він включає кран для перекривання потоку перед інжектором і трійник, до якого приєднані колонка, капіляр, що підводить розчинник, і заглушка (рис. 4). Коли треба ввести пробу, зупиняють насос, перекривають кран, відвертають заглушку, набирають пробу в мікрошприц, вводять голку до рупора у фільтр колонки, наносять пробу,

стор. 10

виймають мікрошприц, завертають заглушку, відкривають кран і включають насос. Потік розчинника вимиває пробу в колонку. Інжектор простий по конструкції, легко може бути виготовлений самостійно. Недоліки: багато ручних операцій при роботі, нестационарної потоку розчинника дає неправдивий пік і утрудняє точні кількісні виміри утримування, ефективності і інших параметрів. 1 - заглушка; 2 - корпус інжектора; 3 - колонка; 4 - кран для зупинки потоку; 5 - подання розчинника від насоса.



**Рис. 4.** Інжектор з зупинкою потоку розчинника: схема роботи петлевого інжектора : а -- заповнення петлі пробою; б -- введення проби на колонку

Детектори для ВЕРХ повинні фіксувати зміна будь-яких властивостей розчинника, що виходить з колонки, пов'язане з наявністю в ньому аналізованих речовин. Це може бути поставленні оптичних властивостей елюента (в ІЧ, УФ або видимій області), його показника заломлення, здатності флуоресцювати, електропровідності, здатності окислюватися або відновлюватися, діелектричної проникності і т.д.

Детектори для поділяються на селективні і універсальні. Селективні детектори здатні зафіксувати елюювання цікавлять дослідника речовин, що володіють специфічними властивостями, на тлі багатьох інших компонентів, таких властивостей не мають. Ці детектори (флуоресцентний, електрохімічний і ін.) Знаходять широке застосування в аналізі слідів лікарських препаратів в біологічних зразках, мікродомішки, біогенних амінів. Універсальні детектори повинні реагувати на елюювання будь-яких речовин незалежно від того, мають вони якимись особливими властивостями чи ні. Такі детектори знаходять широке застосування в органічній хімії, нафтохімії, фармацевтичній, хімічній, медичній промисловості, біологічних науках. Якими ж властивостями повинен володіти ідеальний детектор для ВЕРХ? Він не повинен викликати розмивання зони піку, що виходить з колонки, і її розширення. Повинен мати високу чутливість і відгук на проходження речовини, який можна передбачити. Зразок не повинен розкладатися, проходячи через детектор.

Сучасний рідинний хроматограф має два балони з елюентами і помпами кожний, мікропроцесор, який керує подачею елюентів, за певною програмою. Для

забезпечення високої швидкості помпи створюють тиск до 40 МПа (до 400 атм). Пробу вводять інжектором у потік елюенту і після проходження колонки детектують проточним детектором, сигнал якого реєструє і обробляє мікро-ЕОМ.

Високий тиск, необхідний для просування рухомої фази вздовж колонки, забезпечують за допомогою керованої помпи, яка мусить нагнітати рідину зі сталою швидкістю, без пульсацій. Мікропроцесор, відповідно до умов аналізу, стежить за складом і швидкістю подачі елюенту, посилаючи сигнали до двигуна помпи. Колонку, виготовлену із трубок з нержавіючої сталі, які мають внутрішній діаметр 2–6 мм і довжину 10–25 см, заповнюють частинками сорбенту розміром 3,5 або 10 мкм сферичної форми.

Детектори у рідинній хроматографії бувають декількох типів. Переважно це оптичні детектори (абсорбційні, люмінесцентні, рефрактометричні), інші - електрохімічні детектори (потенціометричні, амперометричні, кондуктометричні тощо), газові, транспортні. Основний вузол оптичного детектора - високочутливий спектрофотометр, який дає змогу детектувати сполуки концентрації до  $10^{-10}$ , які поглинають світло в ультрафіолетовій і видимій частинах спектра (190-800 нм) з реєстрацією спектру протягом 0,01-0,05 °С.

При детектуванні електроактивних компонентів проби є сенс використовувати електрохімічні детектори. Наприклад, при аналізі сполук, здатних до окиснення і відновлення, можна використати як детектор мініатюрний полярограф.

