

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені В. Н. Каразіна

**Кафедра хімічної метрології**

УДК 543.544



*До захисту допускаю*  
Завідувач кафедри

«12» грудня 2024 р. д.х.н., проф. Олег ЮРЧЕНКО

**УМОВИ ХРОМАТОГРАФІЧНОЇ ОЧИСТКИ ОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН  
В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПРИРОДИ СПОЛУК**

Кваліфікаційна робота магістра II курсу

групи ХМ-23

хімічного факультету

ШЕЙНИ ІЛІ ОЛЕКСАНДРОВИЧА

Науковий керівник

к.х.н., доцент



Наталія НІКІТИНА

Харків – 2024

## РЕФЕРАТ

*Об'єм роботи* складає 57 сторінок. Робота містить 8 таблиць, 19 рисунків, 6 формул та 29 джерела інформації.

*Об'єкт дослідження:* препаративна високоефективна рідинна хроматографія.

*Предмет дослідження:* умови градієнтного елюювання в залежності від гідрофобності цільової сполуки.

*Мета роботи:* перевірити можливість прогнозування умов препаративного хроматографічного розділення органічних речовин в залежності від їхніх фізико-хімічних властивостей.

*Методи дослідження та апаратура:* препаративна високоефективна рідинна хроматографія з використанням хроматографічної системи Agilent 1260 Infinity II, що забезпечує високу чутливість і точність

*Результати та їх новизна:* показано, що градієнтне елюювання дозволяє досягти повного розділення компонентів суміші із скороченням часу аналізу, також встановлено чітку залежність між  $\log P$  і необхідним вмістом органічної фази при градієнтному елююванні. Було показано, що збільшення  $\log P$  на 0,5 одиниці вимагає підвищення вмісту органічної фази на 5%. Ця закономірність підтверджена для двох систем розчинників: метанол–вода та ацетонітрил–вода. Запропонований підхід дозволяє прогнозувати поведінку хімічних сполук у хроматографічних системах.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ГРАДІЄНТНЕ ЕЛЮЮВАННЯ, ЛОГАРИФМ КОЕФІЦІЄНТА РОЗПОДІЛУ ( $\log P$ ), МЕТАНОЛ, АЦЕТОНІТРИЛ, РОЗДІЛЕННЯ СПОЛУК.

## ABSTRACT

*Volume of the work:* 57 pages. The work contains 8 tables, 19 figures, 6 formulas, and 29 sources of information.

*Object of the research:* preparative high-performance liquid chromatography.

*Subject of the research:* gradient elution conditions depending on the hydrophobicity of the target compound.

*Aim:* to check a possibility of prediction of preparative chromatographic separation of organic compounds depending on their physicochemical properties.

*Methods and equipment:* preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) using the Agilent 1260 Infinity II chromatography system, which provides high sensitivity and accuracy.

*Results and novelty:* It has been demonstrated that gradient elution enables complete separation of mixture components while reducing analysis time. A clear correlation between  $\log P$  and the required organic phase content during gradient elution was established. It was shown that an increase in  $\log P$  by 0.5 units requires an increase in organic phase content by 5%. This pattern was confirmed for two solvent systems: methanol–water and acetonitrile–water. The proposed approach allows predicting the behavior of chemical compounds in chromatographic systems.

**KEYWORDS:** HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, GRADIENT ELUTION, LOGARITHM OF PARTITION COEFFICIENT ( $\log P$ ), METHANOL, ACETONITRILE, COMPOUND SEPARATION.

## ЗМІСТ

ВСТУП	5
1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	7
1.1. Зворотно-фазова ВЕРХ: принципи розділення та взаємодії, практичне значення	7
1.1.1. Стаціонарна фаза	7
1.1.2. Рухома фаза	9
1.1.3. Детектори	10
1.1.4. Режими елюювання	15
1.2. Параметри утримування у ВЕРХ	16
1.3. Фактори що впливають на розідження в ВЕРХ	19
1.3.1. Адсорбційна рівновага	19
1.3.2. Рідинна взаємодія	20
1.3.3 Вплив рН	22
1.3.4. Вплив температури	23
1.3.5. Вплив таутомерії на процес розділення у ВЕРХ	25
1.3.6. Полярність у ВЕРХ: основи та значення для хроматографічного розділення	26
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	28
2.1 Обладнання та реактиви	28
2.2 Методики експерименту	32
2.2.1 Градієнтна сітки методів	32
2.2.2 Пробопідготовка зразків	35
2.3 Результати та обговорення	35
2.3.1 Оптимізація процесу препаративної очистки сполук з різними значеннями log P	35
2.3.2 Хроматографічне розділення сполук однакової гідрофобності та різною молекулярною структурою	46
2.4 Охорона праці	52
ВИСНОВКИ	54
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	55

## ВСТУП

Препаративна високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) є одним із ключових методів, який застосовується для виділення та очищення важливих сполук у хімічній та фармацевтичній промисловості, а також у біотехнології та біохімічних дослідженнях.

Ключовими критеріями результативності у препаративній ВЕРХ є чистота кінцевого продукту, вихід і загальна ефективність процесу. Оскільки ці параметри взаємопов'язані, оптимізація методики, яка б одночасно підвищувала всі три показники, є непростим завданням. Вплив кожного фактора на інші вимагає обережного налаштування параметрів процесу для досягнення балансу.

Стратегія оптимізації методики зазвичай залежить від цілей використання продукту. Наприклад, для сполук, які призначені для біологічних або фармацевтичних випробувань, основним пріоритетом є висока чистота продукту, а параметри продуктивності та виходу мають другорядне значення.

Водночас, якщо препаративна ВЕРХ використовується для очищення проміжних сполук у синтетичних процесах, на перше місце виходять показники продуктивності та виходу, оскільки це знижує втрати матеріалу і пришвидшує синтез. У таких випадках вимоги до чистоти можуть бути менш суворими, якщо забезпечений рівень якості дозволяє подальше застосування отриманої сполуки [1].

Тому метою даної роботи стало перевірити можливість прогнозування умов препаративного хроматографічного розділення органічних речовин в залежності від їхніх фізико-хімічних властивостей. Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- обрати параметр, який можна використовувати як уніфікований показник для вибору методу очистки;

- обрати набір тестових речовин із різними параметрами;
- провести препаративне хроматографічне розділення тестових речовин із використанням різних рухомих фаз;
- провести узагальнення отриманих результатів та запропонувати умови препаративного розділення відповідно до значень обраних параметрів.

## 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1. Зворотно-фазова ВЕРХ: принципи розділення та взаємодії, практичне значення

Зворотно-фазова високоефективна рідинна хроматографія (ЗФ-ВЕРХ) є однією з ключових технік сучасної хроматографії, що дає змогу проводити високоточне розділення різноманітних органічних і біологічних сполук. Її універсальність і ефективність базуються на унікальній комбінації неполярної стаціонарної фази та полярної рухомої фази, яка містить воду і органічні розчинники.

Практичне значення ЗФ-ВЕРХ визначене найпоширенішим типом рідинної хроматографії завдяки її універсальності. Більшість органічних молекул містять хоча б невеликі гідрофобні ділянки, що робить цю техніку незамінною для аналізу широкого спектра сполук. Вона використовується для розділення складних сумішей, наприклад, ліпідів або білків, а також для визначення концентрацій активних фармацевтичних інгредієнтів. ЗФ-ВЕРХ є основним інструментом аналітичної хімії, який поєднує високу точність, гнучкість і здатність до роботи з широким діапазоном сполук. Цей метод продовжує залишатись важливим засобом досліджень і контролю якості в різних галузях науки й індустрії.[2]

#### 1.1.1. Стаціонарна фаза

Стаціонарна фаза ЗФ-ВЕРХ використовує фазу, виготовлену з неполярних матеріалів. Найпоширеніший варіант — це C18-фаза, що складається з довгих алкільних ланцюгів (18 атомів вуглецю), які зв'язуються з кремнеземною основою.

Ці молекули мають виражений гідрофобний характер, що робить їх ідеальними для взаємодії з неполярними частинами молекул аналізованих

сполук. Однак C18-колонки мають обмеження у стійкості до рН вище 8, що може призводити до руйнування полімерної структури і скорочення терміну служби колонки.

Для розв'язання цієї проблеми було розроблено спеціалізовані колонки, такі як XBridge. Їхня полімерна структура має "місткові" зв'язки, що значно підвищує стійкість до агресивних умов і дозволяє працювати в широкому діапазоні рН. Для менш гідрофобних речовин використовуються фази з коротшими ланцюгами, наприклад, C8 [3]. Для задач, пов'язаних із розділенням ароматичних сполук, ефективно використовуються фенільні та пентафенільні фази. Завдяки  $\pi$ - $\pi$  взаємодіям вони забезпечують високу селективність і якісне розділення поліароматичних сполук, що робить їх незамінними для таких специфічних аналізів.

Окрім кремнезему, у якості основи для стаціонарної фази можуть застосовуватись полімерні матеріали, які забезпечують додаткову варіативність у виборі умов аналізу.

Однією з головних характеристик препаративних колонок є їх значно більші розміри в порівнянні з аналітичними. Зазвичай препаративні колонки мають внутрішній діаметр від 21,2 мм до 50 мм і довжину від 250 мм до 1000 мм. Така масштабність дозволяє працювати з великими об'ємами зразків, забезпечуючи ефективне очищення. Завдяки збільшеній ємності ці колонки ідеально підходять для завдань, де необхідна робота з високими навантаженнями.

Препаративні колонки оцінюють за ключовими параметрами, такими як роздільна здатність, ефективність і стійкість до тиску. Роздільна здатність є критичним показником для очищення складних сумішей, оскільки вона визначає якість розділення компонентів. Ефективність відображає здатність колонки забезпечувати мінімальне розширення зон речовин у процесі елюювання, що сприяє отриманню вузьких піків і кращого розділення.

Оскільки у препаративному ВЕРХ використовуються високі витрати рухомої фази, колонки мають витримувати підвищений тиск, не втрачаючи своїх експлуатаційних властивостей

Таким чином, вибір препаративної колонки та умов хроматографічного процесу є багатофакторним завданням, яке вимагає детального аналізу властивостей зразка, вимог до розділення та експлуатаційних характеристик. Використання інноваційних підходів, таких як модифіковані стаціонарні фази, дозволяє досягати високої ефективності навіть у найскладніших завданнях [4].

### **1.1.2. Рухома фаза**

Рухома фаза ЗФ-ВЕРХ зазвичай є сумішшю води та органічного розчинника, такого як метанол, ацетонітрил або ізопропанол. Співвідношення цих компонентів варіюється залежно від властивостей аналізованих сполук. Для досягнення стабільного рН і підвищення точності аналізу у рухому фазу часто додають буферні системи.

Для досягнення оптимальних результатів у розділенні методом ВЕРХ рухома фаза повинна виконувати кілька основних функцій:

по-перше, зразок повинен повністю розчинитися в рухомій фазі. Будь-яка нерозчинність може спричинити обмеження потоку та операційні проблеми. Тому перед ін'єкцією важливо переконатися у розчинності зразка в обраній рухомій фазі, щоб забезпечити стабільну роботу системи та уникнути ускладнень.

по-друге, компоненти рухомої фази повинні бути нетоксичними та безпечними. Це особливо важливо для препаративної хроматографії, де безпека поводження з розчинниками та їх утилізація мають ключове значення.

по-третє, рухома фаза має бути хімічно інертною як до компонентів зразка, так і до стаціонарної фази. Будь-які небажані реакції можуть призвести до утворення нерозчинних суспензій, що можуть забивати хроматографічну колонку. Такі блокування не лише погіршують ефективність розділення, але й призводять до розширення піків та скорочують термін служби колонки, що негативно впливає на загальну продуктивність аналізу.

Крім того, рухома фаза має бути сумісною з детектором. Вона не повинна створювати власного сигналу під час детектування, щоб не заважати точному вимірюванню аналітів. Наприклад, сигнал детектора має відображати лише характеристики зразка, виключаючи вплив сигналів від самої рухомої фази. Ця вимога, однак, не поширюється на детектори, що працюють за принципом визначення об'ємних властивостей, такі як рефрактометричні детектори, які реагують на зміни показника заломлення рухомої фази.

Останнє, що важливо враховувати, – це в'язкість рухомої фази. Вона має бути якомога нижчою, оскільки високов'язкі розчинники погіршують дифузію та масоперенос, знижуючи ефективність колонки, збільшуючи перепад тиску та подовжуючи час розділення [5-6].

### **1.1.3. Детектори**

*Ультрафіолетові детектори* є одними з найпоширеніших методів в рідинній хроматографії. Це не руйнуючі прилади, які використовуються для вимірювання абсорбції ультрафіолетового або видимого світла компонентами елюйованої суміші з хроматографічної колонки. Процес детекції починається з пропускання зразка через прозору поточну камеру, яка зазвичай виготовляється зі скла. Потім ультрафіолетове світло направляється на цю камеру, і зразок взаємодіє зі світлом, поглинаючи його частину. Кількість зразка визначається шляхом вимірювання зміни інтенсивності

ультрафіолетового світла між рухомою фазою (без зразка) та фазою із зразком. Вибір відповідної довжини хвилі залежить від конкретного аналіту, оскільки він значно впливає на абсорбцію. Використання ультрафіолетових детекторів у ВЕРХ має важливе значення для багатьох галузей, таких як: фармацевтика, біотехнології, харчова промисловість, нафто-газова промисловість [7].

