

МЕТОД ИОНО-ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

А.Н. Кузьменко*, доктор фармацевтических наук,
И.И. Краснюк (мл.), доктор фармацевтических наук,
В.А. Попков, доктор фармацевтических наук, доктор педагогических наук,
О.В. Нестерова, доктор фармацевтических наук
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;
Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Рассмотрены теоретические основы метода ионо-эксклюзионной хроматографии, используемые типы сорбентов, элюентов и детекторов, применяющихся в данном виде жидкостной хроматографии. Выбор элюентов обусловлен действующими в процессе разделения органических кислот физико-химическими механизмами. Выбор детектора, применяемого в ионо-эксклюзионной хроматографии, зависит от задачи, стоящей перед аналитиком, от требуемой точности и чувствительности, от изучаемых объектов. Метод все шире применяется для анализа и контроля качества фармацевтических препаратов как синтетического, так и природного происхождения. Приведены примеры его использования в фармацевтическом анализе. Растущее число публикаций подтверждает эффективность данного хроматографического метода.

Ключевые слова: ионо-эксклюзионная хроматография, фармацевтические препараты, контроль качества.

*E-mail: kuzmenko.mma@mail.ru

Название «ионная эксклюзия» подразумевает, что сорбент действует на отрицательно заряженные ионы кислотных остатков так, что они отталкиваются от поверхности сорбента и проходят, не задерживаясь. Это давно известное явление получило название «доннановской эксклюзии». Работы проводились еще в 50-е годы прошлого века, когда было достигнуто отделение сильных кислот от слабых на колонках, заполненных ионитами.

Основы механизма удерживания в ионо-эксклюзионной хроматографии (ИЭХ) описаны R.E. Smith [1]. Считается, что сорбент ведет себя подобно полупроницаемой мембране, помещенной

между подвижной и неподвижной жидкими фазами. При этом неподвижный элюент заключен между частицами сорбента. Анионы не могут проникнуть в неподвижную фазу, продолжают двигаться с потоком элюента и выходят с «мертвым объемом». Недиссоциированные молекулы задерживаются на сорбенте на различное для каждой кислоты время. Хроматографическое разделение зависит от факторов, влияющих на коэффициент распределения: константы диссоциации кислоты, температуры, концентрации раствора, степени сшивки и емкости ионита, рН элюента.

В качестве сорбента в ИЭХ чаще всего используют сульфированный стирол-дивинилбензолный сополимер с высокой емкостью. Частицы, как правило, однородны по размеру и обычно не превышают 15 мкм.

Основные параметры неподвижных фаз, влияющие на удерживание: размер частиц, ионообменная емкость и степень шивки сорбента. Важна также структура сорбента. Обычно используются микропористые или гелевые типы сорбентов, в последнее время стали применяться и макропористые материалы. При этом скорость разделения возрастает, размеры колонки уменьшаются и становится возможным градиентное элюирование. Стирол-дивинилбензолная матрица обычно бывает насыщена химически привитыми сульфогруппами, за счет которых и осуществляется доннановская эксклюзия. Однако это не единственный фактор, влияющий на разделение карбоновых кислот. Чтобы показать роль гидрофобных взаимодействий, было проведено разделение ряда алифатических кислот с использованием сорбентов слабо сульфированных или вообще лишенных сульфогрупп [2]. Разделение достигалось с помощью разбавленных растворов спиртов (наилучшим оказался бутанол), которые, как известно, повышают гидрофильность поверхности и могут свести на нет гидрофобные взаимодействия.

Сила доннановской эксклюзии возрастает с увеличением ионообменной емкости и степени шивки. Сорбенты с большой степенью шивки (8–12%) обладают более сильным доннановским эффектом, чем с низкой степенью шивки [3].

Выбор элюентов в методе ИЭХ обусловлен действующими в процессе разделения органических кислот физико-химическими механизмами. Как известно, кислоты отторгаются сорбентом, так как по преимуществу находятся в молекулярной форме. Поэтому естественным представляется использование кислых элюентов с достаточно низким рН. Такие растворы позволяют практически полностью перевести слабые органические кислоты в молекулярную форму и существенно улучшить разделение. Впервые этот подход применялся В. Туркельсоном и М. Ричардсом для анализа биологических объектов [4]; он остался определяющим и в наше время. Элюентом служил 0,01N-раствор хлористоводородной кислоты. При этом применяли УФ-детектор, а, как известно, неорганические анионы не поглощают в УФ-диапазоне.

В самых ранних работах роль элюентов выполняла вода, но полученные пики были растянутыми, а селективность весьма низкой. В современных исследованиях деионизованную воду используют, как правило, лишь для того, чтобы показать неоспоримые преимущества других элюентов [5]. В настоящее время в качестве элюентов обычно применяют разбавленные растворы сильных кислот (серной, хлористоводородной и алифатических сульфокислот), иногда других кислот, но в любом случае детектором является УФ-прибор [6].