Найпоширенішими оптичними детекторами рідинних хроматографів є фотометричні і рефрактометричні.

Принцип дії фотометричних детекторів (рис. 5) ґрунтується на вимірюванні світлопоглинання в ультрафіолетовій або у видимій ділянках спектра.

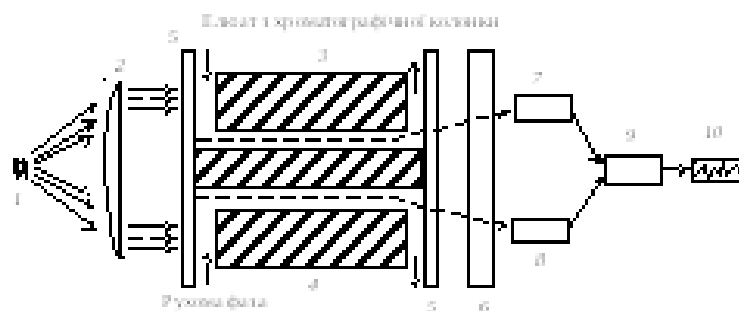


Рис. 5. Принципова схема фотометричного детектора:  
1 - дзеркало; 2 - конденсор; 3, 4 - лінзи; 5 - лінза;  
6 - світлофільтр; 7, 8 - фотоелементи; 9 - детектор; 10 - вивідний вузол.

**Рис. 6** Принцип дії фотометричного детектора.

Світловий потік від джерела світла 1 через конденсорну лінзу 2 спрямовують у кювети вимірювання 3 і порівняння 4. Кюветами слугують вузькі канали, висвердлені у блоці з нержавіючої сталі або тefлону. Діаметр каналів 1 мм. Конструкція передбачає проходження світлового променя значної інтенсивності через вузькі канали. Кювети закриті вікнами 5 із оптичного скла. Світлофільтр 6 монохроматизує світло. Пройшовши кювети, світловий потік фіксується фотоелементом 7 або 8, відповідно. За різної інтенсивності світлових потоків, які пройшли через кювети порівняння і вимірювання, виникає сигнал детектора 9, пропорційний до концентрації елементів у пробі. При однаковій інтенсивності світлових потоків сигнал детектора дорівнює нулю. Сигнал виписує самописець 10 у вигляді хроматограми. Джерелом випромінювання переважно слугує ртутна лампа низького тиску, яка дає випромінювання довжини хвилі 254 нм.

На відміну від фотометричних детекторів, що реагують тільки на речовини, що поглинають світло в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній області спектра, Рефрактометричні детектори є універсальними. Вони особливо корисні, коли речовини не мають інтенсивного поглинання в УФ світлі, що не флуоресцують і не володіють електрохімічною активністю. Їх принцип дії заснований на диференціальному вимірі показника заломлення чистого розчинника і розчину аналізованого речовини в цьому розчиннику. Внесок розчиненої речовини в зміна показника заломлення розчинника пропорційний об'ємній концентрації цієї речовини, причому розчинник також є детектируємою речовиною, так як має певний показник заломлення.

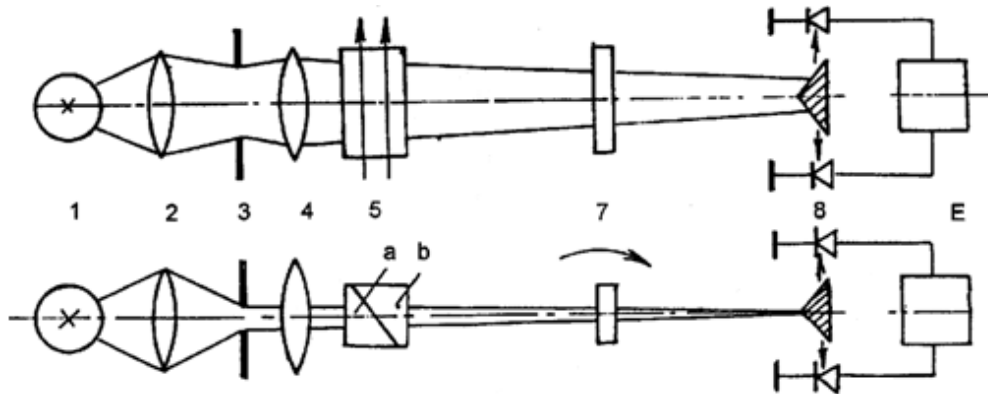
Дані детектори має середню чутливість, їх показання в сильному ступені залежать від коливань параметрів, що впливають на склад рухомої фази, таких як тиск, температура і концентрація аналізованого речовини. Тому рефрактометричний детектор мало придатний для градієнтної хроматографії. Потрібно ретельний підбір системи розчинників, що мають близькі показники заломлення. Тільки при цьому стає можливим здійснити градієнтне елюювання в певних межах концентрації суміші розчинників. Чутливість детектора до змін температури становить для різних розчинників від  $5 \cdot 10^{-4}$  до  $5 \cdot 10^{-5}$  одиниць показника заломлення на  $1^\circ\text{C}$ . Що стосується чутливості до тиску, вона становить  $1 \cdot 10^{-4}$ -  $5 \cdot 10^{-4}$  одиниць показника заломлення на 1 МПа.