*Діодно-матричний детектор (DAD)* є універсальним інструментом для детекції в ВЕРХ. DAD служить для розділення та характеристики хімічних сумішей на основі їх хімічних і фізичних властивостей. Цей детектор надає простий спосіб встановлення складу зразка, що робить його основною технікою в ряді наукових досліджень, зокрема: аналіз навколишнього середовища, фармацевтика, харчові технології, нафтова промисловість, криміналістика. DAD став стандартним інструментом для контролю якості та ідентифікації забруднювачів. Він є важливим у тестуванні продуктів на наявність певних консервантів і добавок, що сприяє безпеці споживачів.

*Флуоресцентні детектори ВЕРХ* відомі своєю винятковою чутливістю та специфічністю порівняно з іншими типами детекторів ВЕРХ. Ці детектори працюють, вимірюючи випромінювання світла від збуджених атомів в аналізованій речовині, що дозволяє дослідникам отримувати цінну інформацію з розчину, зібраного з колони.[9]

Незважаючи на значно вищий рівень чутливості порівняно з іншими детекторами (від 10 до 1000 разів більший), його застосування обмежене аналізом флуоресцентних молекул, що робить цей метод менш часто використовуваним. У випадках, коли розчин не має природної флуоресценції, його все ще можна виміряти за допомогою флуоресцентного похідного. Флуоресцентні детектори особливо корисні при аналізі фармацевтичних препаратів (особливо коли йдеться про зразки з високим рівнем забруднень),

харчових продуктів, моніторингу навколишнього середовища, клінічних дослідженнях та аналізі нафти .

*ESI мас-детектор.* Процес іонізації електростатичним розпиленням здійснюється шляхом розпилення розчину зразка через капіляр із діаметром  $10^{-4}$  мм (зазвичай використовують плавлений кварц) у середовищі потужного електростатичного поля. Водночас у напрямку краплин подається потік гарячого азоту. Формування іонів проходить у три основні стадії:

1. Створення заряджених краплин у зоні виходу капіляра (рис. 1.1);
2. Випаровування розчинника з краплин за рахунок його нагрівання, що призводить до значного зменшення їх розміру;
3. Виникнення кулонівських вибухів, які сприяють подальшому розпилюванню краплин до дрібнодисперсного туману іонів, що спрямовуються до вхідного отвору мас-спектрометра.

Зарядження краплин досягається завдяки застосуванню високої напруги (приблизно 2–3,5 кВ). Протилежний електрод розташовується на вході мас-спектрометра. Іонізація відбувається в атмосфері інертного газу. Іноді для цієї технології використовують два капіляри: один із діаметром 100–500 мкм для транспортування зразка, а другий для створення електричного поля.

Мікроскопічні заряджені краплі утворюють потік іонів, який детектується мас-спектрометром, що дозволяє точно визначати співвідношення маси до заряду ( $m/z$ ). Завдяки високій чутливості та надійності метод іонізації електроспреєм широко застосовується для аналізу іонізованих сполук та іонів.[8]

Будова мас-детектора позначена на рисунку 1.1.

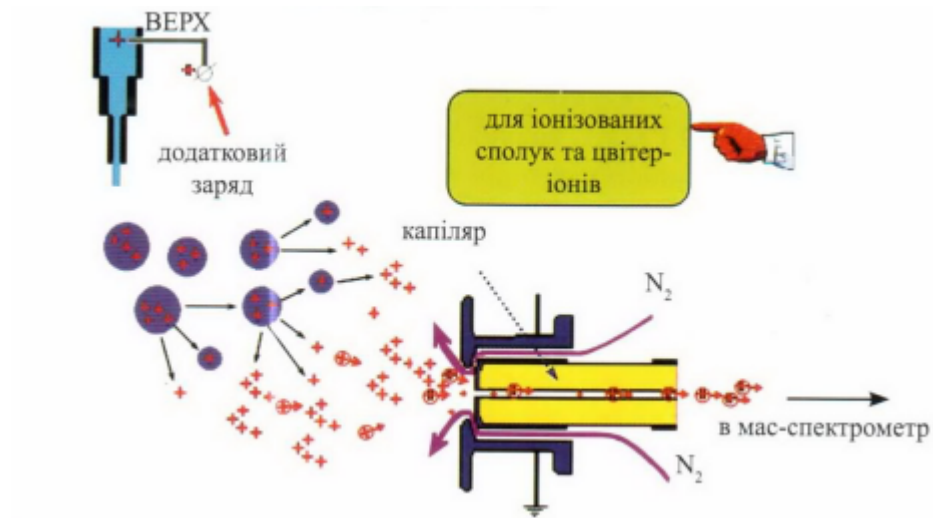


Рисунок 1.1.Будова ESI мас-детектора

Режими сканування в мас-спектрометрії.

Режим селективного іонного моніторингу (SIM) є методом мас-спектрометрії, який дозволяє вимірювати інтенсивність сигналу лише для обраних іонів з певними значеннями маси до заряду ( $m/z$ ). У цьому режимі мас-спектрометр працює як "фільтр", зосереджуючись лише на кількох іонах, які відповідають цікавим аналітам.

Переваги SIM:

1. Висока чутливість. Режим SIM дозволяє детектувати низькі концентрації речовин завдяки зниженню шуму, оскільки вимірюється лише обраний сигнал.
2. Висока специфічність. Метод фокусується лише на певних іонах, що допомагає уникати інтерференцій від інших речовин у зразку.

3. Застосування у кількісному аналізі. SIM широко використовується для визначення концентрацій цільових речовин, наприклад, у фармацевтичних препаратах або біологічних матрицях.

Однак SIM має обмеження, оскільки аналізуються лише заздалегідь обрані іони, тому нові, невідомі компоненти можуть залишитися непоміченими.

Сканування повного спектра (Full Scan). У цьому режимі мас-спектрометр "сканує" весь діапазон мас від найнижчого до найвищого значення  $m/z$ , заданого оператором. Результатом є мас-спектр, що відображає інтенсивності сигналів для всіх іонів у зазначеному діапазоні.

Переваги Full Scan:

1. Комплексний аналіз. Дозволяє визначати всі іони, що присутні у зразку, включаючи невідомі сполуки.
2. Використання у якісному аналізі. Метод застосовується для виявлення нових речовин, структурного аналізу або побудови бібліотек мас-спектрів.
3. Гнучкість. Можливість повторного аналізу спектра після збору даних для пошуку нових компонентів.

Однак сканування всього спектра має меншу чутливість порівняно з SIM через наявність шумів і розподіл сигналу на широкий діапазон мас [8,9,10,11].

#### 1.1.4. Режими елюювання

У літературі розглядаються порівняння властивостей ізократичного та градієнтного елюювання на прикладі зразків, які можна ефективно розділити за допомогою ізократичного методу. Градієнтне елюювання дозволяє значно зменшити час аналізу, при цьому забезпечуючи подібну роздільну здатність критичної пари компонентів, порівняно з ізократичним методом. Водночас, за обома методами не спостерігалось втрати повторюваності в таких параметрах, як час утримування, площа піка та висота піка.

Ізократичне елюювання, завдяки своїй простоті, є зручним для оптимізації, оскільки має меншу кількість змінних, які впливають на селективність, і, як правило, є менш вимогливим до інструментального забезпечення. Це робить метод привабливим для простих зразків, що складаються менш ніж з десяти компонентів, з слабо утримуваними складовими. Ізократичне елюювання також має перевагу у випадку меншої схильності до проблем з базовим шумом, що позитивно впливає на точність вимірювань. Однак, цей метод має обмежену здатність до розділення складних зразків з великим числом компонентів або з компонентами, що мають широкий діапазон утримування, що робить його менш ефективним у таких випадках.

Градієнтне елюювання, в свою чергу, забезпечує більшу селективність завдяки більшому числу змінних, що впливають на елюювання, таких як нахил градієнта, початкова сила елюенту та об'єм утримування. Це робить метод більш підходящим для обробки складних зразків, що містять понад десяти компонентів з різними значеннями утримування. Завдяки цим характеристикам, градієнтне елюювання здатне забезпечити кращу роздільну здатність і вужчі піки для пізніше елюйованих компонентів, що є важливим для якісного розділення. Однак, цей метод має свої недоліки. Зокрема, він потребує складнішого налаштування та регулярного обслуговування

обладнання. Крім того, інструментальні проблеми, такі як погане змішування елюентів або витоки в системі, можуть призводити до виникнення базового шуму та «привидів» піків, що ускладнює точність кількісного визначення компонентів.

Таким чином, можна зробити висновок, що ізократичне елюювання залишається оптимальним для простих зразків з малою кількістю компонентів, де утримання є слабким. У той же час, градієнтне елюювання є більш ефективним для складних багатоконпонентних зразків, де потрібна більша селективність та точність розділення. Однак для успішного застосування градієнтного елюювання необхідно враховувати можливі проблеми з обладнанням та складністю налаштувань, що потребує більшої уваги до оптимізації методів та регулярного обслуговування інструментів [12-14].

## **1.2. Параметри утримування у ВЕРХ**

Робити висновки щодо якості препаративної очистки речовин можна на основі порівняння параметрів утримування сполук та розрахованих значень критеріїв розділення.

Речовина в колонці розподіляється по певній довжині сорбента, що відповідає зонам, 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 [15].

Піки на хроматограмах характеризуються такими параметрами утримування як:

$t_R'$  [хв] — час утримування - час між введенням проби і максимальним відгуком детектора для відповідної сполуки ;

$V_R'$  [мл] — утримуваний об'єм - добуток часу утримування речовини на швидкість потоку рухомої фази;

$t_M'$  [хв] — нульовий час , за який проходить сполука, яка не утримується у хроматографічній колонці, від вузла введення проби до кювети детектора;

$V_M'$  [мл] — добуток часу нульового утримування речовини на швидкість потоку РФ (F); об'єм, що необхідний для заповнення пор сорбента і простору між його частинками в колонці;

А також іншими показниками, як:

- $t_R'$  [хв] — виправлений час утримування:  $t_R' = t_R - t_M$

$$(1.1)$$

- $V_R'$  [мл] — виправлений утримуваний об'єм:

$$V_R' = V_R - V_M = F \cdot (t_R - t_M). \quad (1.2)$$

- $k'$  [безрозмірна] — фактор ємності (утримування):

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} \quad (1.3)$$

Критерій розділення - кількісна оцінка роздільної здатності . Його обчислюють за формулою :

$$R_S = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (1.4)$$

де  $t_{R1}$  та  $t_{R2}$  - часи утримування першого та другого піків ,  $w_{b1}$  та  $w_{b2}$  - ширини цих піків при основі.

$R_S = 1$  - розділення задовільне (при цьому тил першого піку переходить у фронт другого );

$R_S < 1$  - розділення неповне;

$R_S > 1$  - розділення при нульовій лінії.

Критерії розділення через функціональні параметри колонки:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \left( \frac{k'}{1+k'} \right) \quad (1.5)$$

$k'$  - середнє арифметичне  $k_1$  і  $k_2$ .

$\frac{\sqrt{N}}{4}$  - міра ефективності системи

$(\alpha - 1)$  - міра селективності розділення

$$\alpha = k_2/k_1 = t_{R2}'/t_{R1}' \quad (1.6)$$

$\left( \frac{k'}{1+k'} \right)$  - міра утримуючої сили сорбенту

Критерій розділення зростає зі збільшенням ефективності колонки, що призводить до звуження піків. Підвищення селективності колонки збільшує час утримання одного з компонентів порівняно з іншим, що підвищує значення коефіцієнта розподілу  $k''$ , хоча інші параметри залишаються стабільними.

Найсуттєвіший вплив на критерій розділення має селективність, оскільки між ними існує лінійна залежність. Вплив ефективності на розділення менш значний, а зміна часу утримання компонентів майже не позначається на цьому параметрі [16-17].

### **1.3. Фактори що впливають на розділення в ВЕРХ**

#### **1.3.1. Адсорбційна рівновага**

Адсорбційна рівновага є одним із ключових факторів, що визначають ефективність і механізм розділення у високоефективній рідинній хроматографії. Вона описує динамічний процес розподілу молекул аналіту між рухомою фазою (мобільною) та нерухомою фазою (стаціонарною) у колонці. Успішне розділення компонентів суміші можливе завдяки різниці в їхній адсорбційній здатності до поверхні стаціонарної фази. Процес адсорбції відбувається на межі розділу фаз і залежить від природи аналіту, складу рухомої фази, типу стаціонарної фази та умов аналізу, таких як температура, тиск і рН. Адсорбційна рівновага досягається, коли кількість молекул, що адсорбуються на поверхні стаціонарної фази, дорівнює кількості молекул, що десорбуються у рухому фазу. Рівноважний розподіл аналіту між фазами описується коефіцієнтом розподілу, який визначається як відношення концентрації аналіту у стаціонарній фазі до його концентрації у рухомій фазі.

