

БЫСТРАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОТ СОКРАЩЕНИЯ ВРЕМЕНИ АНАЛИЗА К НОВЫМ ОБЛАСТЯМ ПРИМЕНЕНИЯ

■ Н.Ю. Исупова, к.х.н. ООО «Аналит Продактс»

Хроматография является широко востребованным в фармацевтике методом разделения и анализа. Метод используется на начальной стадии разработки лекарственных препаратов, на стадии клинических испытаний, на стадии выделения и очистки субстанций, наконец, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и газовая хроматография (ГХ) являются базовыми методами анализа качества субстанций и готовых лекарственных средств.

Поскольку продукция фармацевтической индустрии является жизненно важной, разработка лекарственных препаратов, их исследование и контроль качества подразумевают проведение большого количества рутинных анализов. В целях сокращения времени единичного анализа и увеличения продуктивности лабораторий крайне актуальным является использование высокопроизводительного аналитического оборудования, в частности, приборов, позволяющих реализовать метод быстрой хроматографии.

Быстрая хроматография – одна из основных тенденций развития хроматографии в начале 21 века. Главная цель – сокращение времени разделения без проигрыша в эффективности. Практическое внедрение метода быстрой хроматографии позволяет в несколько раз сократить время анализа. Благодаря этому метод является крайне перспективным в лабораториях контроля качества продукции в серийном производстве фармпрепаратов, а также при проведении скрининговых исследований на стадии разработки препаратов и их клинических испытаний.

Возможность реализации режима быстрой хроматографии была известна давно. Из классической теории хроматографии известно, что эффективность разделения является функцией параметров колонки: диаметра колонки и толщины пленки неподвижной фазы - в газовой хроматографии, и размера зерна сорбента - в жидкостной хроматографии. Если использовать узкие ГХ капиллярные колонки, покрытые тонкой пленкой неподвижной фазы или ВЭЖХ колонки, заполненные мелкодисперсным сорбентом, то за счет высокой эффективности таких колонок можно существенно увеличивать скорость подвижной

фазы, тем самым сокращая время разделения, и при этом не терять в качестве разделения.

Однако, практическое использование таких колонок и реализация режима быстрой хроматографии были затруднены из-за отсутствия соответствующего аппаратного исполнения. Для того, чтобы прибор действительно позволял реализовывать метод быстрой хроматографии, он должен обладать определенным набором характеристик.

Во-первых, прибор должен быть рассчитан на более высокое давление в коммуникациях, поскольку давление на входе в узкие капиллярные ГХ колонки и ВЭЖХ колонки с мелкодисперсным сорбентом существенно выше, чем в случае «классических» колонок. Под «классическими» подразумеваются ГХ капиллярные колонки с внутренним диаметром более 0,20 мм, имеющие толщину пленки неподвижной фазы более 0,2 мкм, а также ВЭЖХ колонки, заполненные сорбентом зернением не менее 3 мкм. Быстрая хроматография требует использования капиллярных колонок диаметром 0,1 мм, покрытых 0,1 мкм слоем неподвижной фазы, а диаметр зерен сорбентов, используемых в ВЭЖХ колонках, не превышает 2,5 мкм. При работе с такими колонками входные давления возрастают в несколько раз и могут достигать 10 атмосфер в газовой хроматографии и 1000 атмосфер и более – в жидкостной.

Во-вторых, детекторы для быстрой хроматографии должны обеспечивать корректную регистрацию узких пиков. Если в классической хроматографии мы имеем дело с пиками, имеющими ширину на половине высоты более 1 с, то в быстрой хроматографии аналогичный параметр имеет величину порядка 0,1 с. То есть, детекторы и регистрирующие устройства должны быть быстродействующими,

