

В.Д. Шатц

**Высокоэффективная
жидкостная хроматография**

**Основы теории. Методология.
Применение в лекарственной
химии**

**Москва
«Книга по Требованию»**

УДК 54
ББК 24
В11

- В11 **В.Д. Шатц**
Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / В.Д. Шатц – М.: Книга по Требованию, 2019. – 386 с.

ISBN 978-5-458-33159-3

Рассматриваются варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии, имеющие наибольшее значение при анализе лекарственных веществ. Главные положения теории, закономерности, а также методические и аппаратные аспекты излагаются как основа для целенаправленного выбора условий разделения и анализа. Обобщены литературные данные и результаты собственных исследований авторов по разработке полуэмпирических моделей, связывающих величины удерживания органических соединений с их строением и составом фаз хроматографической системы. Оптимальные области использования основных методических приемов рассматриваются во взаимосвязи с характером типичных аналитических задач. Приводятся справочные данные по анализу лекарственных веществ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ISBN 978-5-458-33159-3

© Издание на русском языке, оформление
«YOYO Media», 2019

© Издание на русском языке, оцифровка,
«Книга по Требованию», 2019

Эта книга является репринтом оригинала, который мы создали специально для Вас, используя запатентованные технологии производства репринтных книг и печати по требованию.

Сначала мы отсканировали каждую страницу оригинала этой редкой книги на профессиональном оборудовании. Затем с помощью специально разработанных программ мы произвели очистку изображения от пятен, клякс, перегибов и попытались отбелить и выровнять каждую страницу книги. К сожалению, некоторые страницы нельзя вернуть в изначальное состояние, и если их было трудно читать в оригинале, то даже при цифровой реставрации их невозможно улучшить.

Разумеется, автоматизированная программная обработка репринтных книг – не самое лучшее решение для восстановления текста в его первозданном виде, однако, наша цель – вернуть читателю точную копию книги, которой может быть несколько веков.

Поэтому мы предупреждаем о возможных погрешностях восстановленного репринтного издания. В издании могут отсутствовать одна или несколько страниц текста, могут встретиться невыводимые пятна и кляксы, надписи на полях или подчеркивания в тексте, нечитаемые фрагменты текста или загибы страниц. Покупать или не покупать подобные издания – решать Вам, мы же делаем все возможное, чтобы редкие и ценные книги, еще недавно утраченные и несправедливо забытые, вновь стали доступными для всех читателей.

ВВЕДЕНИЕ

Период, наступивший в аналитической химии органических соединений с начала 60-х годов, без преувеличения может быть назван эпохой хроматографии. Один из вариантов этого метода — колоночная жидкостная хроматография — был создан русским ботаником М. С. Цветом в начале века [31]. На протяжении последующих 40 лет хроматография не находила широкого практического применения. Однако в этот период были выполнены работы, имевшие принципиальное значение и заложившие основы тонкослойной [9] и распределительной хроматографии [288]. Лишь после 1950 г. приходит время признания хроматографии, созреваания ее как эффективного метода разделения сложных смесей соединений и их анализа. В 1952 г. были выполнены первые работы по газожидкостной хроматографии [216], а вскоре освоен выпуск газовых хроматографов, и в течение последующих 20 лет газохроматографический анализ стал основным методом исследования смесей летучих термически устойчивых соединений. Но большинство органических веществ не обладает необходимой для газовой хроматографии летучестью и термостойкостью, и хроматографировать их можно только в более мягких условиях, характерных для жидкостной колоночной хроматографии. Скорость же и эффективность разделения, а также чувствительность анализа по этому методу долго оставались неудовлетворительными. И лишь в 1965—1975 гг. были в принципе решены основные научные и технологические проблемы, сдерживавшие развитие метода. Последовавший затем прогресс был столь поразителен, что современная инструментальная разновидность метода получила самостоятельное наименование — высокоэффективная жидкостная хроматография*.