Розділення у ВЕРХ базується на різній швидкості руху молекул аналітів через колонку, що зумовлено їхньою адсорбційною здатністю. Речовини, які сильніше взаємодіють зі стаціонарною фазою, мають більший час утримування, тоді як молекули з меншою адсорбцією елюються швидше. Різниця у ступені адсорбції забезпечує селективність методу, а швидкість досягнення рівноваги між фазами визначає ефективність колонкового розділення. Повільна рівновага може спричинити розмиття піків, зниження роздільності та погіршення аналітичних характеристик методу [18].

Для опису адсорбційної рівноваги у ВЕРХ використовуються кілька моделей.

Лангмюрівська модель припускає утворення моношару молекул на поверхні стаціонарної фази і конкуренцію між молекулами аналіту за активні центри адсорбції.

Лангмюра-Фройндліхова модель враховує неоднорідність поверхні стаціонарної фази. Також існують моделі нелінійної адсорбції, які враховують вплив високих концентрацій аналіту на утримування.

Знання про адсорбційну рівновагу дозволяє оптимізувати метод ВЕРХ, змінюючи параметри, що впливають на розподіл аналітів. Зокрема, склад рухомої фази можна регулювати шляхом використання модифікаторів, буферів або градієнтного елюювання для контролю взаємодії між аналітом і стаціонарною фазою. Вибір стаціонарної фази з різними адсорбційними властивостями забезпечує досягнення необхідної селективності. Підвищення температури може знижувати адсорбційну здатність та прискорювати елюювання.

Отже, адсорбційна рівновага є фундаментальною основою розділення у ВЕРХ, яка визначає час утримування, селективність і ефективність аналізу. Розуміння та контроль цього процесу є ключовими для розробки стабільних і високочутливих методик хроматографічного аналізу [18].

### **1.3.2. Рідинна взаємодія**

Розділення в ВЕРХ базується на встановленні рівноваги між молекулами, що знаходяться в рухомій фазі, та тими, що залишаються у стаціонарній фазі. Природа цієї рівноваги може суттєво відрізнитися залежно від умов і характеристик фаз. Одним із типів рівноваги, що лежить в основі певних методів розділення, є рідинно-рідинний поділ. Цей процес передбачає розподіл певного компонента між двома незмішуваними рідинами, які умовно позначаються як «органічна фаза» та «водна фаза». У контексті ВЕРХ

роль рухомої фази найчастіше виконує органічний розчинник, а стаціонарною фазою виступає речовина, що нагадує рідину, іммобілізовану на поверхні твердого носія. [21]

Яскравим прикладом такої іммобілізованої рідини є вода, закріплена на поверхні кремнезему рисунок 1.3. У цьому випадку молекули води утримуються на твердому каркасі кремнезему завдяки водневим зв'язкам із силанольними групами, що знаходяться на поверхні матеріалу. Як рухому фазу найчастіше використовують органічні розчинники, наприклад, ацетонітрил, які забезпечують ефективне розділення компонентів.

У сучасній практиці ВЕРХ найчастіше застосовуються стаціонарні фази, що складаються з твердих носіїв, поверхня яких покрита зв'язаними фазами (рис. 1.3). Ці зв'язані фази, за своєю суттю, можна прирівняти до іммобілізованих рідин, що дозволяє використовувати теорію рідинно-рідинного поділу для опису рівноваги, яка виникає під час хроматографічного процесу. Такий підхід значно розширює можливості методу і забезпечує високу ефективність розділення для широкого спектра аналітів[22]

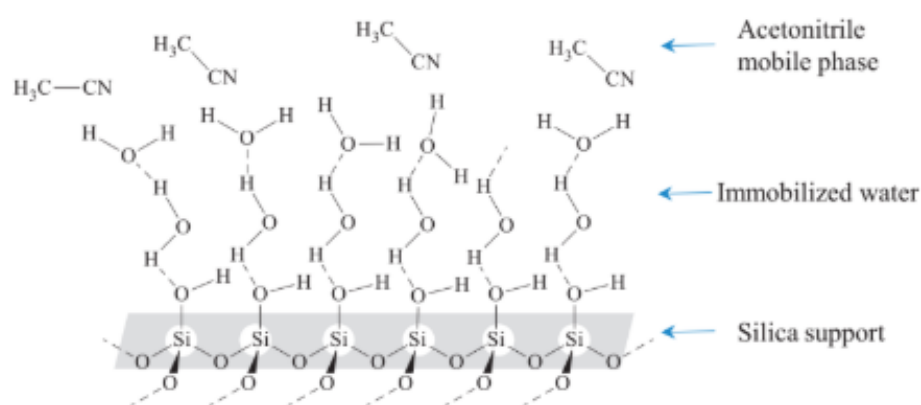


Рисунок 1.2 Схематичне зображення взаємодії рухомої та нерухомої фази.

### 1.3.3 Вплив рН

Регулювання рН рухомої фази є важливим інструментом для оптимізації розділення в рідинній хроматографії, особливо під час роботи з іонізованими сполуками. У випадку нейтральних молекул рН рухомої фази зазвичай не впливає на їх утримування, і порядок елюювання визначається лише гідрофобністю компонентів: більш полярні сполуки елюються швидше, ніж неполярні. Однак для кислот і основ зміна рН суттєво впливає на їхні характеристики утримування через зміну ступеня іонізації.

Кислоти при низьких значеннях рН перебувають у неіонізованій формі, що зменшує їх полярність і збільшує час утримування. При підвищенні рН кислоти іонізуються, стають більш полярними і менше утримуються у колонці. Основи, навпаки, краще утримуються за високого рН, коли вони знаходяться у нейтральній формі, а при зниженні рН, внаслідок іонізації, їх час утримування скорочується. Важливим параметром є значення  $pK_a$  сполук, яке визначає рН, за якого половина молекул перебуває у іонізованій формі, а половина — у неіонізованій.

Найбільші зміни в утримуванні спостерігаються в діапазоні  $\pm 1$  одиниці рН від значення  $pK_a$ , тоді як за межами  $\pm 2$  одиниць рН сполуки вважаються повністю іонізованими або неіонізованими. Це означає, що для регулювання часу утримування слід працювати в межах вузького діапазону рН поблизу  $pK_a$ . Водночас для забезпечення стабільності методу рекомендується, щоб рН рухомої фази було віддалене на 1,5 одиниці від  $pK_a$  аналізованих сполук, що знижує чутливість розділення до незначних змін рН.

Окрім впливу на утримування, рН рухомої фази також дозволяє змінювати селективність розділення. Якщо  $pK_a$  різних сполук у зразку значно відрізняються, зміна рН може призвести до помітної зміни взаємного розташування піків у хроматограмі. Наприклад, при розділенні заміщених анілінів оптимальне розділення досягається у межах рН 2–5,5. Однак

надмірне зниження або підвищення рН може призвести до втрати роздільності або пошкодження колонки.

Для стабілізації рН зазвичай використовують буферні розчини, ефективність яких залежить від їхнього  $pK_a$ , що має бути в межах  $\pm 1$  одиниці від бажаного рН. Наприклад, для рН 2–3 підходить фосфатний буфер ( $pK_a$  2,1), а для рН 5 – ацетатний буфер ( $pK_a$  4,8). Концентрація буфера зазвичай становить 20–30 мМ, хоча сучасні високоякісні кремнеземні колонки дозволяють використовувати концентрації 5–10 мМ.

Таким чином, контроль рН рухомої фази є критично важливим для забезпечення надійного та відтворюваного розділення. Правильний вибір буфера та вузький діапазон рН під час валідації методу дозволяють досягти стабільності та гнучкості у виконанні хроматографічного аналізу [23].

#### **1.3.4. Вплив температури**

Температура є важливим фактором, що впливає на процеси розділення у високоефективній рідинній хроматографії. Її зміна може суттєво вплинути на ефективність методу, селективність, час утримування аналітів і якість хроматографічного розділення.

Перш за все, температура впливає на в'язкість рухомої фази. Зі збільшенням температури в'язкість зменшується, що сприяє зниженню тиску в системі, прискорює проходження рухомої фази через колонку і зменшує час утримування аналітів. Це особливо важливо для аналізів із використанням густих рухомих фаз або колонок малого діаметра, де високий тиск може стати обмежувальним фактором.

Також температура впливає на адсорбційні властивості аналітів. З підвищенням температури зменшується енергія взаємодії між аналітами і

стаціонарною фазою, що призводить до зниження ступеня утримування. Таким чином, компоненти суміші елюються швидше, що може зменшити загальний час аналізу.

Ще одним важливим аспектом є вплив температури на селективність розділення. Оскільки різні аналіти мають різну термодинамічну поведінку, зміна температури може призводити до зміни коефіцієнтів розподілу між рухомою та стаціонарною фазами. Це дозволяє регулювати взаємне положення піків у хроматограмі та покращувати розділення важковідокремлюваних компонентів. Однак у деяких випадках зміна температури може призводити до погіршення селективності, тому її оптимальний рівень визначається експериментально.

Підвищення температури також сприяє зниженню ширини піків за рахунок покращення масопереносу аналітів між фазами. Це позитивно впливає на ефективність колонок і роздільність методу. Проте надмірне підвищення температури може пошкодити стаціонарну фазу, особливо якщо використовується силікагель, який деградує при високих температурах.

Температура також може впливати на стабільність аналітів. Деякі термолабільні сполуки можуть розкладатися при підвищеній температурі, що може викликати втрату аналіту або утворення додаткових піків на хроматограмі.

Таким чином, температура є потужним інструментом для оптимізації хроматографічного методу, але її необхідно використовувати з обережністю. Оптимальний температурний режим обирається залежно від властивостей аналітів, стаціонарної фази та рухомої фази, а також вимог до часу аналізу та роздільності. Контроль температури є важливим для забезпечення відтворюваності і стабільності результатів [19].

### 1.3.5. Вплив таутомерії на процес розділення у ВЕРХ

Таутомерія є динамічною рівновагою між двома або більше ізомерними формами однієї сполуки, які відрізняються розташуванням атомів і типом хімічного зв'язку, найчастіше через переміщення атома водню та зміну положення подвійного зв'язку. У високоефективній рідинній хроматографії це явище може значно впливати на розділення речовин і точність отриманих результатів. Найпоширенішими типами таутомерії є кето-енольна та прототропна рівновага, які зустрічаються в багатьох органічних молекулах, зокрема карбонових кислотах, кетонах, енолах та амідах

У ВЕРХ таутомерія може ускладнювати процес аналізу, оскільки різні таутомерні форми мають різну полярність, гідрофобність і здатність до взаємодії зі стаціонарною фазою. Це призводить до утворення кількох піків на хроматограмі навіть за аналізу однієї сполуки. Такі явища створюють труднощі в ідентифікації та кількісному аналізі, оскільки піки можуть перекриватися або змінювати свої співвідношення залежно від умов експерименту.

Умови проведення аналізу суттєво впливають на рівновагу між таутомерними формами. Значення рН рухомої фази є ключовим чинником, оскільки при низькому рН переважають протоновані форми, а при високому — депроновані. Температура також має значення: її підвищення прискорює перехід між формами, зменшуючи їхній вплив на розділення, хоча надто високі температури можуть призводити до деградації аналітів. Полярність стаціонарної фази визначає взаємодію з таутомерними формами, змінюючи час їх утримування.

Для мінімізації впливу таутомерії у ВЕРХ використовують оптимізацію рН рухомої фази, вибираючи таке значення, за якого одна з форм є домінуючою. Також застосовують температурну стабілізацію, яка зменшує швидкість переходу між формами, і спеціальні стаціонарні фази, розроблені

для кращого розділення таких сполук. Для підтвердження ідентичності та кількісного складу таутомерів часто комбінують ВЕРХ із додатковими аналітичними методами, такими як мас-спектрометрія.

Наприклад, під час аналізу  $\beta$ -дикетонів, таких як ацетилацетон, кето-енольна рівновага може спричиняти появу двох піків на хроматограмі. Їхнє розділення залежить від температури, складу рухомої фази та природи стаціонарної фази.

Отже, таутомерія є важливим фактором, який необхідно враховувати при розробці та оптимізації методів ВЕРХ. Знання про вплив рівноваги між формами дозволяє досягти точного розділення, що є критично важливим для аналізу органічних сполук, схильних до ізомеризації [23,24]

### **1.3.6. Полярність у ВЕРХ: основи та значення для хроматографічного розділення**

Полярність описує асиметричний розподіл заряду в молекулі, який призводить до утворення диполя. Цей параметр є критично важливим у хроматографічних процесах, оскільки впливає на взаємодію між аналітом, рухомою фазою та стаціонарною фазою. Полярність визначається на основі: наявності протилежних часткових зарядів у молекулі; фізичних властивостей, таких як розчинність у воді або розчинниках, змішуваних із водою; хімічних функціональних груп, таких як  $-\text{NH}_2$  чи  $-\text{COOH}$ .

Однак, розрахунок зарядової густини та визначення полярності є складними завданнями через динамічну природу розподілу зарядів у молекулі під час взаємодій. Поляризованість молекули, яка описує здатність до зміни розподілу зарядів у процесі взаємодії, також впливає на силу міжмолекулярних взаємодій, визначаючи такі властивості, як розчинність, адсорбція на поверхні та здатність до утворення водневих зв'язків.