Для кондуктометрических детекторов предложены более слабые кислоты, например бензойная кислота, электропроводность 5 мМ раствора которой составляет всего 5,6 мкСм/см, в противовес 81,6 мкСм/

см – для раствора серной кислоты той же концентрации [7]. В качестве другого элюента с низкой электропроводностью была предложена фталевая кислота. При использовании 1 мМ раствора фталевой кислоты было получено хорошее разделение 8 кислот за 20 мин на сорбенте Aminex HPX-87H.

Одним из новых элюентов, пригодных как для непрямого фотометрического, так и для кондуктометрического детектирования, является 2,6-пиридиндикарбоновая кислота. По сравнению с 1 мМ серной кислотой такой элюент демонстрирует лучшее разделение и более высокую чувствительность для обоих детекторов. В последние годы широко применяется введение в состав элюентов органических модификаторов, которые уменьшают сродство гидрофобных молекул к стационарной фазе.

Выбор детектора, применяемого в ионо-эксклюзионной хроматографии, зависит от задачи, стоящей перед аналитиком, от требуемой точности и чувствительности, от изучаемых объектов. Ароматические кислоты, как правило, не детектируются на кондуктометре и для их определения используется УФ-детектор или рефрактометр. Кондуктометрическое детектирование [8] основано на измерении проводимости проходящего через детектор элюента, поэтому для понижения фоновой проводимости целесообразно использовать слабопроводящие элюенты: бензойную, янтарную, винную, угольную, деионизованную воду или элюенты не кислого характера, в частности спирты, сахара или многоатомные спирты. Другим весьма распространенным способом детектирования является измерение поглощения в УФ-диапазоне при длинах волн между 200 и 220 нм, так как в этом диапазоне неорганические анионы поглощают очень слабо. Чаще всего элюентом служит серная кислота, иногда – хлористоводородная. Имеется сообщение о таком элюенте, как 2,6-пиридиндикарбоновая кислота [9].

В последнее время появились работы с использованием метода масс-спектрометрии, который характеризуется низким пределом обнаружения и высокой селективностью [10]. Сначала этот метод применялся для детектирования больших биологических молекул, затем – и для молекул небольшой молекулярной массы.

ИЭХ все шире применяется для анализа и контроля качества фармацевтических препаратов как синтетического, так и природного происхождения. Метод был использован для определения цитрат- и ацетат-ионов в гемоконсервантах и инфузионных растворах, для контроля качества лекарств с наличием белков [7,11]. Оптимальным соотношением концентрации органического модификатора (7,5% ацетонитрил) и температуры (50°C) в экстракте *Lupinus angustifolius* было достигнуто разделение алифатических (шавелевая, лимонная, винная, яблочная, янтарная, фумаровая, муравьиная и уксусная) и ароматических (галловая, фталевая, протокатеховая, гентизиновая, 4-гидроксибензойная, ва-

нилиновая, бензойная, кумаровая и феруловая) кислот [12]. Все алифатические кислоты элюировались прежде галловой кислоты. Гидрофильные кислоты, в частности галловая, фталевая и протокатеховая, элюировались первыми. Удерживание гидрофобных ароматических кислот возрастало при уменьшении полярности раствора. Это можно объяснить гидрофобным взаимодействием между раствором и смолой (в данном случае – полистиролдивинилбензолом).

Метод ИЭХ предлагается для одновременного, быстрого и чувствительного определения аскорбиновой и мочевой кислот в плазме крови при использовании УФ-детектора [13], аскорбиновой кислоты – в плодах малины [8]. Данным методом также успешно выявляется ацетилсалициловая кислота [14]. Для определения алифатических кислот (уксусной, пропионовой и масляной) в экстрактах диетических волокон также был применен метод ИЭХ [15]. В качестве элюента использовалась 0,5 ммоль/л серная кислота, детектора – кондуктометр. Линейность градуировочного графика соблюдалась в диапазоне 0,005–10 ммоль/л для уксусной кислоты и 0,025–10 ммоль/л для пропионовой и масляной кислот. Время определения не превышало 10 мин. С помощью метода ИЭХ разделяли глюкозу и ксилитозу при анализе гидролизованной биомассы [16].