* Термин «высокоэффективная жидкостная хроматография» в настоящее время прочно внедрился в отечественной литературе. На наш взгляд, однако, он не вполне удачен, так как принципиальной отличительной чертой метода является не столько эффективность как таковая, сколько сочетание ее с высокой скоростью процесса.

Важнейшим катализатором развития хроматографической науки и практики были потребности разных естественных и технических наук, начиная от медицины и кончая криминалистикой, не говоря уже о науках химических и биологических. Внедрение хроматографических методов в эти области радикальным образом изменило тактику и методику исследований, обеспечило новые возможности контроля ряда производств. Хроматографическое оборудование сейчас можно увидеть и в химической лаборатории, и в цехе, и в больнице, и в кабине космического корабля. Что же представляет собой современная хроматография? С одной стороны, это практически полезный метод сорбционного разделения смесей в динамических условиях, а с другой — это наука, изучающая закономерности поведения молекул химических соединений, перемещающихся в системах, состоящих из слоя зернистой неподвижной фазы и протекающей через слой жидкой либо газообразной подвижной фазы. Поскольку здание хроматографической науки еще далеко от завершения, хроматография в некоторых, наиболее трудных областях и по сей день остается искусством, хотя бы и основанным на фундаментальных научных принципах.

Можно утверждать, что внедрение хроматографии прививает современному химику новый взгляд на вещества и смеси, которые он исследует. Оказывается, ни одно вещество не такое чистое, каким кажется, и ни одна смесь не такая простая, какой кажется, пока они досконально не изучены хроматографическими методами. В справедливости этого пессимистического тезиса убедился, наверное, каждый, в чью работу хроматография вошла прочно. Но пессимизм здесь только в форме, а не в содержании, так как обнаружение в смеси с помощью хроматографии новых компонентов или примесей может обернуться ценным научным результатом или по меньшей мере предотвратить ошибочные решения и выводы. Резюмируя сказанное, попытаемся дать определение хроматографии, хотя и сознаем, что ни одно определение здесь не может быть исчерпывающим. Итак, хроматография — это комплексная научно-техническая дисциплина, включающая в себя:

- теоретические разделы, посвященные законам сорбции и массопередачи в динамических условиях, межмолекулярным взаимодействиям сорбат—сорбент;

- методологические и прикладные исследования, направленные на создание общих подходов и конкретных режимов разделения и анализа;

- исследования по созданию материального фундамента хроматографии — приборов, сорбентов.

Эти три направления, которые можно условно объединить термином «профессиональная хроматография», развиваются в

гармонической взаимосвязи. Благодаря совместным усилиям хроматографистов-профессионалов во всем мире жидкостная хроматография постепенно становится все более доступной широкому кругу ученых и практиков, для которых она является инструментом решения конкретных задач в своей области. Современное состояние этого метода отражено в довольно обширной литературе, вышедшей за рубежом за последние годы [56, 92, 226, 316, 367, 375].

Авторы настоящей монографии в течение ряда лет занимаются разработкой жидкостных хроматографических методов разделения различных смесей органических соединений — от продуктов основного органического синтеза до лекарственных веществ и их метаболитов, выделенных из биологических объектов. В центре внимания постоянно находилась взаимосвязь, существующая между строением веществ, составом хроматографической системы, условиями ее работы и величинами удерживания разделяемых соединений. К сожалению, уровень теории жидкостной хроматографии, которая тесно связана с теорией растворов, пока не позволяет с достаточной для практических целей точностью описывать и предсказывать поведение сложных органических соединений. Именно по этой причине мы вслед за нашими предшественниками широко используем феноменологическое моделирование. Этот путь, не претендуя на глубину физико-химического описания процесса, в то же время дает возможность выявить многие существенные его стороны и, по нашему мнению, в обозримом будущем останется в жидкостной хроматографии как единственный подход, приносящий реальные плоды хроматографисту-практику. Общую цель наших исследований можно сформулировать как создание системы представлений и моделей, пригодных в качестве инструмента при интерпретации и прогнозировании хроматографических данных.