Проте, визначення полярності – це не лише фіксоване поняття, адже під час молекулярних взаємодій розподіл зарядів може змінюватися. Це явище, відоме як поляризованість, означає здатність молекули адаптувати свою зарядову структуру під впливом зовнішніх чинників, що ускладнює чітку класифікацію сполук за рівнем полярності.

Протилежністю до полярного характеру є гідрофобність – фізична властивість молекул, які "відштовхуються" від води. Неполлярні сполуки, які не мають заряджених або полярних груп, не розчиняються у воді та не взаємодіють із її поверхнею. Гідрофобність відрізняється від ліпофільності, яка вказує на здатність молекули розчинитися у жирах або неполярних розчинниках.

Для характеристики полярності та гідрофобності часто використовують коефіцієнт розподілу між октанолом і водою ( $\log P$ ). Він відображає схильність сполуки до розподілу між водним і неполярним середовищем.  $\log P$  є експериментальним параметром, значення якого відоме для багатьох сполук. Для розрахунку  $\log P$  доступні численні комп'ютерні програми, що дозволяють отримувати теоретичні значення для нових молекул.

Полярність аналіту, рухомої фази та стаціонарної фази визначає основні механізми взаємодії у хроматографії. Полярні сполуки схильні до взаємодії з полярними фазами, тоді як неполярні – з гідрофобними. Саме це співвідношення взаємодій дозволяє досягти високої точності розділення у ВЕРХ.

Таким чином, розуміння полярності є ключовим фактором для оптимізації умов аналізу та підвищення ефективності хроматографічного розділення. У поєднанні з експериментальними даними та математичними моделями цей підхід забезпечує високий рівень контролю над процесом розділення [25].

## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Обладнання та реактиви

Для проведення хроматографічного розділення використовувалась високоефективна рідинна хроматографічна система Agilent 1260 infinity II, оснащена наступними компонентами:

1. Автосамплер — пристрій для подачі проб на колонку. Він забезпечує високу точність та повторюваність введення проб, що є критично важливим для стабільних результатів розділення.

2. Препаративний насос — здійснює подачу мобільної фази та її змішування в градієнтному режимі, забезпечуючи необхідний склад фази для ефективного розділення компонентів..

3. Насос підкачки — здійснює подачу проби на хроматографічну колонку.

4. Насос Make-up — подає розчин 0,1% мурашиної кислоти в метанолі до мас-детектора для забезпечення електроспрей іонізації.

5. Мас-детектор — необхідний для визначення молекулярного іону цільового продукту під час хроматографічного розділення, що дозволяє точно ідентифікувати компоненти та контролювати процес розділення на кожному етапі..

6. Діадо-матричний детектор — застосовується для виявлення та аналізу компонентів з різною хімічною природою, допомагаючи забезпечити додаткову селективність у визначенні елементів спектру.

7. Колектор фракцій — пристрій для збору окремих фракцій, що дозволяє ефективно розділяти компоненти, отримані в результаті хроматографії, для подальшого аналізу.

Елюювання проводилось при швидкості потоку 30 мл/хв. Нерухома фаза Chromatorex C18 19×100 мм, 3,5 мкм. Детектування здійснювалось на двох довжинах хвиль: 200 нм і 215 нм для забезпечення селективності та чутливості аналізу. Мас-спектрометричне детектування виконувалося в

режимі електроспрей-іонізації (ESI). Цей режим забезпечує ефективне іонізування молекул аналізованих речовин, що дозволяє отримати точні мас-спектральні дані для ідентифікації цільових сполук та їх домішок .

Відбір проби становить 200 мкл для режиму 0-100 та 500 мкл для звуженого значення градієнту. Час хроматографічної очистки становить 6,5 хв.

При виконанні експериментальної роботи використовувались такі розчинники:

- Метанол LC-MS grade, Sigma-Aldrich;
- Вода дистильована LC-MS grade, Honeywell;
- Ацетонітрил LC-MS grade, Agilent Technologies;
- Диметилсульфоксид LC-MS grade, Agilent Technologies.

Усі розчинники мали ступінь чистоти, достатній для використання в аналітичній хімії, та були підібрані з урахуванням специфічних умов проведення хроматографічного розділення.

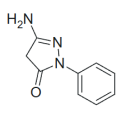
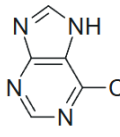
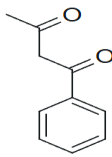
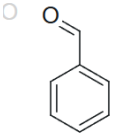
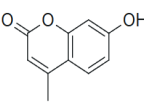
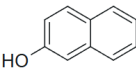
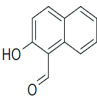
Перша частина експериментальної роботи була спрямована на оптимізацію хроматографічного розділення сполук із різною хімічною будовою та різними значеннями  $\log P$  з метою виявлення закономірностей в умовах елюювання, які б дозволили передбачати склад градієнта рухомої фази та досягати ефективного розділення. Значення  $\log P$  для речовин змінювалися зі збільшенням на 0,5 між сусідніми сполуками, що забезпечувало різницю у взаємодії з фазами хроматографічної системи.

Друга частина експериментальної роботи полягала у дослідженні розділення речовин із однаковим значенням  $\log P$ , але різною хімічною будовою, з метою довести, що умови розділення в першу чергу залежать від значення  $\log P$ , а будова речовини залишається другорядним фактором. Така ситуація є однією з найскладніших у препаративній хроматографії, оскільки

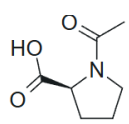
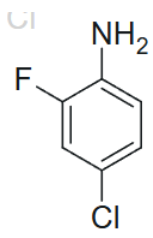
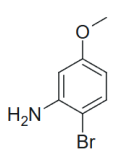
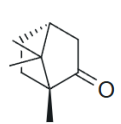
однакове значення  $\log P$  означає подібну взаємодію з фазами, а відмінності у хімічній структурі можуть бути недостатніми для досягнення високої селективності розділення.

В табл. 2.1 – 2.4 наведено структурні формули та фізико-хімічні характеристики сполук, що використовували в дослідженні.

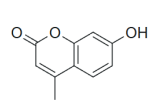
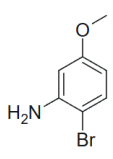
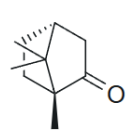
Таблиця 2.1 Характеристика речовин для першого експерименту

Позначка	Структура	М.в., г/моль	$\log P$ [26]	m наважки, г
R1		175	-0.03	0.55512
R2		154	0.51	0.7035
R3		162	1.09	0.6252
R4		106	1.45	0.7299
R5		176	2.12	1.08
R6		144	2.64	0,8142
R7		172	2.90	1.002

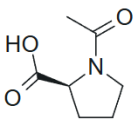
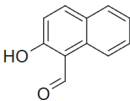
Таблиця 2.2 Характеристика домішок для першого експерименту

Позначка	Структура	М.в., г/моль	log P [26]	m наважки, г
D1		157	-0.37	1.4715
D2		145	2.00	1.8302
D3		201	2.13	1.08
D4		152	2.18	1.0902

Таблиця 2.3 Характеристика речовин для другого експерименту

Позначка	Структура	М.в., г/моль	log P [26]	m наважки, г
A1		176	2.12	1.08
A2		201	2.13	1.5025
A3		152	2.18	1.0902

Таблиця 2.4 Характеристика домішок для другого експерименту

Позначка	Структура	М.в., г/моль	log P [26]	m наважки , г
B1		157	-0,37	1.4715
B2		172	2.90	1.002

## 2.2 Методики експерименту

### 2.2.1 Градієнтна сітки методів

В табл. 2.5 наведено градієнтну сітку, що використовувалась в методах 0-100.

Таблиця 2.5 Градієнтна сітка для методу 0-100 [27].

Час, хв	A %	B ,%	Швидкість потоку, мл/хв
0	100	0	30
1,3	100	0	30
1,31	100	0	30
5,3	0	100	30
5,31	0	100	40
6,4	0	100	40
6,5	100	0	30

В табл. 2.6 наведено градієнтну сітку, що використовувалась в методі 30-80 система метанол/вода.

Таблиця 2.6 Градієнтна сітка для методу 30-80 метанол-вода.

Час, хв	А %	В ,%	Швидкість потоку, мл/хв
0	77	23	30
1,3	77	23	30
1,31	70	30	30
5,3	20	80	30
5,31	0	100	40
6,4	0	100	40
6,5	77	23	30

В табл. 2.7 наведено градієнтну сітку, що використовувалась в методі 30-55 система ацетонітрил-вода.

Таблиця 2.7 Градієнтна сітка для методу 30-55 ацетонітрил-вода.

Час, хв	А %	В ,%	Швидкість потоку, мл/хв
0	77	23	30
1,3	77	23	30
1,31	70	30	30
5,3	45	55	30
5,31	0	100	40
6,4	0	100	40
6,5	77	23	30

Градiєнтні режими, що застосовувалися в дослідженні, були розроблені на основі даних із таблиць 2.6 та 2.7, які містять параметри для метанолу та ацетонітрилу відповідно, шляхом варіювання вмісту органічного розчинника в елюенті. До часу 1,31 хв вміст органічного розчинника знижено на 7%, що пов'язано з вимиванням проби диметилсульфоксидом (ДМСО), який має більшу полярність. З часу 1,31 хв вміст органічного розчинника змінюється відповідно до необхідних параметрів і досягає кінцевого значення на 5,3 хв.

У рамках експерименту було використано такі градієнти концентрацій органічної фази:

Для ацетонітрилу:

- 5–30%
- 10–35%
- 15–40%
- 20–45%
- 25–50%
- 30–55%
- 35–60%.

Для метанолу:

- 15–65%
- 20–70%
- 25–75%
- 30–80%
- 35–85%
- 40–90%
- 50–100%.

## 2.2.2 Пробопідготовка зразків

Процес пробопідготовки зразків включав кілька етапів, спрямованих на забезпечення повного розчинення речовин і підготовку сумішей для хроматографічного аналізу.

Наважки речовин, зазначені в табл. 2.1-2.4, зважувались на аналітичних вагах з точністю до 0,0001 г. Кожна наважка речовини розчинялась у 15 мл диметилсульфоксиду (ДМСО), а домішка в 6 мл ДМСО. Для забезпечення повного розчинення проба перемішувалась за допомогою магнітної мішалки протягом 10–15 хвилин. У разі наявності нерозчинних частинок розчин піддавався ультразвуковій обробці протягом 5 хвилин, після чого фільтрувався через мембранний фільтр із розміром пор 0,22 мкм.

Після отримання маточного розчину здійснювалось приготування робочих сумішей. Для цього 700 мкл розчину речовини в ДМСО (табл. 2.1, 2.3) змішували з 150 мкл розчину домішки (табл. 2.2, 2.4). Суміш ретельно перемішували для досягнення однорідності.

Підготовлені зразки зберігались у герметичних пробірках при температурі +4°C до моменту проведення аналізу.[20]

## 2.3 Результати та обговорення

### 2.3.1 Оптимізація процесу препаративної очистки сполук з різними значеннями $\log P$

Ми обрали значення  $\log P$  у якості характеристики органічної сполуки, яку можна використовувати для вибору оптимальних умов елюювання. Для проведення дослідження обрали набір тестових речовин та домішок (табл.

2.1-2.2) таким чином, щоб значення  $\log R$  змінювалось на 0,5 одиниць між сусідніми сполуками. Набір містив сполуки різні за своєю будовою.

Метою було показати можливість використання даних щодо гідрофобності речовин для швидкого визначення оптимальних умов елюювання, які б забезпечували максимальну селективність та відтворюваність результатів при мінімальних затратах часу. Дослідження було проведено для двох рухомих фаз, що найчастіше використовуються у препаративній хроматографії – метанол/вода та ацетонітрил/вода.

Розпочато було з випробування у ізократичному режимі елюювання, який зазвичай використовується для простих систем або зразків із великими відмінностями у фізико-хімічних властивостях компонентів. Однак результати аналізу показали, що обраний ізократичний режим не забезпечує достатнього розділення речовин від домішок, що було обумовлено близькими значеннями  $\log R$  та складністю хімічних структур [28].

Градiєнтний режим дозволяє поступово змінювати склад рухомої фази, що створює більш гнучкі умови для поділу компонентів зі схожими фізико-хімічними характеристиками. Як стартову точку було обрано широкий градієнт у діапазоні 0–100% органічного розчинника, що дозволило визначити загальний діапазон елюювання компонентів системи.

Елюювання у режимі 0–100% розглядалося як пробний запуск, який міг бути реалізований завдяки високій чутливості хроматографа. Основною метою цього етапу було отримання базової інформації про поведінку компонентів у градієнтному режимі. Цей режим дозволив оцінити розподіл речовин за часом утримання, а також визначити, в яких межах складу органічного компонента фази відбувається елюювання.

Виходячи з отриманих результатів пробного градієнтного елюювання, було підібрано більш вузький і специфічний градієнт для подальшої роботи. Оптимізація полягала у коригуванні діапазону градієнта, зменшенні його

ширини та адаптації швидкості зміни складу рухомої фази для досягнення ідеального розділення.