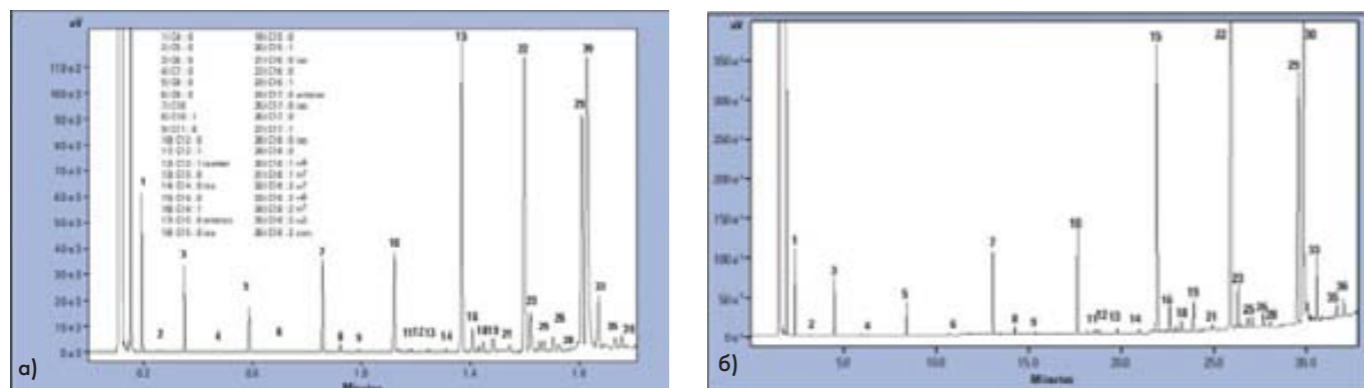


Рис. 1. Разделение 36 метиловых эфиров жирных кислот: а. колонка RtxWax 30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм, скорость подвижной фазы H2 36,2 см/с, общее время анализа 33 минуты; б. колонка RtxWax 10 м, 0,1 мм, 0,1 мкм, скорость подвижной фазы H2 116 см/с, общее время анализа 2 минуты.

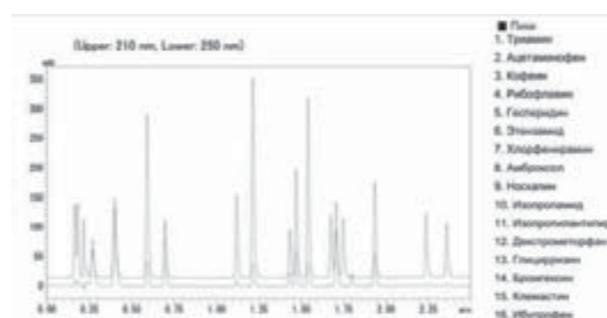


Рис. 2 Результат разделения 16-ти противовоспалительных и жаропонижающих препаратов на колонке Shimpack ODS XR (50 мм, 3 мм, 2,2 мкм). Подвижная фаза: А) 20 ммоль/л (Na) фосфатный буфер (pH2.5), содержащий 100 ммоль/л натрия перхлората; В) Элюент А/Ацетонитрил (3/7 объемн.) градиент В от 15% до 45% (0 мин- 1 мин), от 45% до 90% (1-2 мин), 90% (2 мин-2.2 мин), 100%, 15% (2,61 – 3,2 мин), скорость п.ф. 1,4 мл/мин, детектор УФ 210 и 250 нм.

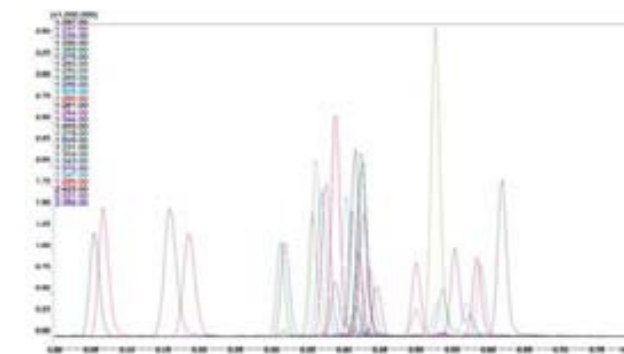


Рис. 3 Анализ смеси 30 лекарственных препаратов. Режим регистрации ESI positive: 1. Атенолол, 2. Прокаин, 3. Лидокаин, 4. Атропин, 5. Иохимбин, 6. Хлорфенирамин, 7. Пропранолол, 8. Алпренол, 9. Тетракаин, 10. Дифенгидрамин, 11. Дипиридамол, 12. Доксепин, 13. Десипрамин, 14. Имипрамин, 15. Нортриптилин, 16. Дибуктин, 17. Верапамил, 18. Амитриптилин, 19. Резерпин, 20. Карбамазепин, 21. Изопропилаптин, 22. Алпразолам, 23. Триазолам, 24. Цилостазол, 25. Нифедипин, 26. Диазепам, 27. Варфарин; Режим регистрации ESI- negative: 28. Цефуроксим, 29. Хлорамфеникол, 30. Нитрендипин.