Определяя круг вопросов, подлежащих рассмотрению в рамках данной книги, мы, естественно, исходили из того, что объекты наших исследований и научные интересы в значительной степени связаны с потребностями химии лекарственных веществ. Это наряду с определенным объемом справочного материала, приводимого в книге, и послужило поводом к выбору названия. Вместе с тем ясно, что с точки зрения методологии хроматографии лекарственные соединения ничем не отличаются от других органических веществ. Поэтому мы широко привлекали данные, касающиеся других органических соединений, и выражаем надежду, что представленный материал будет полезен не только специалистам по хроматографии лекарств. Учитывая то, что литература по современной высокоэффективной жидкостной хроматографии на русском языке весьма

ограничена [1, 8, 12, 13, 16, 19, 26, 27, 30, 37], а метод продолжает стремительно развиваться, мы включили также ряд общеметодических разделов. Сознательно оставлены за пределами книги вопросы, относящиеся к анализу лекарственных препаратов в биологических объектах. По нашему мнению, центральной проблемой в этом случае является не столько хроматография, сколько поиск адекватных методов подготовки пробы к исследованию. Учитывая, что громадное большинство лекарственных веществ — низкомолекулярные соединения, мы сочли нецелесообразным рассматривать здесь эксклюзионную хроматографию. Анализ литературных данных показывает, что роль ионообменной хроматографии при изучении лекарственных веществ невелика и имеет тенденцию к снижению; поэтому указанная разновидность хроматографии нами здесь не обсуждается.

Таким образом, цель данной книги заключается в том, чтобы, не заостря внимание на аспектах, которые по тем или иным причинам менее существенны при практическом использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии, представить основную теоретическую и методическую информацию, необходимую для сознательного освоения данного метода, рекомендации по эффективному и целенаправленному выбору условий хроматографирования.

1. ПРИНЦИПЫ И ОСНОВЫ ТЕОРИИ ХРОМАТОГРАФИИ

1.1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС: УДЕРЖИВАНИЕ, РАЗМЫВАНИЕ, РАЗДЕЛЕНИЕ

Основные элементы хроматографического процесса рассмотрим на примере разделения бинарной смеси в условиях колоночной жидкостной адсорбционной хроматографии. Представим себе трубку, заполненную пористым адсорбентом (колонку), через которую непрерывно течет растворитель (рис. 1.1). Адсорбент (сорбент, наполнитель колонки) удерживается в колонке фильтрами, он неподвижен и потому часто называется неподвижной фазой. Растворитель, перемещающийся относительно сорбента, называют также подвижной фазой (и в некоторых случаях — элюентом). Введем в верхнюю часть колонки по одной молекуле соединений — сорбатов, обозначаемых далее X и Y . При движении вдоль колонки эти молекулы будут диффундировать внутрь пор сорбента и в результате межмолекулярных взаимодействий того или иного типа адсорбируются на поверхности неподвижной фазы. Доля времени, в течение которой молекулы находятся в адсорбированном состоянии, определяется силой межмолекулярного взаимодействия сорбатов X , Y с сорбентом. При очень слабой адсорбции молекулы почти все время проводят в растворе подвижной фазы и поэтому перемещаются вниз по колонке со скоростью, лишь незначительно уступающей скорости движения подвижной фазы. Наоборот, при очень сильной адсорбции молекулы X и Y почти не отрываются от поверхности и скорость их перемещения вниз по колонке крайне незначительна.