На рис. 2.1 та 2.2 наведено приклад елюювання в режимі 0-100 для суміші R1+D1+D2, рухома фаза ацетонітріл-вода та метанол-вода

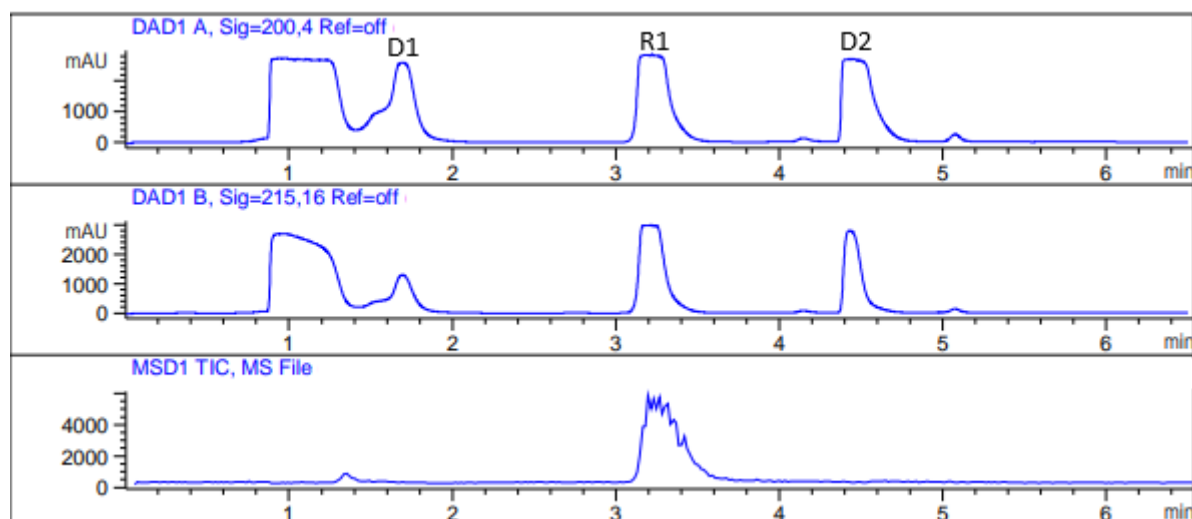


Рисунок 2.1. Хроматограми для суміші речовин R1+D1+D2 у режимі 0-100, система ацетонітріл-вода.

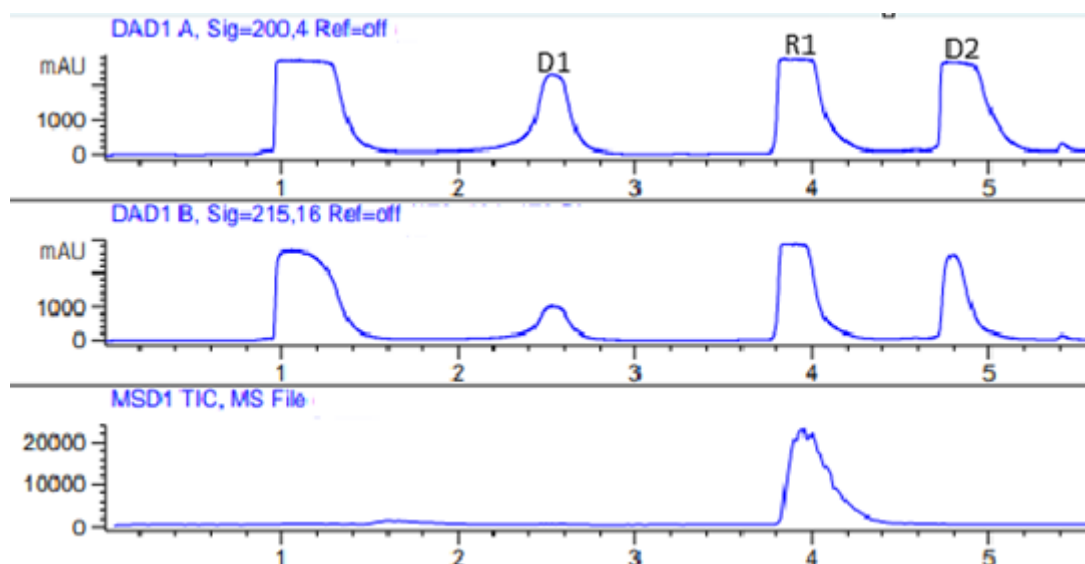


Рисунок 2.2 Хроматограми для суміші речовин R1+D1+D2 у режимі 0-100, система метанол-вода.

Виходячи з результатів тестового заколу за методом 0–100, де використовувалися фази метанол-вода та ацетонітрил-вода, було проведено детальний аналіз хроматограм, що дозволило оптимізувати градієнт. З рисунків видно, що домішки D1 та D2 розділяються із речовиною R1, але в обох випадках є можливість скоротити час аналізу і, відповідно, витрату розчинників.

Для розділення суміші R1+D1+D2 були досліджені різні градієнтні режими: 5-55, 10-60, 15-65, 20-70 для метанолу та 0-25, 5-30, 10-35, 15-40 для ацетонітрилу. Аналогічні дослідження були виконані для інших сумішей, що дозволило визначити оптимальні градієнтні параметри для кожного випадку. На рисунку 2.3 наведено хроматограму методу 5-55 для метанолу, яка демонструє низьку ефективність розділення цільової речовини від домішок і затримку елюювання компонентів, що підтверджує його непридатність для аналізу.

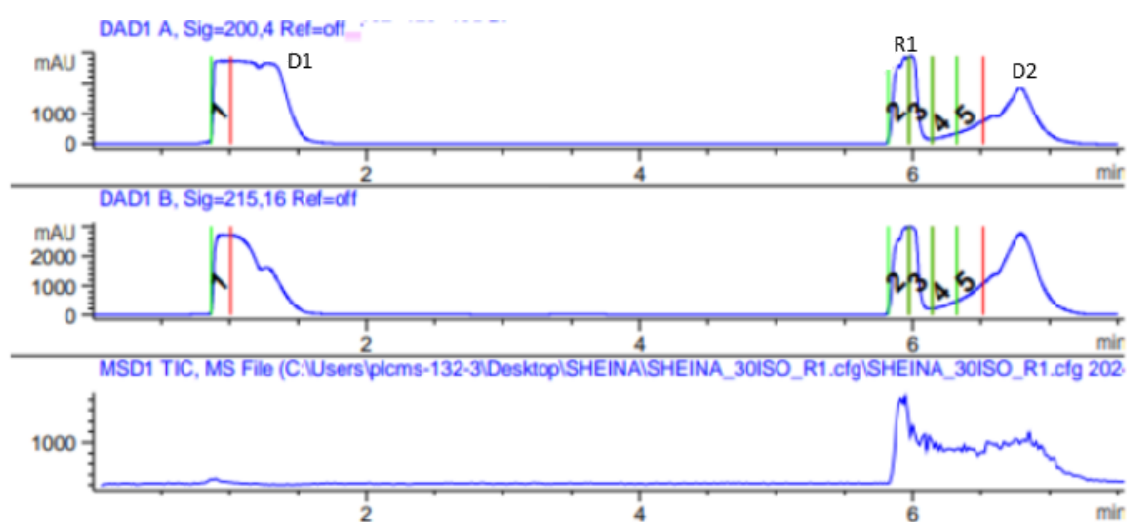


Рисунок 2.3. Хроматограми для суміші речовин R1+D1+D2 у режимі 5-55, система метанол-вода.

Зокрема, для ацетонітрилу було встановлено градієнт 5–30%, а для метанолу — 15–65% рисунок 2.3 та 2.4. Цей вибір градієнта був обґрунтований

результатами попереднього тестування, яке дозволило зрозуміти динаміку елювання та розподіл компонентів на колонці.

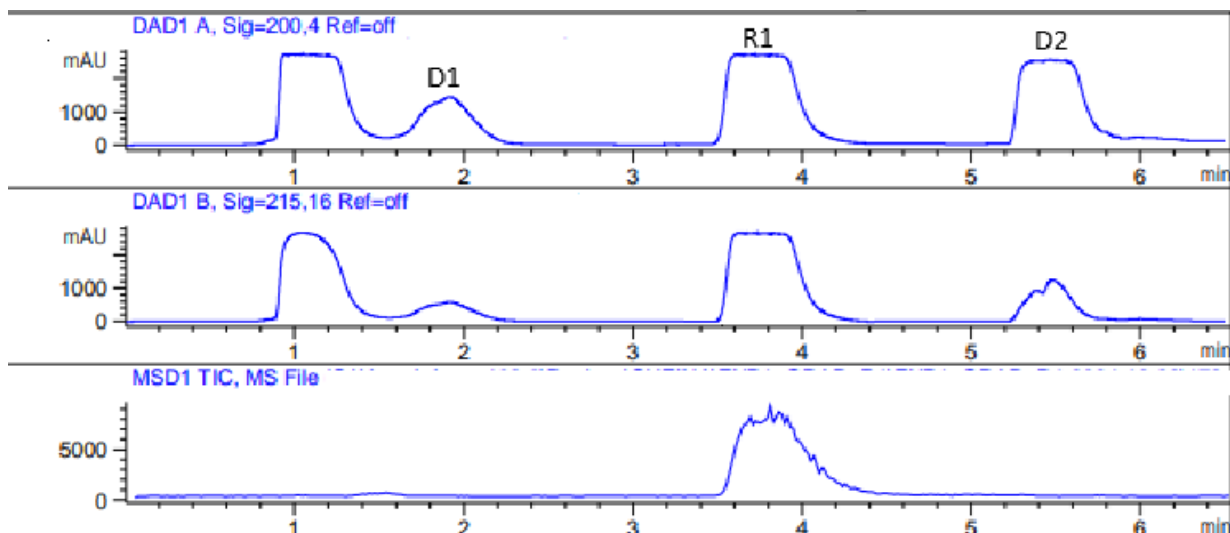


Рисунок 2.4. Хроматограми для суміші речовин R1+D1+D2 у режимі 5-30, система ацетонітрил-вода.

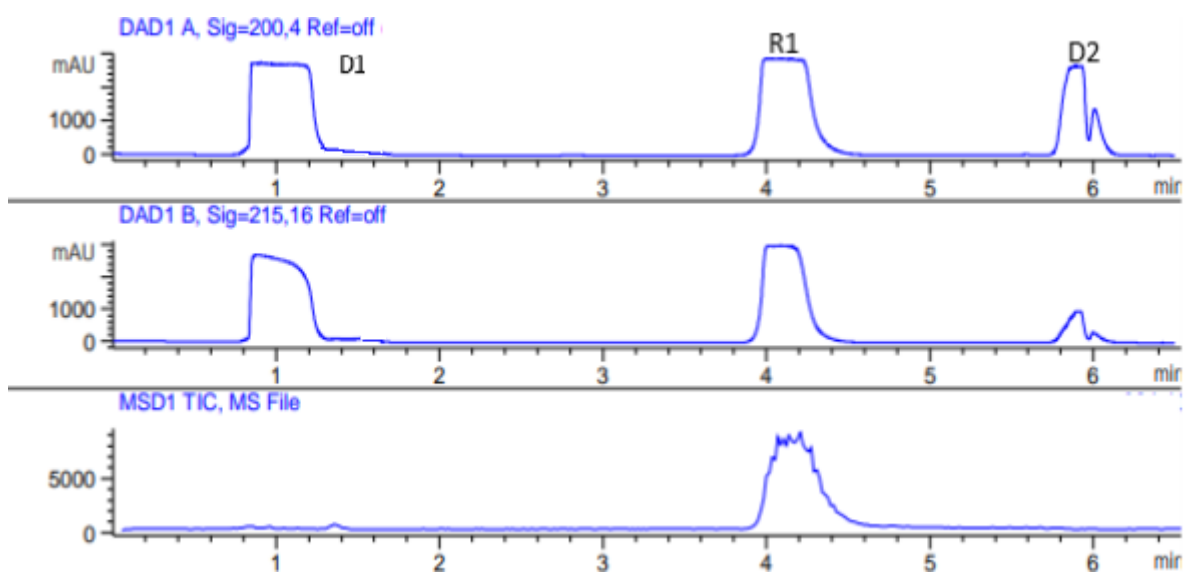


Рисунок 2.5. Хроматограми для суміші речовин R1+D1+D2 у режимі 15-65, система метанол-вода.

Після аналізу хроматограм, рис. 2.3-2.4, та детального порівняння піків, було встановлено, що піки домішок тепер знаходяться значно окремо від піку цільової речовини. Це свідчить про ефективне розділення компонентів, що є

важливим фактором для досягнення необхідної чистоти продукту. Крім того, ефективність розділення підтверджується наявністю інтенсивного сигналу МІ, що вказує на високий рівень чутливості та точності методу.

Такий результат демонструє успішне налаштування градієнтного режиму та ефективність використання обраних фаз для розділення складних сумішей.

Отже, проведений аналіз підтверджує правильність вибору градієнта та його здатність забезпечити високу ефективність розділення, що є основою для подальших експериментів у препаративній хроматографії.

Для суміші компонентів R6, D5 та D1 було проведено елюювання в градієнтному режимі 0–100% органічної фази, використовуючи дві різні системи розчинників: ацетонітрил–вода та метанол–вода. Отримані хроматограми продемонстрували особливості розділення компонентів у кожній із систем, що відображено на рисунках 2.5 та 2.6 відповідно.