Робота більшості сучасних рефрактометричних детекторів заснована на трьох різних принципах вимірювання сигналу: відхиленні, відображенні і інтерференції. Нижче на малюнку представлена оптична схема рефрактометра першого типу.

Принцип дії рефрактометричних детекторів ґрунтується на вимірюванні кута зміщення світлового потоку при його проходженні через дві призми, заповнені рухомою фазою та елюентом з хроматографічної колонки. Такі детектори використовують у тому випадку, коли працюють з розчинниками, фізичні

стор. 13

властивості яких не дають змоги використати фотометричні детектори. Головно використовують рефрактометричні детектори відхиляючого типу. Принципову схему такого детектора зображено на рис. 6.



**Рис. 6** Принципову схему рефрактометричного детектора.

Світло від лампи 1, проходить через конденсорну лінзу 2, растрову решітку 3 і лінзу 4, що служить для утворення паралельних пучків світла, які потрапляють в кварцову кювету. В кюветі є дві суміжні призми а, b, розділені світонепроникаючою перегородкою, що утворюють плоскопаралельну пластину. Призма заповнюється рухомою фазою, тоді як через призму b протікає елюат з хроматографічної колонки (стрілки вказують на напрямок потоку). При наявності різниці показників заломлення в призмах, світло, що падає на вхідну грань кювети заломлюється на межі поділу призм і відхиляється на певний кут. Відхилене світло розщеплюється призмою і падає на пару фотодіодів 8. Різниця сигналів обох фотодіодів пропорційна відхиленню променя світла, а, отже, і різниці коефіцієнтів заломлення. Установка нуля детектора здійснюється обертанням плоскопаралельної пластини 7, зміщує промінь світла.

Інший метод вимірювання заснований на законі відображення світла (закон Френеля), згідно з яким інтенсивність відбитого світла, що падає на поверхню кордону розділу рідини і скла, пропорційна куту падіння і різниці показників заломлення двох середовищ. Перевагою детекторів, що працюють на цьому принципі, є менший обсяг осередків (<3 мкл), в зв'язку з чим вони можуть працювати при невеликих витратах елюента і з високоефективними колонками. Однак чутливість таких детекторів в 50-100 разів нижче чутливості інших типів рефрактометричних детекторів, що, до речі, робить їх більш придатними для градієнтного елюювання. Так як детектування відбувається на кордоні розділу рідини і скла, для отримання стабільної роботи детектора необхідно стежити за чистотою скла.

#### Якісний і кількісний аналіз

У вискоефективній рідинній хроматографії якісний аналіз, так як і в газовій хроматографії, проводиться за даними утримування (за часом або об'ємом утримування) Кількісний аналіз у вискоефективній рідинній хроматографії, так як і в газовій хроматографії, включає нормалізацію площ піків, нормалізацію площ піків із введенням поправочних коефіцієнтів, побудову градувальних графіків, використання методу внутрішнього стандарту.

III. Формування професійних вмінь, навичок: вивчити особливості методу рідинної хроматографії, розширити знання про сучасні методи мікробіологічного контролю лікарських засобів, застосовувати знання в сучасних етапах мікробіологічного контролю лікарських засобів.