С точки зрения хроматографии нас больше всего интересуют такие условия, в которых сила адсорбции промежуточная и скорость перемещения X и Y по колонке в 2—10 раз меньше скорости движения подвижной фазы. Явление замедленного движения молекул X и Y относительно движения молекул подвижной фазы в хроматографии называется удерживанием. Если константы сорбции веществ X и Y различны, то различаться будет и их средняя скорость смещения по колонке. Молекула X , в нашем примере сорбирующаяся слабее, при движении по

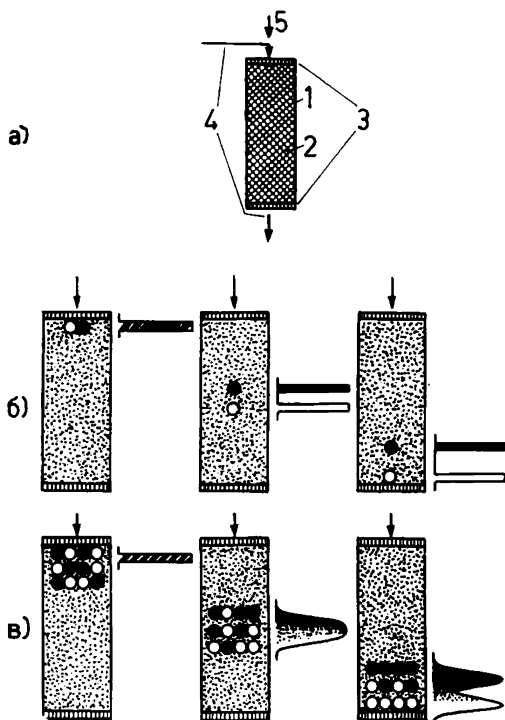


Рис. 1.1. Принципиальная схема хроматографического эксперимента. а — Колонка: 1 — корпус; 2 — сорбент; 3 — фильтры; 4 — вход и выход подвижной фазы; 5 — ввод разделяемой смеси. б — Гипотетическое разделение двух разных молекул X (○) и Y (●); линия правее колонки изображает распределение молекул двух видов по высоте слоя. в — Размывание зон при разделении реальной пробы вследствие отклонения скоростей перемещения отдельных молекул от средней для данного вида молекул величины.

колонке обгонит молекулу Y, и из колонки они выйдут в разные моменты времени. Таким образом будет достигнута основная цель хроматографии — разделение.

Естественно, на практике в колонку не вводят единичные молекулы, и поэтому данная картина предельно упрощает реальную ситуацию. Если в колонку введем хотя бы несколько молекул каждого вида, то обнаружим, что средние скорости перемещения молекул X и Y по-прежнему различны. Помимо этого, скорости перемещения отдельных молекул каждого вида отклоняются в ту или иную сторону от среднего для данного вида значения. Молекулы сорбатов, первоначально введенные в колонку в виде мгновенного импульса, выходят из нее более широкой зоной. Такая неодноточность скоростей перемещения одинаковых молекул в хроматографии называется размыванием; оно связано с рядом явлений в колонке, которые более подробно рассмотрены ниже. Это нежелательное явление приводит к тому, что среди молекул X могут находиться и такие «медленные», скорость которых близка к скорости наиболее «быстрых» молекул Y. В результате зоны X и Y могут частично

наложиться одна на другую и разделение окажется неполным (рис. 1.1, в).

Описанные процессы — удерживание и размывание — послужили главным предметом исследования хроматографической науки, основная задача которой — поиск физических и химических условий, при которых разница в средней скорости перемещения по колонке молекул X и Y была бы оптимальной, а процессы размывания свелись бы к минимуму.

1.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ВИДОВ ХРОМАТОГРАФИИ

К настоящему времени разработана довольно всесторонняя классификация видов хроматографии. Она детально обсуждена в литературе [27, 30, 92, 130, 131, 316, 375], однако целесообразно повторить ее основные принципы.

С точки зрения формы сорбционного слоя хроматографию подразделяют на колоночную и плоскостную (планарную). В первом случае сорбенту придается форма цилиндра и движение подвижной фазы направлено вдоль оси этого цилиндра. Во втором случае сорбент размещается параллельно некоторой плоскости и движение подвижной фазы параллельно ей.