имеющими постоянные времена, не превышающие 10 мсек и частоту опроса не менее 200 Гц. Быстрые детекторы – важнейшее требование для режима быстрой хроматографии, без которого невозможно описать узкие хроматографические пики достаточным количеством точек.

Еще одно требование, предъявляемое к приборам для быстрой хроматографии – возможность задания высоких линейных скоростей нагрева колонок в процессе разделения, а также, быстрое их охлаждение для сокращения интервалов времени между анализами.

Наконец, для газовой хроматографии важной является возможность воспроизводимого дозирования малых объемов пробы, поскольку емкость капиллярных колонок, покрытых тонкими пленками неподвижной фазы, существенно меньше, чем у классических капиллярных колонок, т.е. газовые хроматографы должны обеспечивать высокие коэффициенты деления потока газа-носителя в инжекторе.

Приборы, отвечающие перечисленным требованиям, появились только в 21 веке. В 2000 году компания Shimadzu выпускает на рынок первый в мире газовый хроматограф GC 2010, позволяющий в стандартном исполнении реализовывать режим быстрой хроматографии. В 2005 появились первые инструментальные решения для быстрой жидкостной хроматографии. В настоящее время компания Shimadzu занимает лидирующее положение в области разработки приборов для быстрой газовой и жидкостной хроматографии и хроматомасс-спектрометрии. Линейка приборов для быстрой газовой хроматографии включает газовый хроматограф GC 2010 Plus, газовый хроматомасс-спектрометр с одностадийным квадруполом GCMS QP 2010 Ultra, газовый хроматомасс-спектрометр с тройным квадруполом GCMS TQ 8030. Обе модели хроматомасс-спектрометров построены на базе хроматографа GC 2010 Plus. Этот хроматограф обеспечивает контроль давления газа-носителя вплоть до 970 кПа и контроль расхода подвижной фазы до 1200 мл/мин, все атмосферные детекторы имеют возможность варьировать постоянную времени в диапазоне от 4 мсек до 2000 мсек, что гарантирует возможность надежной регистрации узких пиков. Масс-селективные детекторы имеют максимальную среди существующих квадрупольных детекторов скорость сканирования - 20 000 а.е.м./с. Кроме того, тройной квадруполь обладает высочайшей скоростью регистрации MRM переходов (600 MRM/с).

Концепция Shimadzu для сверхбыстрой ВЭЖХ базируется на блочной модели ВЭЖХ NEXERA с насосами, поддерживающими максимальное давление 130 МПа, что дает возможность использования всех типов выпускаемых ныне колонок, включая колонки с сорбентом зернением 1,7 мкм. В комбинации со сверхбыстрыми

масс-селективными ВЭЖХ детекторами эта модель позволяет за минуту проводить анализ более сотни соединений. Shimadzu предлагает следующие сверхбыстрые масс-селективные детекторы для ВЭЖХ: одностадийный квадрупольный масс-селективный детектор LCMS 2020 и два тройных квадрупольных: LCMS 8030 и LCMS 8040. Все эти детекторы характеризуются высочайшей максимальной скоростью сканирования 15 000 а.е.м./с, высочайшей скоростью MRM переходов – 555 MRM/с, минимальной скоростью переключения полярностей в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов 15 мсек.