3.1. Зміст завдання практичної роботи:

**Завдання 1:** Дайте визначення поняттю «рідинна хроматографія» та «вискоефективна рідинна хроматографія».

**Завдання 2:** Опишіть переваги ВЕРХ над іншими методами хроматографії.

**Завдання 3:** Згідно наведеної схеми наведіть основні частини та опишіть принципи дії фотометричного та рефрактометричного детекторів.

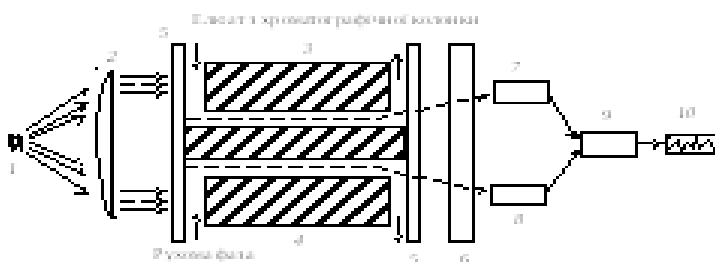
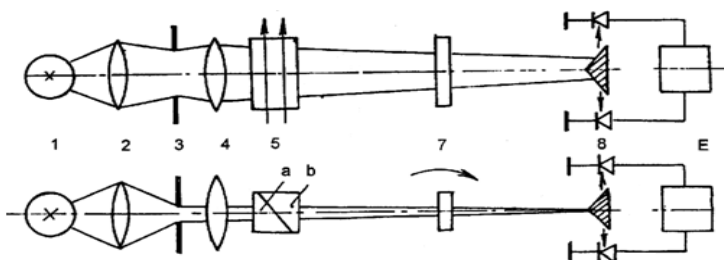


Рис. 8. Пристрійова схема фотометричного детектора:  
 1 - джерело світла, 2 - конденсор, 3, 4 - лінзи, 5 - піраміда,  
 6 - світлофільтр, 7, 8 - фотодіоди, 9 - детектор, 10 - схематична лінійка.



- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
- 7.
- 8.
- 9.
- 10.
- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
- 7.
- 8.

**Завдання 4:** Дайте характеристику якісному і кількісному аналізу за допомогою ВЕРХ.

Рекомендації щодо виконання завдань: користуючись наведеним матеріалом у робочому зошиті виконуємо завдання надавши інформацію стосовно теми

практичного заняття, зазначивши основні характеристики.

3.2. Матеріали контролю для заключного етапу заняття:

1. Яка основна перевага рідинної хроматографії від газової хроматографії?

- A. є розроблені чутливі детектувальні системи, що дозволяють визначати концентрації речовин в межах  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  мг/мл;
- B. в розходженні сорбіруємості поділюваних речовин адсорбентом (тверде тіло з розвиненою поверхнею);
- C. можливість розділення за нижчих температур та для аналізу речовин з молекулярною масою від кількох сотень до кількох мільйонів а.о.м.;
- D. в різній здатності компонентів випадати в осад на твердій нерухомій фазі.

2. Градієнтне елюювання у ВЕРХ – це..

- A. 100% ступінчата зміна елюючої сили елюенту;
- B. зміна температури елюенту;
- C. зміна швидкості потоку елюенту;
- D. зміна тиску на вході до колонки.

3. Назвіть метод хроматографії, який дозволяє працювати з термолабільшими сполуками...

- A. усе перелічене правильне;
- B. високоефективна рідинна хроматографія;
- C. газорідинна хроматографія
- D. швидкісна рідинна хроматографія.

4. В основі нормальнофазної високоефективної рідинної хроматографії переважно лежить процес...

- A. іонного обміну;
- B. розподілу;
- C. ексклюзії;
- D. сорбції і десорбції.

5. ВЕРХ можна використовувати для...

- A. усе перераховане вірно;
- B. усе перераховане невірно;
- C. розділу суміші речовин;
- D. ідентифікації речовин.

6. Метод розділення суміші речовин, який базується на різному розподіленні речовин між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, називається...

- A. екстракцією
- B. хроматографією
- C. діалізом
- D. іонним обміном

7. Розділення суміші на компоненти при адсорбційному механізмі хроматографії переважно здійснюється за рахунок...