Все возрастающее число публикаций подтверждает эффективность данного хроматографического метода для фармацевтического анализа.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Smith R.E. Ion Chromatography Applications. Boca Raton: CRS Press, 1988; 212.
2. Morris J., Fritz J.S. Eluent modifiers for the liquid-chromatographic separation of carboxylic-acids using conductivity detection. Analytical Chemistry, 1994; 66: 2390–95.
3. Tanaka K., Ohta K., Haddad P.R., Fritz J.S., Lee K-P., Hasebe K., Ienji A., Miyayama A. Acid-rain monitoring in East Asia with a portable-type ion-exclusion-cation-exchange chromatographic analyzer. Journal of Chromatography A., 1999; 850: 311–7.
4. Turkelson V.T., Richards M. Separation of the citric acid cycle acids by liquid chromatography. Analytical Chemistry, 1978; 50 (11):1420–23.
5. Ohta K., Tanaka K., Haddad P.R. Ion-exclusion chromatography of benzenecarboxylic acids on an unmodified silica-gel column. Journal of Chromatography A., 1997; 782: 33–40.
6. Mansour F.R., Kirkpatrick C.L., Danielson N.D. Separation of Aliphatic and Aromatic Carboxylic Acids by Conventional and Ultra High-Performance Ion-Exclusion Chromatography. Chromatographia, 2013; 76(11): 603–9.
7. Кузьменко А.Н., Панов В.П., Иванов А.А., Шпигун О.А., Евграфов А.А., Решетняк В.Ю., Попков В.А. Определение цитрат- и ацетат-ионов в гемоконсервантах и инфузионных растворах методом ион-эксклюзионной хроматографии. Хим.-фарм. журн., 2002; 36 (7): 44–7. (Kuzmenko A.N., Panov V.P., Ivanov A.A., Shpigun O.A., Evgrafov A.A., Reshetnjak V.Ju., Popkov V.A. Determination of citrate and acetate ions in gemokonservantah and infusion solutions by method of ion-chromatography èksklüzionnoj. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2002; 36 (7): 44–7) (in Russian).
8. Кузьменко А.Н. Определение аскорбиновой кислоты в плодах малины методом ион-эксклюзионной хроматографии. Сборник научных трудов XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 6.04.2009–10.04.2009. М., 2009; 688. (Kuzmenko A.N. Determination of Ascorbic acid in fruits raspberri èksklüzionnoj ion-chromatography method. Collection of scientific papers of the XVI Russian National Congress «People and Medication», 6.04.2009–10.04.2009. Moscow, 2009; 688) (in Russian).
9. M. Novič, P. R. Haddad. Mechanism of formation of system peaks in ion-exclusion chromatography. Journal of Chromatography A., 2013; 1305: 188–92.
10. Vidanoja J. Determination of short chain carboxylic acids in vegetable oils and fats using ion exclusion chromatography electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A., 2015; 1383: 96–103.
11. Kálmán-Szekerés Z., Olajos M., Ganzler K. Analytical aspects of biosimilarity issues of protein drugs. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012; 69: 185–95.
12. Chen Z.L., Adams M.A. Retention behavior and simultaneous separation of carboxylic and aromatic acids using ion-exclusion chromatography. Journal of Liquid Chromatography and Related Technology, 1999; 22 (17): 2595–611.
13. Ferin R., Pavão M. L., Baptista. Rapid, sensitive and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV. Clinical Biochemistry, 2013; 46 (7–8): 665–9.
14. Кузьменко А.Н., Попков В.А. Совершенствование методов идентификации основных биологически активных веществ в препаратах «Стоматофит» и «Мараславин». Сборник научных трудов IV Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов», 4.06.2007 – 5.06.2007. М., 2007; 101. (Kuzmenko A.N., Popkov V.A. Improved methods for the identification of the major biologically active substances in medications «Stomatofit» and «Maraslavin». Collection of scientific works IV Russian Scientific-practical Conference «Actual problems of innovation with non-traditional natural resources and creating functional products», 4.06.2007– 5.06.2007. Moscow, 2007; 101) (in Russian).
15. Dias J. C., Suzuki E., de Albuquerque C.L., Ferreira A.L., Brito A., Kubota L.T. Determination of short-chain fatty acids in dietary fiber extracts using ion-exclusion chromatography with suppressed conductivity detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009; 49 (4): 1128–32.
16. Mai N.L., Nguyen N.T., Kim J.-I., Park H.-M., Lee S.-K., Koo Y.-M. Recovery of ionic liquid and sugars from hydrolyzed biomass using ion exclusion simulated moving bed chromatography. Journal of Chromatography A., 2012; 1227: 67–72.

Поступила 22 апреля 2016 г.

AN ION-EXCLUSION CHROMATOGRAPHIC METHOD IN THE ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

A.N. Kuzmenko, PhD; I.I. Krasnyuk (Jr.), PhD; V.A. Popkov, PhD, PedD; O.V. Nesterova, PhD

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991, Russian Federation

SUMMARY

The paper considers the theoretical bases of an ion-exclusion chromatographic method, used sorbents, eluents, and detectors employed in this type of liquid chromatography. The choice of eluents is due to the physicochemical mechanisms responsible for the separation of organic acids. That of a detector used in ion-exclusion chromatography depends on the task facing an analyst and on the required accuracy and sensitivity of test objects. The method is being increasingly used to test pharmaceutical preparations of synthetic as well as natural origin and to control their quality. The paper gives examples of using this method in pharmaceutical analysis. An increasing number of publications confirm the effectiveness of this chromatographic method.

Key words: ion-exclusion chromatography, pharmaceutical preparations, quality control.