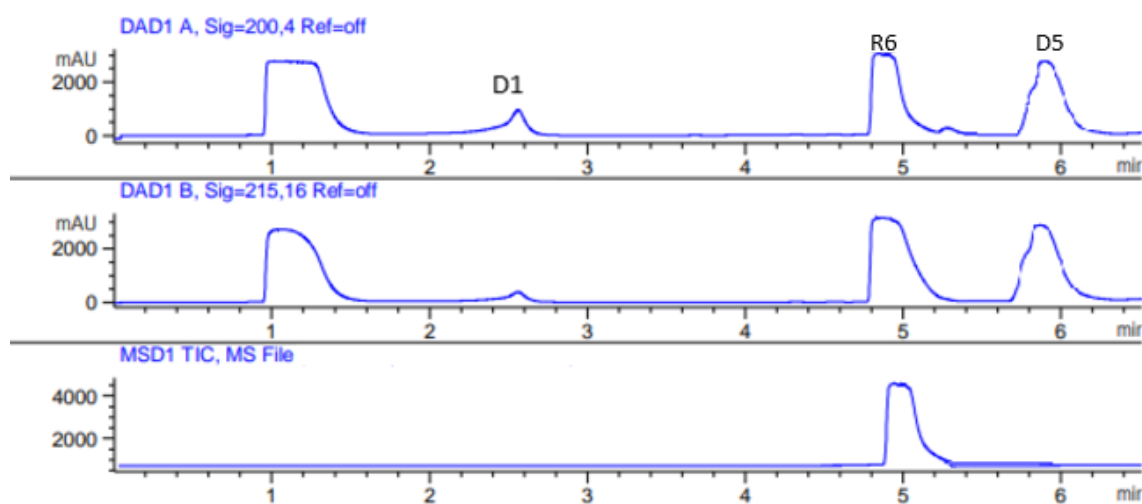


Рисунок 2.6 Хроматограми для суміші .R6+D5+D1 режим 0-100 система метанол-вода.

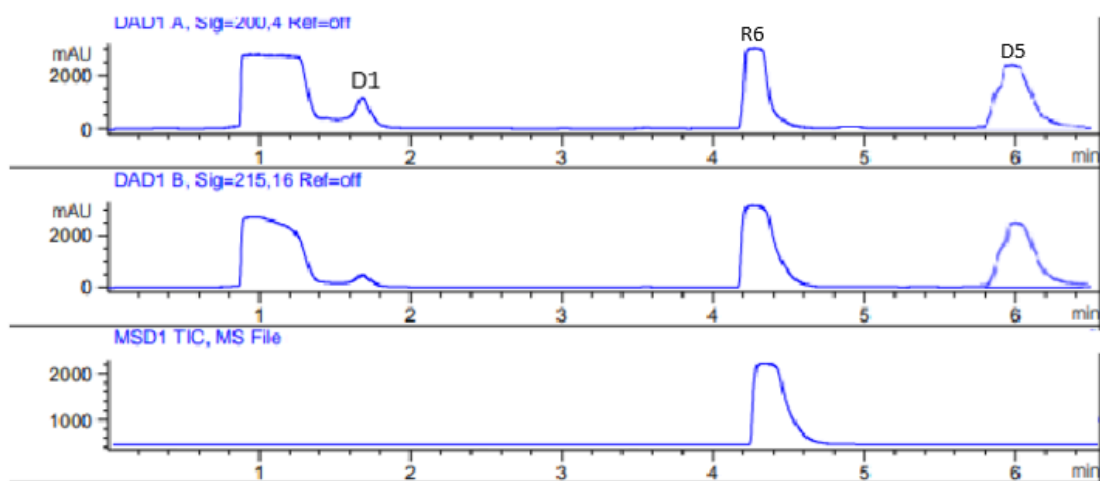


Рисунок 2.7. Хроматограми для суміші R6+D1+D5 режим 0-100 система ацетонітрил-вода 0-100.

Після встановлення оптимальних градієнтів, а саме 30–55% для ацетонітрилу та 40–90% для метанолу, домішка D1 перестала реєструватися окремо, оскільки її елювання збіглося з елюванням диметилсульфоксиду (ДМСО) на першій хвилині рисунок 2.7 та 2.8. Такий результат вказує на те, що обрані градієнти забезпечують ефективну комбінацію умов, при яких домішка не виділяється окремо, що сприяє очищенню основної речовини.

Крім того, після встановлення оптимальних умов вдалося суттєво змістити пік основної речовини (R6) подалі від піка речовини D5. Це досягнення підтверджує, що обраний градієнт забезпечує не лише оптимальну селективність, а й належний рівень розділення компонентів. Такий підхід дозволяє мінімізувати взаємні накладання піків, що є важливим для отримання чистого продукту та підвищення ефективності препаративного розділення.

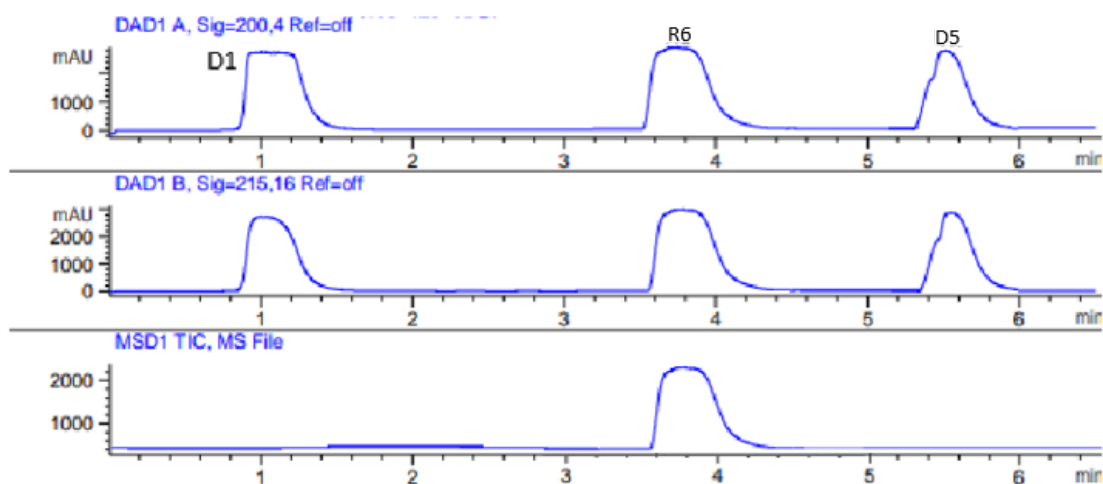


Рисунок 2.8. Хроматограми для суміші R6+D5+D1 режим 40-90 система метанол -вода.

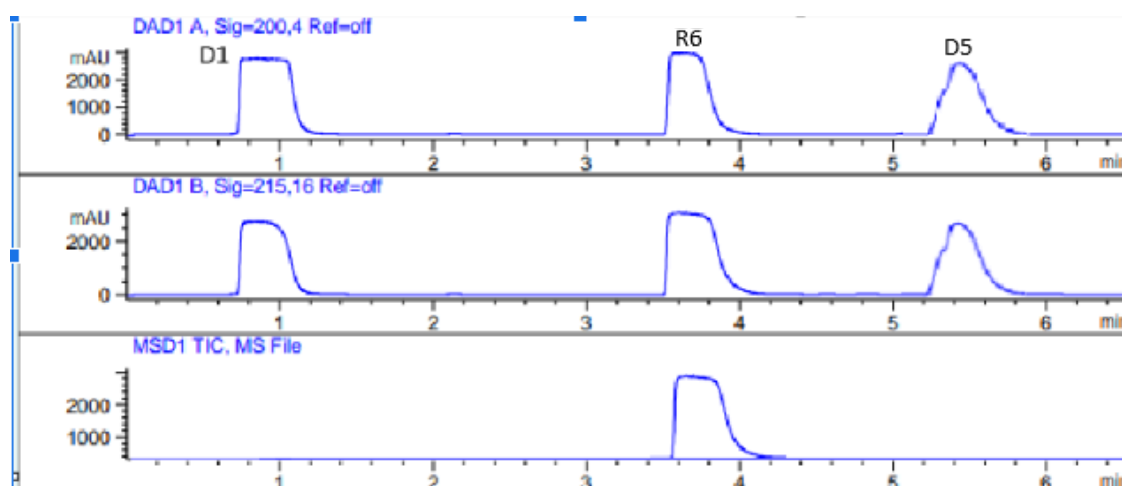


Рисунок 2.9. Хроматограми для суміші R6+D5+D1 режим 30-55 система ацетонітрил-вода.

На тестовому методі 0–100 для суміші R4+D2+D1 рисунок 2.9 було отримано нерівномірне розділення піку основної речовини R4 та домішки D2, що вказує на недостатню селективність таких умов для ефективного розділення. Піки цих компонентів накладалися, що ускладнювало ідентифікацію та подальшу обробку основної речовини.

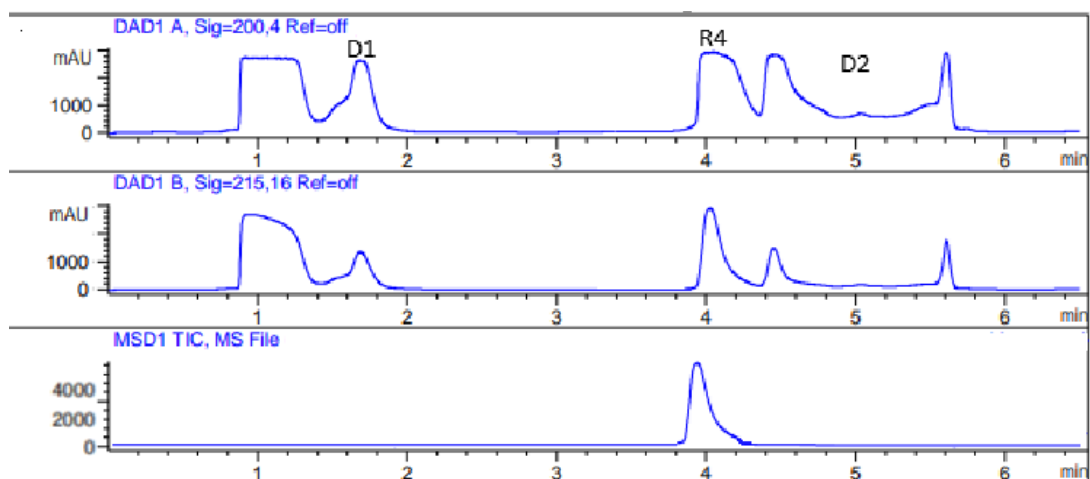


Рисунок 2.10. Хроматограми для сумішей R4+D2+D1 режим 0-100 система ацетонітрил-вода .

Після аналізу отриманих хроматограм та врахування характеристик системи, було обрано градієнт 20–45%, який показав значно кращі результати рисунок 2.10. При цих умовах вдалося досягти чіткого розділення основної речовини R4 від домішки D2, що підтверджує оптимальність даного градієнта для цієї системи.

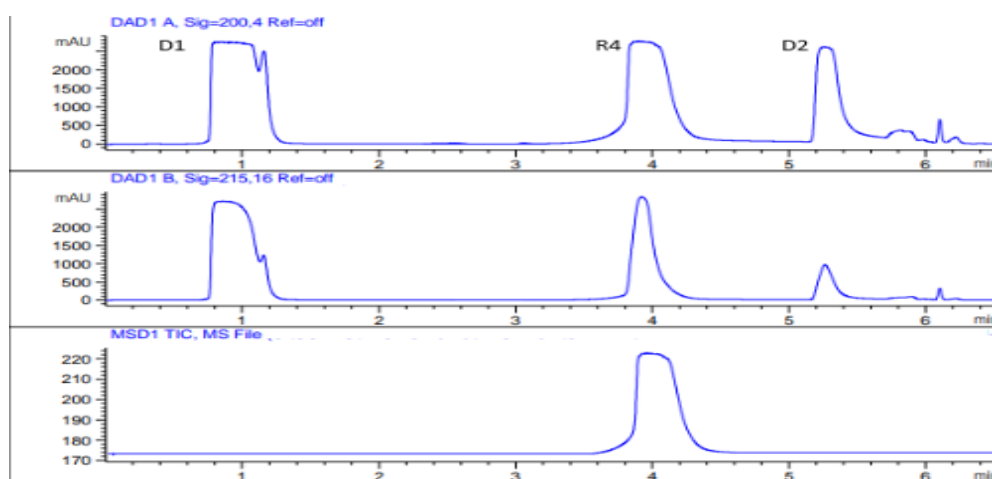


Рисунок 2.11 . Хроматограми для суміші R4+D2+D1 режим 20-45 система ацетонітрил-вода .

Окрім цього, у зазначеному градієнті домішка D1 елюювалася одночасно з диметилсульфоксидом (ДМСО), що забезпечувало додаткове очищення проби. Таким чином, нові умови дозволили не лише досягти високої

ефективності розділення цільової речовини, але й значно спростити роботу з домішками, зменшуючи їх вплив на хроматографічний аналіз.