Рассмотрим на примерах возможности быстрой хроматографии. В газовой хроматографии использование тонких (0,1 мм) капиллярных колонок длиной 5-10 м позволяет существенно сократить время разделения, что особенно актуально при анализе смесей высококипящих компонентов. Рис. 1 иллюстрирует результаты анализов смесей 36 метиловых эфиров жирных кислот, выполненные в режиме классической капиллярной хроматографии (а) и в режиме быстрой хроматографии (б). Время анализа сокращается с 33 до 2 минут. В жидкостной хроматографии с абсорбционным детектированием можно сократить время анализа в 3-10 раз в зависимости от размера частиц сорбента. Причем, довольно существенного сокращения времени разделения можно добиться, используя жидкостные хроматографы, рассчитанные на «стандартные» максимальные давления, т.е. давления, не превышающие 400 атм. Как показали исследования, проведенные в лаборатории Shimadzu, использование колонок длиной до 10 см, заполненных сорбентом с диаметром зерна 2,2 мкм, позволяет сократить время анализа в пять раз по сравнению со временем анализа с использованием традиционных колонок, заполненных 5 мкм сорбентом, при этом рабочее давление не будет превышать 350 атмосфер, что позволяет осуществлять анализ на обычном ВЭЖ хроматографе. Переход к колонкам, заполненным более мелким сорбентом, обеспечивает еще большее сокращение времени анализа, однако при этом существенно возрастает давление на входе в колонку, что требует использования более дорогого прибора.

На рис.2 приведен пример разделения 16-ти противовоспалительных и жаропонижающих препаратов менее, чем за 2,5 минуты.

Использование масс-селективных (МС) детекторов с высокими скоростями сканирования (более 10 000 а.е.м./с) принципиально расширяет возможности хроматографии как метода. Дело в том, что по сравнению с остальными ВЭЖХ детекторами (в первую очередь, с такими

распространенными, как абсорбционные), МС детектор обладает большей селективностью и чувствительностью. Причем, селективность можно варьировать в ходе анализа. Это дает возможность там, где спектрофотометрический детектор регистрирует только один пик от близко или одновременно элюируемых компонентов, выделить пики каждого, используя режим мониторинга отдельных ионов (SIM). Отпадает необходимость добиваться тщательного разделения компонентов для регистрации сигнала каждого. В результате – колоссальное сокращение времени анализа (Рис.3.): 30 компонентов определяются за 0.6 мин! Помимо экономии времени экономится также расход подвижной фазы.

Анализ, результаты которого представлены на рис.3, выполнен с использованием ВЭЖХ системы Shimadzu Prominence XR (макс. давление 660 атм), оснащенной одностадийным квадрупольным масс-детектором LCMS 2020 (макс. скорость сканирования 15 000 а.е.м./с, минимальное время переключения полярностей в режимах регистрации положительных и отрицательных ионов – 15 мсек. Такое быстрое переключение полярностей позволяет в ходе одного анализа одновременно регистрировать как компоненты, образующие в результате ионизации в электросперее (ESI) положительные ионы (комп. 1-27 Рис.3), так и компоненты, образующие отрицательные ионы (комп. 28-30 Рис.3).

Переход от одностадийного квадрупольного к тройному сопровождается дальнейшим увеличением селективности метода за счет реализации режима мониторинга множественных реакций (MRM). Этот режим дает возможность регистрировать сигнал от нескольких компонентов, выходящих из колонки одновременно. Кроме того, за счет минимизации сигналов матрицы существенно возрастает соотношение сигнал/шум, и, следовательно, чувствительность определения. Приборы, обладающие высокой скоростью сканирования, высокой скоростью регистрации MRM переходов, а также малым временем переключения полярностей предоставляют возможность регистрации более сотни компонентов за одну минуту. Таким образом, открываются огромные возможности для высокоскоростного скрининга лекарственных, наркотических препаратов, продуктов метаболизма в биологических объектах.