С точки зрения способа ввода в колонку разделяемой смеси, наличия и роли подвижной фазы помимо описанной выше проявительной (элютивной) хроматографии различают фронтальную и вытеснительную. При фронтальном методе разделяемая смесь сама выступает в роли подвижной фазы: на выходе из колонки сначала появляется наименее сорбирующийся компонент, а затем последовательно выходят его смеси с другими, сильнее сорбируемыми компонентами. При вытеснительной хроматографии сорбент насыщается по всей длине колонки разделяемой смесью, после чего в колонку подается вещество-вытеснитель, сорбирующееся сильнее всех компонентов смеси. В настоящее время в аналитической практике используется исключительно проявительная хроматография, фронтальный и вытеснительный методы более перспективны при препаративном выделении соединений.

С точки зрения агрегатного состояния подвижной фазы хроматографию подразделяют на газовую и жидкостную; в первом случае подвижная фаза газообразна, во втором — представляет собой жидкость.

Разнообразны механизмы взаимодействия молекул сорбата с неподвижной фазой, и это также может служить основой классификации. Так, если молекулы сорбата связываются с поверхностью твердого адсорбента за счет дисперсионных, ори-

ентационных, индукционных и донорно-акцепторных взаимодействий, процесс называют адсорбционной хроматографией. Такие же взаимодействия могут иметь место и в том случае, когда неподвижная фаза жидкая и происходит растворение молекул сорбата в ее объеме. Этот вид хроматографии называют распределительным. При сорбции на твердой поверхности или в жидкости может происходить обмен ионами или лигандами, в этих случаях имеет место ионо- или лигандообменная хроматография. Наконец, сорбция как таковая может отсутствовать, а причиной разделения служит различная эффективная скорость диффузии молекул разных размеров внутрь пор неподвижной фазы. Такие режимы разделения называют ситовыми. Классификация видов хроматографии по механизму взаимодействия сорбат—сорбент достаточно условна, так как очень часто в реальной колонке параллельно могут протекать различные процессы, причем вклад каждого из них сильно зависит от природы разделяемых веществ.

Рассмотрение этой традиционной классификации показывает отсутствие в ней места для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). С формальной точки зрения это совершенно правильно, так как ВЭЖХ, согласно приведенным признакам, всего лишь жидкостная колоночная хроматография, а механизмы сорбции в ВЭЖХ могут использоваться самые различные. По существу, ВЭЖХ — это современная форма реализации классической жидкостной колоночной хроматографии. Ниже перечислены некоторые наиболее существенные ее черты, которые, по нашему мнению, свидетельствуют не о простом улучшении классического варианта, а о его качественно новом уровне:

- высокая скорость процесса, позволившая сократить продолжительность разделения от нескольких часов и суток до минут;

- минимальная степень размывания хроматографических зон, что дало возможность разделять соединения, лишь незначительно различающиеся по константам сорбции;

- высокая степень механизации и автоматизации разделения и обработки информации, благодаря чему колоночная жидкостная хроматография достигла нового уровня воспроизводимости и точности. Именно это обстоятельство превратило ВЭЖХ в мощнейший из современных методов анализа сложных смесей.

Ранее довольно часто по отношению к ВЭЖХ применялся термин «жидкостная хроматография высокого давления», однако на современном этапе развития метода рабочие давления несколько снизились, к тому же совершенно ясно, что давление само по себе не является характеристикой процесса и его един-

ственная роль чисто механическая — обеспечить необходимую скорость потока подвижной фазы.