Виходячи з того, що всі вищеописані етапи експерименту були реалізовані для всіх речовин, використаних у дослідженні, їх результати для зручності були структуровані та подані у вигляді таблиці 2.8. Проведений аналіз отриманих хроматографічних даних дозволив встановити чітку закономірність: зі збільшенням значення  $\log P$  на 0,5 спостерігається зростання частки органічної фази в градієнтному елююванні приблизно на 5%. Ця тенденція була зафіксована незалежно від того, який саме органічний розчинник використовувався, — метанол чи ацетонітрил. Подібна узгодженість свідчить про універсальність закономірності, що може бути корисною у розробці ефективних методів очищення.

Застосування градієнтного режиму 0–100% у цьому експерименті відіграло ключову роль у початковій оцінці роздільної здатності системи. Такий тестовий запуск дозволяє швидко отримати базові дані про час утримання речовин, їх взаємну поведінку та потенціал розділення. Висока чутливість використовуваного хроматографа дає змогу працювати з мінімальними об'ємами проби, що є важливим фактором у випадках, коли кількість доступного матеріалу обмежена або потрібно забезпечити високу точність вимірювань.

На хроматограмах, отриманих у градієнтному режимі 0-100, спостерігається добре розділення компонентів суміші. Проте цей підхід має значні обмеження при аналізі складних багатокомпонентних систем. Широкий градієнтний діапазон збільшує споживання розчинників і не завжди дозволяє досягти оптимального розділення речовин з подібними властивостями, особливо коли у складі суміші є речовини з близькими коефіцієнтами розподілу.

Натомість звужені градієнти, використані в цьому дослідженні, виявилися більш ефективними. Вони забезпечують оптимальне розділення завдяки вузьким значенням градієнту, які дозволяють точно контролювати взаємодію компонентів з нерухомою фазою. Крім того, такі режими значно знижують витрату органічних розчинників, що зменшує витрати на аналіз та зменшує екологічне навантаження. Це робить їх більш придатними для роботи з багатокомпонентними сумішами, де потрібна висока селективність і чіткість розділення.

Таким чином, звужені градієнтні режими не лише демонструють кращу ефективність, але й підвищують відтворюваність та економічність процесу, що є важливими аспектами для препаративної хроматографії.

Отримані дані стали основою для визначення оптимальних умов елюювання. Для кожного випадку градієнти були уточнені, щоб досягти максимально чіткого розділення цільової речовини від домішок. Результати показали, що запропонована методика є не лише ефективною для досягнення високої чистоти продукту, але й дозволяє скоротити час та зусилля на пошук робочих умов для нових речовин.

Важливо відзначити, що підхід, заснований на тестових запусках і використанні отриманих результатів, може слугувати стартовою точкою для розробки градієнтів у подальших дослідженнях. Зокрема, для речовин із близькими значеннями  $\log R$  дані цього експерименту можуть бути застосовані як шаблон для визначення початкових умов. Це робить метод універсальним і придатним до застосування у широкому спектрі задач препаративної хроматографії.

Отже, результати проведеного експерименту підтверджують доцільність використання градієнтного елюювання як ключового етапу в очищенні речовин. Проста та ефективна методика тестових запусків не лише скорочує час оптимізації, але й забезпечує високу точність і передбачуваність

результатів, що є необхідним для успішного виконання задач препаративного рівня.

Таблиця 2.8 Оптимальні умови хроматографування сумішей речовин із різними значеннями  $\log P$

Назва	$\log P$	Гرادієнтний метод	
		Ацетонітрил/вода	Метанол/вода
R1+D1+D2	-0.03	5-30	15-65
R2+D1+D2	0.51	10-35	20-70
R3+D1+D2	1.09	15-40	25-75
R4+D1+D2	1.45	20-45	30-80
R5+D1+D4	2.12	25-50	35-85
R6+D1+D5	2.64	30-55	40-90
R7+D1+D5	2.90	35-60	50-100

### 2.3.2 Хроматографічне розділення сполук однакової гідрофобності та різною молекулярною структурою

Метою експерименту було показати незалежність обраних умов розділення, а саме, зміни концентрації розчинника, від хімічної будови органічної речовини. Для цього було обрано тестовий набір речовин (табл. 2.3-2.4) з близькими значеннями  $\log P$ , але різною хімічною будовою.  $\log P$  обраних речовин становив 2.12, 2.13 та 2.18. Для домішок були обрані речовини з  $\log P$ , які суттєво відрізнялися: одна домішка мала  $\log P$  -0.367, що відповідає високій полярності, інша — 2.9, що вказує на вищу гідрофобність.

На основі результатів першого експерименту, в якому досліджувалася речовина із  $\log P$  2.12, було встановлено, що обраний режим градієнтного елюювання забезпечує ефективне розділення компонентів. Це стало підставою для застосування аналогічного режиму для дослідження речовин із близькими значеннями  $\log P$ , а саме 2.12, 2.13 та 2.18. Вибір такого підходу дозволяє перевірити, чи зберігається ефективність розділення для сполук зі схожими гідрофобними властивостями, але з певними відмінностями у хімічній будові, такими як наявність різних функціональних груп, ступінь розгалуження або кількість ароматичних фрагментів у молекулах.

Дослідження таких параметрів є важливим для визначення впливу хімічної будови на взаємодію молекул із стаціонарною фазою та органічними розчинниками. Це також допомагає оцінити, наскільки універсальним є обраний градієнтний режим для речовин із подібними фізико-хімічними властивостями, але різною структурою, що є ключовим для розробки ефективних умов препаративного хроматографічного розділення.

На основі отриманих хроматограм рисунки 2.11-2.18 для досліджуваних речовин можна зробити висновок, що для сполук з однаковою ліпофільністю, але різною хімічною будовою, можливо використовувати єдиний метод градієнтного елюювання. Ми успішно досягли ефективного розділення цільової речовини від домішок для всіх протестованих речовин.

Проте час виходу для кожної речовини був різним, що пояснюється особливостями взаємодії молекул із стаціонарною фазою. Основну роль у цьому відіграють фактори, такі як здатність молекул утворювати водневі зв'язки, ступінь полярності функціональних груп, а також просторові характеристики молекул, що впливають на їх проникність у пори стаціонарної фази. Крім того, внесок можуть робити відмінності у електростатичних взаємодіях і силах дисперсії, характерних для кожної конкретної речовини.

Ці результати підтверджують, що навіть за однакового  $\log p$  хімічна будова суттєво впливає на поведінку речовин у системі поділу, однак обраний градієнтний метод залишається ефективним для досягнення чіткого розділення. Це підкреслює універсальність підходу для роботи з хімічно різнорідними сумішами.

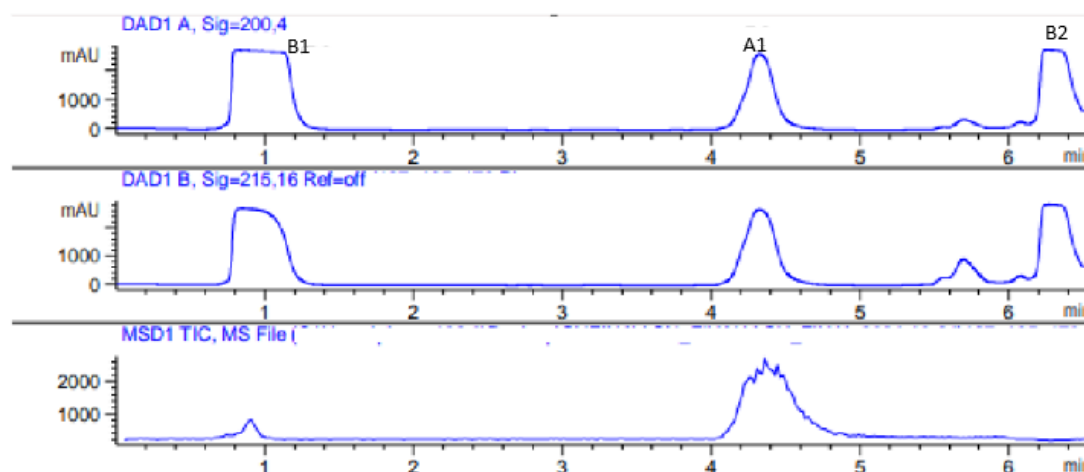


Рисунок 2.12 . Хроматограми для суміші A1+B1+B2 режим 25-50 система ацетонітрил-вода.

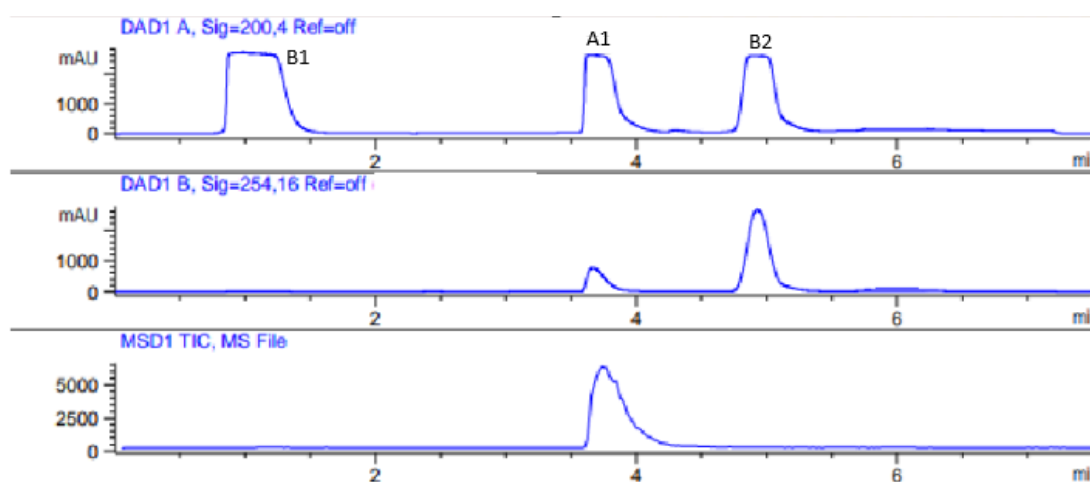


Рисунок 2.13. Хроматограми для сумішей A1+B1+B2 режим 35-85 система метанол-вода.

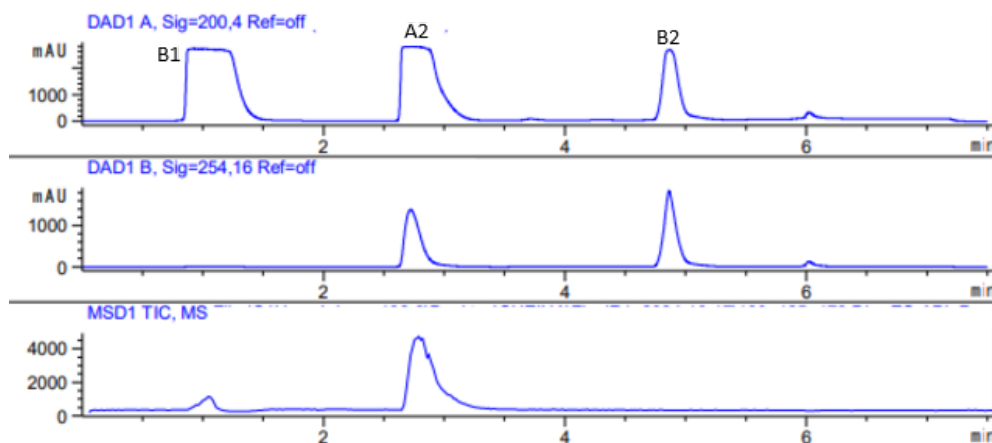


Рисунок 2.14. Хроматограми для суміші A2+B2+B1 режим 35-85 система метанол-вода.

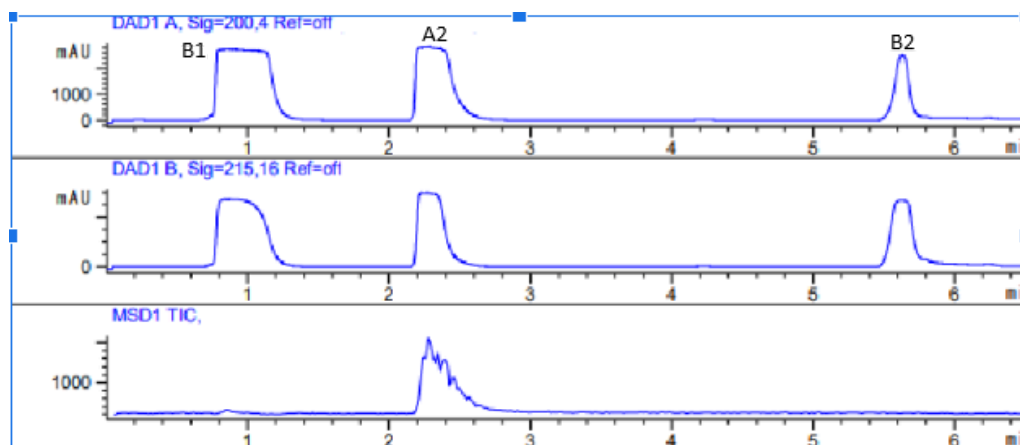


Рисунок 2.15. Хроматограми для суміші A2+B2+B1 режим 25-50 система ацетонітрил-вода.