Высокоскоростные квадрупольные масс-селективные детекторы в последнее время все шире используются в многомерной газовой хроматографии с криомодуляцией. Эта разновидность многомерной хроматографии предполагает использование двух капиллярных колонок различной полярности, расположенных последовательно, причем, последняя колонка – это колонка для быстрой хроматографии. Между колонками находится криомодулятор – устройство, позволяющее последовательно быстро охлаждать и быстро нагревать капилляр, соединяющий колонки. В результате, смесь неразделившихся на первой колонке компонентов в процессе охлаждения стенок капилляра фиксируется (фокусируется) и концентрируется на стенках охлаждаемого участка. Далее – на стадии нагрева капилляра происходит десорбция сфокусированных компонентов, после чего они поступают во вторую колонку другой полярности, где и происходит их разделение. В итоге, вместо одного пика от нескольких одновременно элюируемых веществ, который мы бы зарегистрировали на выходе с первой колонки, после разделения на второй колонке регистрируются несколько узких пиков. Результаты разделения в многомерной хроматографии представляются в системе координат, отличной от той, что применяется в классической хроматографии. По оси абсцисс откладывается время удерживания на первой колонке, по оси ординат – время удерживания на второй колонке, в зависимости от типа используемого для обработки данных программного обеспечения, интенсивность пика откладывается по оси аппликат или отображается цветом. В первом случае, результаты представляются в виде трехмерных изображений, во втором – в виде двумерных с пятнами, имеющими различную окраску.

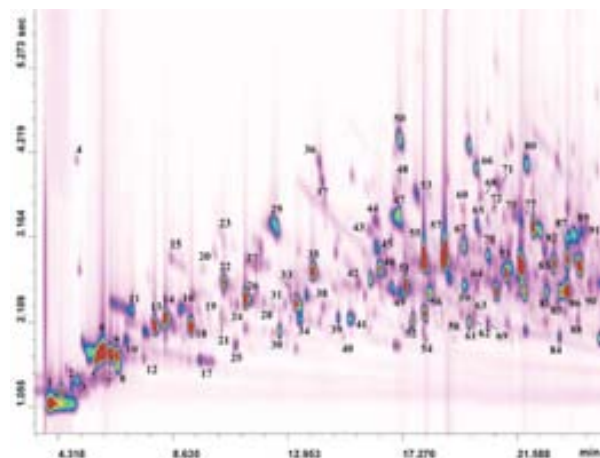


Рис. 4. Результаты многомерного анализа GCxGC-qMS летучих компонентов чая мате. За первые 25 минут разделения зарегистрировано более 90 компонентов. Полное время анализа – 80 минут. За это время удалось зарегистрировать более 1000 компонентов. Колонки: SLB-5MS 30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм и Equity 1701 1,5 м, 0,1 мм, 0,1 мкм.

До недавнего времени для регистрации результатов в многомерной хроматографии применялись исключительно времяпролетные масс-селективные детекторы, поскольку квадрупольные не обладали быстроедействием, необходимым, чтобы описывать достаточным количеством точек узкие пики. Квадрупольный хроматомасс-спектрометр GCMS QP-2010 Ultra со скоростью сканирования 20 000 ае/сек уверенно справляется с этой задачей. Применение квадрупольного детектора упрощает и удешевляет технику эксперимента, расширяет возможности идентификации с использованием стандартных коммерческих библиотек.

Рис. 4 иллюстрирует возможности многомерной хроматографии на примере анализа летучих компонентов чая мате. Если проводить разделение на одной капиллярной колонке, то на хроматограмме присутствуют 200 пиков, на основании чего можно сделать ошибочное предположение, что проба содержит всего 200 компонентов. С использованием техники многомерной хроматографии с криомодуляцией регистрируем более 1000 пиков, из них 241 удается идентифицировать с помощью библиотечного поиска.

Многомерная хроматография является чрезвычайно информативной при анализе многокомпонентных смесей, которые невозможно разделить, используя только одну колонку. Эта техника дает всеобъемлющую картину состава сложных смесей неизвестного состава, включающих сотни компонентов. Возможность использования в качестве детектора высокоскоростного квадрупольного дает новый мощный импульс для развития этого направления хроматографического анализа.

На основании приведенных выше примеров, можно подытожить, что развитие техники быстрой хроматографии продемонстрировало, что этот подход позволяет не только сокращать время анализа, но и расширяет возможности самого метода хроматографии: увеличивает селективность и чувствительность, тем самым расширяя области применения. Дальнейшее развитие быстрой хроматографии связано с совершенствованием применяемых колонок, детектирующих устройств и программного обеспечения (особенно, для многомерной хроматографии). Однако, несмотря на то, что некоторые аспекты метода еще не имеют окончательных оптимальных решений, будущее – за быстрой хроматографией.