Интенсивные исследования последних десятилетий, громадный объем накопленных экспериментальных данных позволяют сегодня уже говорить о классификации вариантов в рамках метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Конечно, при этом остается в силе классификация по механизму сорбции, приведенная выше. Однако часто в литературе по ВЭЖХ используются и другие классификация и терминология, не всегда до конца логичные. Так, в соответствии с типом сорбента можно различать хроматографию в системах жидкость—твердое тело, распределительную, на химически связанных неподвижных фазах. Часто, в особенности в зарубежной литературе, хроматографию на твердых адсорбентах относят к адсорбционной. Как показали исследования, ставить знак равенства между этими двумя терминами нельзя, так как не всегда именно поверхность твердого адсорбента ответственна за удержание — зачастую главную роль играет адсорбированный на ней слой компонентов подвижной фазы (хроматография на динамически модифицированных сорбентах). С другой стороны, сорбция на химически связанных неподвижных фазах часто имеет обычный адсорбционный механизм.

Весьма распространена классификация, основанная на сравнительной полярности подвижной и неподвижной фаз. При этом различают нормально- и обращенно-фазовую хроматографию. В первом случае неподвижная фаза более полярна, чем подвижная, во втором — наоборот. Последние два термина лишены физического смысла и лишь связаны с тем обстоятельством, что исторически первым вариантом была именно хроматография на полярных сорбентах в относительно малополярных подвижных фазах.

Из сказанного ясно, что создание полной и непротиворечивой классификации вариантов ВЭЖХ — довольно трудная задача не только по существу, но и потому, что многие неудачные термины укоренились в практике и литературе, по-видимому, на долгое время. Необходимость упорядочения, однако, назрела, в силу чего в рамках данной книги в качестве рабочего варианта предлагается следующая классификация. Вряд ли и она свободна от недостатков, но, на наш взгляд, может служить разумным компромиссом между физико-химической обоснованностью и исторически сложившейся практикой:

— нормально-фазовая хроматография — такой вариант ВЭЖХ, когда подвижная фаза менее полярна, чем неподвижная, и есть основания считать, что основной фактор, определяющий удержание, — это взаимодействие сорбатов непосредственно с поверхностью либо объемом сорбента;

— обращенно-фазовая хроматография — такой вариант ВЭЖХ, когда подвижная фаза более полярна, чем неподвижная, и удерживание определяется непосредственным контактом молекул сорбата с поверхностью или объемом сорбента; при этом ионизированные сорбаты не обмениваются на ионы подвижной фазы, сорбированные на поверхности;

— ионообменная хроматография — вариант, при котором сорбция осуществляется путем обмена сорбированных ионов подвижной фазы на ионы хроматографируемых веществ; полностью аналогично можно определить лигандообменную хроматографию;

— хроматография на динамически модифицированных сорбентах — вариант ВЭЖХ, при котором сорбат не взаимодействует непосредственно с поверхностью сорбента, а вступает в ассоциацию с молекулами приповерхностных слоев элюента. Состав этих слоев, находящихся в динамическом равновесии с подвижной фазой, отличается от среднего для данного эксперимента состава подвижной фазы;

— ион-парная хроматография — такой вариант обращенно-фазовой хроматографии ионизированных соединений, при котором в подвижную фазу добавляется гидрофобный противоион, качественно изменяющий сорбционные характеристики системы;

— эксклюзионная хроматография — способ разделения соединений по их молекулярным массам, основанный на различии в скорости диффузии в порах неподвижной фазы молекул различных размеров.

1.3. НЕКОТОРЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Хроматограмма — кривая, изображающая зависимость концентрации соединений, выходящих с потоком подвижной фазы из колонки, от времени с момента начала разделения (рис. 1.2). Хроматограмма обычно состоит из базовой линии 1 и пиков 2. В хроматографических приборах, как правило, не происходит непосредственного измерения концентрации вещества в подвижной фазе, а с помощью специального узла — детектора измеряется какая-либо физическая величина, функционально связанная с концентрацией. *Базовая линия* соответствует тому промежутку времени, в течение которого детектор регистрирует сигнал только от подвижной фазы. *Пик* — кривая, в идеале приближающаяся к кривой гауссова распределения, описывает постепенное нарастание концентрации вещества на выходе из