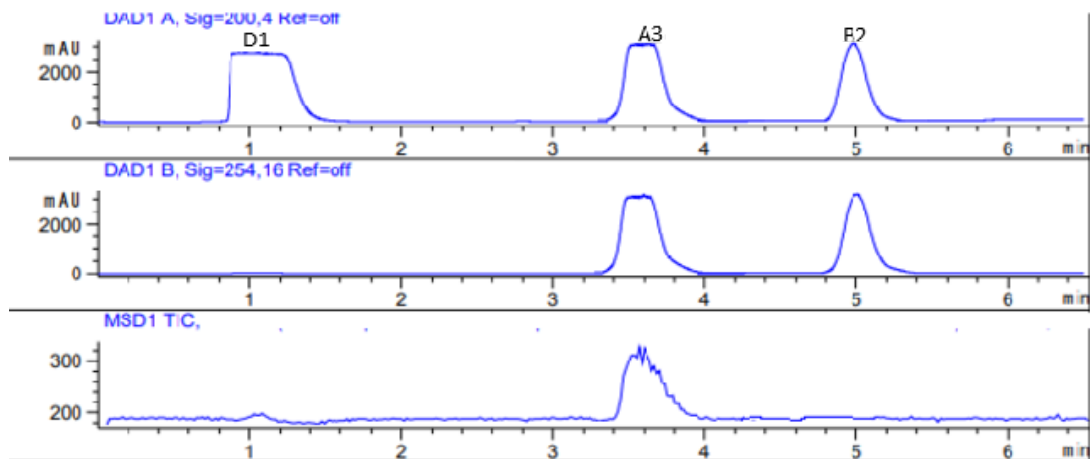


Рисунок 2.16. Хроматограми для суміші A3+B2+B1 режим 35-85 система метанол-вода .

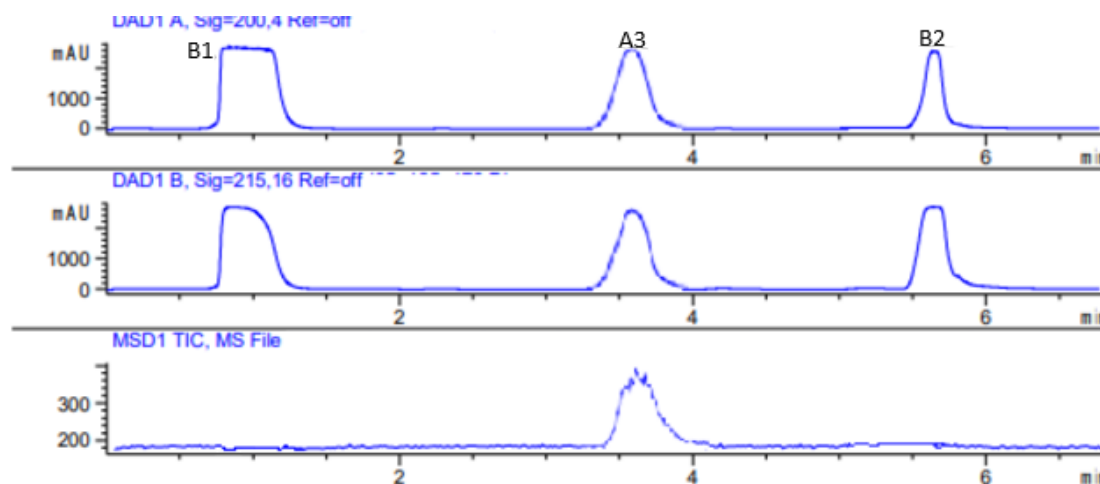


Рисунок 2.17. Хроматограми для суміші A3+B2+B1 режим 25-50 система ацетонітрил-вода.

Обрані кроки градієнтів для метанолу (50%) та ацетонітрилу (25%) були визначені експериментальним шляхом з урахуванням ефективності розділення компонентів суміші, що є критично важливим для препаративної хроматографії. Такий вибір забезпечує оптимальний баланс між гостротою і симетрією хроматографічних піків та їх компактністю, що дозволяє отримувати більшу кількість речовини. Це особливо актуально в препаративній хроматографії, де метою є не лише аналітичне визначення, а й максимальне вилучення чистого продукту.

Метанол є менш полярним розчинником порівняно з водою, але більш полярним, ніж ацетонітрил. Він сильніше взаємодіє з розчиненими компонентами через утворення водневих зв'язків. Через це градієнт із більшим кроком (50%) дозволяє швидше досягати умов, за яких відбувається елювання, водночас уникаючи занадто тривалого часу утримування. Використання меншого кроку для метанолу могло б призвести до надмірного розтягнення піків і зниження кількості речовини, що збирається.

Ацетонітрил, навпаки, є менш полярним розчинником і має слабшу здатність до утворення водневих зв'язків порівняно з метанолом. Це означає, що компоненти суміші легше взаємодіють із ацетонітрилом і швидше елюються з колонки. Використання меншого кроку (25%) дозволяє забезпечити кращий контроль над розділенням, уникати накладання піків та досягати гострої й симетричної їх форми. Занадто великий крок у випадку ацетонітрилу міг би призвести до надто швидкого елювання компонентів, що погіршило б розділення та ускладнило б препаративний збір продукту.

Таким чином, обрані кроки забезпечують оптимальну ефективність розділення, симетрію піків і високу продуктивність, що є ключовими параметрами для препаративної хроматографії.

## 2.4 Охорона праці

### Вимоги безпеки при роботі з ацетонітрилом

Ацетонітрил є токсичною та небезпечною речовиною. Вона може потрапляти в організм через вдихання парів, через шкіру та при прийомі всередину. Підвищене забруднення повітря відбувається досить швидко при випаровуванні цієї речовини при температурі 20°C. Ацетонітрил подразнює очі, шкіру та дихальні шляхи. Здатен пригнічувати клітинне дихання, що може спричиняти функціональні порушення, а у великих дозах – призвести до летального наслідку. Можливий відстрочений ефект. Під час згоряння утворюються токсичні пари ціаністого водню та оксиди азоту. При контакті з кислотами, водою та паром речовина розкладається, утворюючи токсичні та вогнебезпечні пари. Реакція з сильними окисниками може призвести до загрози пожежі та вибуху. Ацетонітрил агресивно діє на деякі види пластику, гуми та полімерні покриття. Пари цієї речовини важчі за повітря і можуть розповсюджуватись по поверхні, створюючи можливість спалаху на відстані. Вона добре змішується з повітрям, легко утворюючи вибухові суміші, а також може спричиняти утворення електростатичних зарядів при витіках та перемішуванні. Не дозволяється скидати суміші, що містять ацетонітрил, до загальної каналізації.

### Вимоги безпеки при роботі з метанолом

Метанол – це легкозаймиста рідина, що є надзвичайно токсичною, з вираженими кумулятивними властивостями та схожий за кольором, запахом і смаком на етиловий спирт. Згідно з ГОСТ 12.1.005, метанол належить до помірно небезпечних речовин 3-го класу. Граничнодопустима концентрація (ГДК) у повітрі робочої зони – 5 мг/м<sup>3</sup>, максимальна разова концентрація у повітрі населених пунктів – 1 мг/м<sup>3</sup>, середньодобова – 0,5 мг/м<sup>3</sup>. Метанол впливає на організм, насамперед, через нервову систему, печінку та нирки і має кумулятивний ефект. Смертельне отруєння можливе при потраплянні речовини всередину організму. Гостре отруєння паром є рідкісним явищем.

### **Вимоги безпеки при роботі з диметилсульфоксидом**

Диметилсульфоксид – безбарвна рідина з високою температурою кипіння. Вона легко проникає через шкіру, що може спричинити отруєння, якщо на шкіру потрапляють розчини токсичних речовин, що містять ДМСО (трансдермально). Може викликати подразнення шкіри, особливо при контакті з концентрованими розчинами [29].

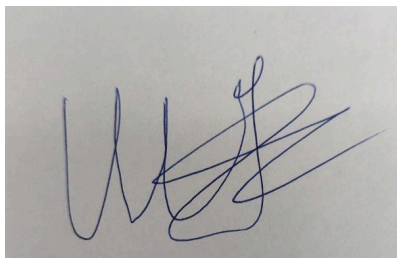
## ВИСНОВКИ

1. Показано, що параметр  $\log P$  можна використовувати для передбачення умов препаративного хроматографічного розділення органічних речовин (НФ С18, РФ – метанол-вода та ацетонітрил-вода).

2. На прикладі розділення органічних речовин ( $0 < \log P < 3$ ) з використанням рухомих фаз на основі метанолу та ацетонітрилу показано, що збільшення  $\log P$  на 0,5 потребує пропорційного підвищення вмісту органічної фази на 5% для досягнення ефективного розділення.

3. Встановлено, що для речовин із подібними значеннями  $\log P$ , але різними хімічними структурами, можна використовувати один метод елюювання.

4. Використання градієнтного методу розділення значно підвищує якість розділення порівняно з ізократичним режимом.



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Huber U., Majors R. E. Principles in preparative HPLC. Agilent Technologies Inc.: **2007**, pp. 2-9.
2. Hamid, M. S., Akash, M. S. H., & Rehman, K. High Performance Liquid Chromatography. *Chapter*, **2019**, pp. 175–184.
3. Neue U. HPLC columns: Theory, technology, and practice. Wiley-VCH: **1997**, pp. 120-125.
4. Fiorelia, N. E., Wibowo, A. D., Lae, N. L., Allison, & Krisbianto, O. Types of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Columns: A Review. **2022**.
5. Novel separation mode of HPLC based on phase-separation multiphase flow. **2022**. *Rapid Communication*, 38, 931–933.
6. Majors R. E. The role of the column in preparative HPLC. LCGC North America: **2004**, 22(5), pp. 416-430.
7. Tuzimski, T., & Petruczynik, A. Review of Chromatographic Methods Coupled with Modern Detection Techniques Applied in the Therapeutic Drugs Monitoring (TDM). **2020**. *Molecules*, 25(17), 4026. <https://doi.org/10.3390/molecules25174026>.
8. Neagu, A.-N., Jayathirtha, M., Baxter, E., Donnelly, M., Petre, B. A., & Darie, C. C. **2022**. Applications of Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) in Protein Analysis for Biomedical Research. *Molecules*, 27(8), 2411. <https://doi.org/10.3390/molecules27082411>.
9. Dong M. W., Wysocki J. Ultraviolet detectors: Perspectives, principles, and practices. LC GC North America: **2019**, 37, pp. 750-759.

10. Blain R. In Parriott D. (Ed.), *A practical guide to HPLC detection*. Academic Press: **1993**, pp. 111-116.
11. Ardrey R. E. *Liquid chromatography mass spectrometry: An introduction*. John Wiley & Sons Ltd.: **2003**, pp. 36-40.
12. Werres, T., Schmidt, T. C., & Teutenberg, T. **2021**. The influence of injection volume on efficiency of microbore liquid chromatography columns for gradient and isocratic elution. *Journal of Chromatography A*, 461965. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461965>.
13. Sadek P. C. *The HPLC Solvent Guide*, 2nd Edition. Wiley: **2002**, pp. 4-15.
14. Schellinger A. P., Carr P. W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility, and quantitation. *Journal of Chromatography A*: **2006**, 1103(1-2), pp. 97-109.
15. Sadek P. C. *Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual*. Wiley: n.d., pp. 45-47.
16. Giddings J. C. *Unified Separation Science*. Wiley: **1991**, pp. 2-5.
17. Raks V. A., Yesaulenko A. M. *Modern chromatography on the wave crest of the progress: A manual*. Avanpost: **2014**, pp. 13-17.
18. Jandera P., Skavrada M., Andel L., Komers D., Guiochon G. Description of adsorption equilibria in liquid chromatography systems with binary mobile phases. *Journal of Chromatography A*: n.d., DOI: 10.1016/s0021-9673(00)01003-7.
19. Martín J., Méndez R., Negro A. Effect of temperature on HPLC separations of penicillins. *Journal of Liquid Chromatography*: **1988**, 11(8), pp. 1707-1716.

20. Kanu, A. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. *Journal of Chromatography A*, **2021**, 1654, 462444. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462444>.
21. Vailava A., Horváth C. Retention in reversed-phase chromatography: Partition 1. *Chromatographia A*: **1998**, 829, pp. 1-27.
22. Bowman R. Countercurrent chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support. *Science*: **1970**, 167, pp. 281-283.
23. Moldoveanu S. C., David V. *Essentials in Modern HPLC Separations*, 2nd Edition. Elsevier: **2022**, pp. 1-3.
24. Lanin S. N., Nikitin Y. S. Molecular interactions in liquid chromatography. *Journal of Chromatography*: **1991**, 537, pp. 33-45.
25. Wellings D. A. *A Practical Handbook of Preparative HPLC*. Elsevier: **2006**, pp. 1-5, 20-30, 40-60.
26. **VLOGP: A Web Program for LogP Computation**. [електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.ddl.unimi.it/vegaol/vlogp.htm> (дата звернення: 09.12.2024).
27. Altiero P. Gradient design and development. *Agilent Applications Chemist*: **2020**, pp. 1-3.
28. Dolan John W. Gradient Elution, Part I: Intuition. *LCGC North America*, **2013**, 31 (3), 204–209.
29. Інструкція з охорони праці при виконанні робіт в лабораторії хроматографічної очистки речовин: ОП 029. ТОВ «НВП «СНАМІН», **2019**.