- A. оберненої сорбції на іонообміннику



- В. необерненої сорбції на іонообміннику  
С. різниці розчинності речовин в рухомій і нерухомій фазах  
D. різниці в сорбції і десорбції
8. Хроматографічна система являє собою...
- А. совокупність двох фаз, що рухаються відносно одна одної  
В. совокупність змішаних одна з однією фаз, що не рухаються  
С. совокупність двох фаз, що не змішуються між собою, та рухаються відносно одна одної з розвиненим міжфазним кордоном  
D. совокупність двох фаз змішаних одна з однією, що рухаються відносно одна одної з розвиненим міжфазним кордоном
9. Нерухома фаза являє собою...
- А. тверду речовину, або рідину яка змішується з рухомою фазою, на яких відбувається затримання та розділення компонентів суміші  
В. тверду речовину, або рідину, що не змішується з рухомою фазою, на яких не відбувається затримання компонентів суміші  
С. тверду речовину, або рідину, що не змішується з рухомою фазою, на яких відбувається затримання та розділення компонентів аналізованої суміші  
D. тверду речовину, або рідину змішану з рухомою фазою та компонентами суміші
10. Рухома фаза являє собою...
- А. потік рідини, газа або парогазової суміші, що пересуває нерухому фазу  
В. потік рідини, газа або парогазової суміші, що пересуває компоненти суміші які розподіляються, вздовж нерухомої фази  
С. потік рідини, газа або парогазової суміші, що пересуває нерозділені компоненти суміші  
D. струм рідини, газа або парогазової суміші, що пересуває нерозділені компоненти суміші разом з нерухомою фазою

IV. Підведення підсумків: підведення результатів виконаних завдань, повідомлення оцінок, повідомлення теми наступного заняття: «Методи мікробіологічного контролю лікарських засобів (закінчення)».

### Список рекомендованої літератури:

#### Основна:

1. Аналітична хімія. Якісний аналіз неорганічних та органічних речовин: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / М.В. Шевряков, Г.О. Рябініна, С.М. Іванищук, М.В. Повстяний. – Херсон: Олді-плюс, 2017. – 516 с.
2. Георгиевский В.П., Георгиевский Г.В., Зинченко А.А., Куликов А.Ю., Назарова Е.С., Колисник А.В. Хроматографические методы в аналитическом

обеспечении создания и контроля качества лекарственных средств в Украине / Под ред. членкор. НАН Украины В.П. Георгиевского. – Харьков: изд. «НТМТ», 2016. – 288 с.

3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Доповнення 1. - Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. — 416 с.

4. Лікарські засоби. Настанова з виробництва готових лікарських засобів. СТ-Н МОЗУ 42-3.4:2020. – Офіц. вид. – К.: М-во охорони здоров'я України, 2020. – 37 с. – (Настанова Міністерства охорони здоров'я України).

5. Мікробіологія з основами імунології: Підручник для студ. мед. ЗВО, фармацевтів та провізорів. — 2-ге вид., перероб. і доп. Рекомендовано вченою радою Львів. НМУ / За ред. В.В. Данилейченка, Й.М. Федечка. - К., 2019. - 376 с.

#### **Додаткова література:**

1. Ал Нукарі Абдулкарим, О. С. Кошелєв, О. Л. Дроздов / Оцінювання мікробіологічної чистоти назальної мазі «Мнемастим» Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2018. – Т. 11, № 1(26). – С. 40–43

2. Аналітична хімія. Якісний аналіз: Навчально-методичний посібник / Т.Д. Рева, О.М. Чхало, Г.М. Зайцева та ін. – К.: «Медицина», 2017. – 280 с.

3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учеб. для студентов учреждений высш. проф. образования: в 2 т. Т. 1 / под. ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: Изд. группа "ГЭОТАР-Медиа", 2017. - 447 с.

4. Навчальний посібник для самостійної підготовки студентів фармацевтичного факультету до ліцензійного тестового іспиту «Крок - 2. Фармація» / під редакцією І.Ю. Борисюк, Н.С. Фізор, А.В. Замкова - Одеса.: ОНМедУ, 2019. – 88 с.