ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՎԵՏԻՍ ԾԱՏՈՒՐՅԱՆ

ԲԱՐՁՐԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏ ՀԵՂՈՒԿԱՅԻՆ ՔՐՈՄԱՏՈԳՐԱՖԻԱՅԻ ՏԵՍԱԿԱՆ ԵՎ ԿԻՐԱՌԱԿԱՆ ՀԻՄՈՒՆՔՆԵՐԸ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ «ԴԵՂԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ» ԱՌԱՐԿԱՅԻՑ

ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
2021

ՀՏԴ 615.451:54(076)
ԳՄԴ 52.8+24g7
Բ 362

Հրատարակության է երաշխավորել
ԵՊՀ ֆարմացիայի ինստիտուտի գիտական խորհուրդը:

Ծատուրյան Ավետիս
Բ 362 Բարձրարդյունավետ հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի տեսական և կիրառական հիմունքները: Ուսումնամեթոդական ձեռնարկ «Դեղանյութերի կառուցվածքի ուսումնասիրման մեթոդները» առարկայից/ Ա. Ծատուրյան.- Եր.: ԵՊՀ հրատ., 2021.- 82 էջ:

Բարձրարդյունավետ հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի տեսական և կիրառական հիմունքները

Ուսումնամեթոդական ձեռնարկ: ԵՊՀ ֆարմացիայի ինստիտուտի Ֆարմացիա և Դեղագործական քիմիա մասնագիտացմամբ ուսանողների համար (լաբորատոր և ինքնուրույն աշխատանքների համար):

Ձեռնարկում ներկայացված է բարձրարդյունավետ հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդի տեսությունը, միացությունների քանակական և որակական նույնականացման սկզբունքները և հեղուկային քրոմատոգրաֆիային վերաբերող մի շարք այլ ցուցանիշներ:

Ներկայացված են նաև լաբորատոր փորձեր, որոնք կօգնեն ուսանողին ամրապնդել և ստուգել ձեռք բերած գիտելիքները:

ՀՏԴ 615.451:54(076)
ԳՄԴ 52.8+24g7

ISBN 978-5-8084-2490-6
DOI: https://doi.org/10.46991/YSUPH/9785808424906

© ԵՊՀ հրատ., 2021
© Ծատուրյան Ա., 2021

ՆԱԽԱԲԱՆ

Դեղերի ազդեցությունը, արդյունավետությունը և անվտանգությունը գնահատվում են դեղի ստեղծման ողջ կենսացիկլի ընթացքում՝ սկսած նախակլինիկական և կլինիկակական փորձարկումներից մինչև սպառողին հասնելը: Հաջորդ կարևորագույն քայլը բուժամիջոցի կամ դեղի որակի ապահովումն է:

Դեղի անորակության պատճառները բազմազան են: Դրանք կարող են լինել ելանյութերն ու դրանց մեջ եղած կողմնակի միացությունները, դեղի ստացման տեխնոլոգիական պրոցեսի ընթացքում օգտագործվող (կատալիզատորներ, լուծիչներ, այլ օժանդակ նյութեր) և զուգահեռ ստացվող այլ նյութերը, պահման պայմանների խախտման հետևանքով դեղերի փոխարկումների արդյունքները, փաթեթանյութը և այլն: Բժշկության մեջ կիրառվում են միայն այն դեղերը, որոնք բավարարում են Պետական դեղագրքի (ՊԴ) բոլոր պահանջներին: Դեղերի մաքրության նկատմամբ հիմնական սկզբունքը այնպիսի խառնուկների բացակայությունը կամ սահմանափակ պարունակությունն է, որոնք բացասաբար են ազդում դեղի ֆիզիկական, քիմիական կամ դեղաբանական հատկությունների վրա:

Բարձրարդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիան (ԲԱՀՔ) հանդիսանում է դեղերի որակի հսկման ժամանակակից պահանջներին առավելագույնս բավարարող, բարձր ճշտությամբ ֆիզիկական մեթոդ, որը կիրառվում է միացությունների բաժանման, քանակական և որակական նույնականացման համար:

Սույն ձեռնարկում ներկայացված ԲԱՀՔ մեթոդը ուղղակիորեն կապված է դեղերի որակի հսկման, կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների քանակական և որակական նույնականացման, տարբեր ծագման նմուշներում նպատակային միացությունների որոնման, միացությունների քիմիական մաքրության հաստատ-

ման և սինթետիկ ու բնական ծագում ունեցող միացությունների մի շարք այլ ֆիզիկաքիմիական ցուցանիշների ուսումնասիրության հետ:

Հաշվի առնելով վերոնշյալը՝ ձեռնարկում հանգամանորեն ներկայացված է ԲԱՀՔ համակարգի տեսությունը, կարևոր կիրառական ֆիզիկական ցուցանիշները, ինչպես նաև լաբորատոր փորձարարական աշխատանքներ, ժամանակակից անալիտիկ սարքավորումների հետ աշխատանքային հմտությունների յուրացման, հետազոտության մեթոդների ընտրության և արդյունքների հավաստիության վերաբերյալ միջազգային պահանջներին համապատասխան մասնագիտական և հիմնարար հմտությունների ձեռքբերման համար:

Բարձրարդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիա

Ներկայումս խիստ կարևորվում է ՊԴ-ի մասնավոր հոդվածներում, ինչպես նաև արտադրողի չափորոշիչ փաստաթղթերում ընդգրկված այն ֆիզիկաքիմիական մեթոդների ընտրությունը, որով իրականացվում է տվյալ դեղի որակի հսկումը:

Բարձրարդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիան հանդիսանում է դեղերի որակի հսկման ժամանակակից պահանջներին առավելագույնս բավարարող, բարձր ճշտությամբ ֆիզիկական մեթոդ, որը կիրառվում է միացությունների բաժանման, քանակական և որակական նույնականացման համար:

ԲԱՀՔ-ը հաջողությամբ կիրառվում է դեղերի և դեղանյութերի քանակական և որակական անալիզի համար՝ իսկության, կողմնակի խառնուրդների, լուծելիության, դոզավորման միատարրության, քանակական որոշման համար: Հարկ է նշել, որ քրոմատոգրաֆիան թույլ է տալիս համատեղել մեկ հետազոտության մեջ մի քանի տվյալ, օրինակ՝ իսկություն և քանակ:

Քրոմատոգրաֆիայի պատմությունը սկիզբ է առնում 19-րդ դարի սկզբից Միխայիլ Ցվետի կողմից տերևների պիգմենտների (կարոտինները, քսանոֆիլները և քլորոֆիլը) բաժանման աշխատանքների նկարագրությամբ, որի համար նա օգտագործել է կալցիումի կարբոնատով և մագնեզիումի օքսիդով լցված աշտարակներ: Նույն ժամանակահատվածում ամերիկացի երկրաբան և ինժեներ Դեվիդ Դեյը նույնպես օգտագործել է քրոմատոգրաֆիան՝ բաժանելով նավթի ֆրակցիաները, սակայն Միխայիլ Ցվետը առաջինն էր, ով ճշգրիտ նկարագրել է քրոմատոգրաֆիական գործընթացները: Նա կարողացել է բաժանել և անջատել տերևների պիգմենտները առանց որևէ քիմիական փոփոխության, ինչի շնորհիվ այն հնարավոր էր օգտագործել բնութագրման նպատա-

կով: Ցվետը նկարագրել է այս եղանակը և ընդգծել նրա կարևորությունը անալիտիկ քիմիայի համար:

«Անալիզ» հունարեն թարգմանաբար նշանակում է բաժանում: Այլ կերպ անալիզ իրականացվում է ինչ-որ բան բաժանելու և կազմությունն ուսումնասիրելու նպատակով: Քրոմատոգրաֆիական մեթոդով հետազոտվող նմուշը բաժանվում է բաղադրիչ մասերի, բայց ոչ թորման, լուծամզման կամ նստեցման եղանակով: Քրոմատոգրաֆիան հիմնված է երկու միմյանց հետ չխառնվող ֆազերի միջև նյութերի բաժանման սկզբունքի վրա: Այն դեպքում, երբ ֆազերից մեկը պինդ է, նյութերի բաշխման պրոցեսն անվանում են ադսորբցիա: Ադսորբցիան նյութերի նպատակային կոնցենտրացումն է պինդ ֆազի վրա, որն անվանում են ադսորբենտ: Տարբեր քիմիական նյութեր կոնցենտրացվում են ադսորբենտի վրա տարբեր չափով, ինչն էլ ընկած է նրանց բաժանման հիմքում:

ԲԱՀՔ եղանակը աշտարակային քրոմատոգրաֆիայի տարատեսակ է, որտեղ անշարժ ֆազը պինդ սորբենտն է, իսկ շարժուն ֆազը՝ հեղուկ, որը բարձր ճնշման տակ մղվում է աշտարակ: Սորբենտի մասնիկների չափսերը կազմում են 3-10 մկմ: Մասնիկների չափսերի փոքրացումը և դրանց արդյունավետ մակերեսի մեծացումը, ինչպես նաև աշտարակում հավասարաչափ բաշխումն ապահովում են բաղադրիչների բաժանման բարձր արդյունավետությունը: Եվ քանի որ սորբենտի նման փաթեթավորումը դանդաղեցնում է շարժուն ֆազի տեղաշարժը, այն մղում են բարձր ճնշման տակ (200-500 մթն.):

Հեղուկային քրոմատոգրաֆի հիմնական աշխատանքային հանգույցները

Որպեսզի հեղուկ քրոմատոգրաֆիան կարողանա ծառայել անալիտիկ քիմիայի խնդիրները լուծելուն, անհրաժեշտ է փոքրացնել օգտագործվող ադսորբենտի չափերը մինչև 10 մկմ (0.01 մմ): Նման ադսորբենտներ հասանելի դարձան միայն անցած դարի 70-ական թվականներին: Մանր չափերով ադսորբենտների կիրառումը հեղափոխություն մտցրեց հեղուկ քրոմատոգրաֆիական եղանակով նյութերի բաժանման տեխնիկայում:

Որպեսզի հեղուկը (էլուենտը) կարողանա անցնել 15-25 սմ երկարություն ունեցող բաժանիչ աշտարակի միջով, որտեղ ադսորբենտի չափերը մոտ 3-5 մկմ են (անալիտիկ քրոմատոգրաֆիական աշտարակ), անհրաժեշտ է ստեղծել մոտ 100-200 մթն. ճնշում: Նման ճնշում ստեղծել հնարավոր է միայն հատուկ և բավական թանկարժեք մխոցային համակարգի միջոցով, որը կոչվում է բարձր ճնշման մխոց:

Բարձր ճնշումային հեղուկ քրոմատոգրաֆիան ստացավ *բարձր արդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիա* անվանումը՝ HPLC (high performance liquid chromatography):

ԲԱՀՔ համակարգի կազմի մեջ մտնում են հետևյալ հիմնական հանգույցները.

- ✓ շարժուն ֆազի հարթակ, որը ներառում է լուծիչներով լցված տարաներ և գազազերծման համակարգ,
- ✓ մխոցային համակարգ,
- ✓ շարժուն ֆազի խառնիչներ,
- ✓ նմուշի ներարկման համակարգ, ինժեկտոր, որը կարող է լինել մեխանիկական կամ ավտոմատ,
- ✓ քրոմատոգրաֆիական աշտարակ, որը տեղադրվում է թերմոստատում,

- ✓ դետեկտոր,
- ✓ քրոմատոգրաֆի ղեկավարման, տվյալների հավաքման և մշակման հանգույց:

Բացի նշված հիմնական հանգույցներից քրոմատոգրաֆի կազմի մեջ կարող է մտնել նաև նմուշապատրաստման հանգույց, աշտարակների փոխման համակարգ, նախաաշտարակային հանգույց և այլն:

Միխցային համակարգ

Միխցները ապահովում են շարժուն ֆազի հոսքը քրոմատոգրաֆիական աշտարակ: Շարժուն ֆազի բաղադրությունը և հոսքի արագությունը կարող են լինել հաստատուն կամ փոխվել ժամանակի ընթացքում: Շարժուն ֆազի կայուն բաղադրության դեպքում պրոցեսն անվանում են իզոկրատիկ, իսկ երկրորդ դեպքում՝ գրադիենտային: Ժամանակակից միխցային համակարգը կազմված է մեկ կամ մի քանի միխցներից, որոնք ղեկավարվում են համակարգչի կողմից, որը թույլ է տալիս փոխել շարժուն ֆազի կազմը՝ համաձայն որոշակի ծրագրի՝ գրադիենտային էլուցման դեպքում: Միխցային համակարգը թույլ է տալիս ապահովել հոսքի արագություն 0.1-10 մլ/րոպե միջակայքում, 40 ՄՊա ճնշման դեպքում: Միխցային համակարգի պուլսացիան կարգավորվում է հատուկ համակարգերով, իսկ դետալները պատրաստված են հակակոռոզիոն նյութերից, ինչը թույլ է տալիս շարժուն ֆազի կազմում օգտագործել «ագրեսիվ» լուծիչներ:

Խառնիչ

Խառնիչում տեղի է ունենում միասնական շարժուն ֆազի առաջացում առանձին լուծիչներից: Խառնիչում առանձին լուծիչնե-

րի խառնում կարող է տեղի ունենալ ինչպես մինչև մխոց՝ ցածր ճնշման պայմաններում, այնպես էլ մխոցից հետո՝ բարձր ճնշման տակ:

Ինժեկտոր

Ինժեկտորները կարող են լինել ունիվերսալ նմուշի ներարկվող ծավալի փոփոխությամբ կամ դիսկրետ՝ միայն որոշակի ծավալ ներարկելու հնարավորությամբ: Ինժեկտորը տեղակայված է աշտարակից առաջ, որի կառուցվածքը թույլ է տալիս փոխել շարժուն ֆազի հոսքի ուղղությունը:

Ժամանակակից ինժեկտորները կարող են օժտված լինել լրացուցիչ ֆունկցիաներով, ինչպիսիք են նմուշապատրաստումը՝ նմուշների խառնում, նոսրացում, դերիվատների ստացում:

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակ

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակներն իրենցից ներկայացնում են չժանգոտվող մետաղից պատրաստված ծավալներ, որոնք լցված են սորբենտով և երկու կողմից փակված են 2-5 մկմ տրամագծով ֆիլտրերով: Անալիտիկ աշտարակի երկարությունը կարող է տատանվել 5-60 սմ-ի սահմաններում, իսկ տրամագիծը՝ 2-10 մմ: 2 մմ-ից փոքր տրամագծով աշտարակներն օգտագործվում են միկրոաշտարակային քրոմատոգրաֆիայում: Գոյություն ունեն նաև մազանոթային աշտարակներ՝ 0.3-0.7 մմ ներքին տրամագծով: Պրեպարատիվ քրոմատոգրաֆիայում կիրառվող աշտարակները կարող են ունենալ 50 մմ և ավելի տրամագիծ: Անալիտիկ աշտարակից առաջ կարող են տեղադրվել կարճ աշտարակներ՝ նախաաշտարակներ, որոնց հիմնական դերը աշտարակի «պաշտպանությունն» է:

Հիմնականում հետազոտություններն իրականացնում են սենյակային ջերմաստիճանում, սակայն անալիզի տևողության կրճատման և բաժանման ինտենսիվության բարձրացման համար կարող են կիրառվել աշտարակային թերմոստատներ 80-100 °C: Բարձր ջերմաստիճանի կիրառումը սահմանափակվում է անշարժ ֆազի հնարավոր քայքայման պատճառով:

Անշարժ ֆազ կամ սորբենտ

Որպես սորբենտ՝ հիմնականում օգտագործում են՝

- սիլիկագել, ալյումինի օքսիդ, որոնք օգտագործվում են նորմալ ֆազային քրոմատոգրաֆիայում: Պահման մեխանիզմները տվյալ դեպքում սովորաբար ադսորբցիոն են,
- սիլիկագել կամ խեժեր, որոնց միացված են թթվային կամ հիմնային խմբեր, կիրառվում է իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայում,
- սիլիկագել կամ պոլիմերներ, որոնք ունեն անցքերի որոշակի չափսեր՝ էքսկլյուզիոն քրոմատոգրաֆիա,
- քիմիապես մոդիֆիկացված սորբենտներ, որոնք հաճախ ստացվում են սիլիկագելի հիման վրա: Պահման մեխանիզմը՝ ադսորբցիա կամ բաշխում շարժուն ֆազի (ՇՖ) և անշարժ ֆազի (ԱՖ) միջև: Կիրառման ոլորտը պայմանավորված է միացված խմբերի բնույթով:
- քիմիապես մոդիֆիկացված քիրալային սորբենտներ, օր.՝ ցելյուլոզի, ամիլոզի ածանցյալներ, սպիտակուցներ, պեպտիդներ, ցիկլոդեքստրիներ, խիտոզան, օգտագործվում են էնանտիոմերների բաժանման համար:

Հաճախ սորբենտին միացման համար օգտագործվում են հետևյալ խմբերը՝

- ✓ օկտադեցիլ խմբեր [$Si-(CH_2)_{17}-CH_3$] (օկտադեցիլ սիլան (ODS) կամ C_{18}),
- ✓ օկտիլ խմբեր [$Si-(CH_2)_7-CH_3$] (օկտիլսիլիլ կամ C_8),
- ✓ ֆենիլային խմբեր [$Si-(CH_2)_n-(C_6H_5)$] (սորբենտ՝ ֆենիլսիլան),
- ✓ ցիանպրոպիլային խմբեր [$Si-(CH_2)_3-CN$] (սորբենտ՝ CN),
- ✓ ամինոպրոպիլային խմբեր [$Si-(CH_2)_3-NH_2$] (սորբենտ՝ NH_2),
- ✓ դիոլային խմբեր [$Si-(CH_2)_3-OCH(OH)-CH_2-OH$] (սորբենտ դիոլ):

Առավել հաճախ անալիզներն իրականացնում են ոչ պոլյար սորբենտներով հետադարձ ֆազային ռեժիմով, C18 սորբենտների կիրառմամբ:

Միացված խմբերով սորբենտը ստացվում է սիլիկագելի հիման վրա և քիմիապես կայուն է pH-ի 2-7 տիրույթում, եթե արտադրողի կողմից այլ տվյալներ նշված չեն: Անալիտիկ աշտարակներում սորբենտի չափսերը տատանվում են 3-10 մկմ, իսկ պրեպարատիվ աշտարակներում՝ 50 մկմ:

Դետեկտորներ

ԲԱՀՔ-ում կիրառվում են դետեկցման տարբեր եղանակներ: ՇՖ-ը լուծիչներով և նրանում լուծված միացություններով աշտարակից հետո անցնում է դետեկտորի խցիկ, որտեղ անընդհատ չափվում է նրա այս կամ այն հատկությունը (կլանումը ՈՒՄ կամ տեսանելի մարզում, ֆլյուրեսցենցիան կամ էլեկտրահաղորդականությունը և այլն): Ստացված քրոմատոգիրը իրենից ներկայացնում է տվյալ միացության որոշակի ֆիզիկաքիմիական հատկության կախվածությունը ժամանակից:

Առավել տարածված են ՈւՄ կլանման դետեկտորները, որոնք չափում են քրոմոֆոր խմբեր պարունակող միացությունների կողմից ճառագայթների աբսորբցիան: ՈՒՄ դետեկտորները թույլ են տալիս իրականացնել հետազոտություն 190-900 նմ ալիքի երկարության տակ: Կիրառվում են նաև մուլտիալիքային դետեկտորներ, որոնք թույլ են տալիս միաժամանակ մի քանի ալիքի տակ իրականացնել հետազոտությունը, ինչպես նաև դիոդկաղապարային դետեկտորներ, որոնք հնարավորություն ունեն գրանցել օպտիկական խտությունը միաժամանակ ամբողջ աշխատանքային տիրույթում՝ 190-950 նմ:

Նշված դետեկտորներում ուլտրամանուշակագույն և տեսանելի ալիքների ճառագայթման աղբյուր է հանդիսանում դեյտերիումային լամպը: Ֆլյուրեսցենտային դետեկտորները կիրառվում են ֆլյուրեսցեցվող միացությունների կամ չֆլյուրեսցենցվող միացությունների ֆլյուրեսցենցվող ածանցյալների որոշման համար: Կլանումը սովորաբար տեղի է ունենում ուլտրամանուշակագույն տիրույթում, ֆլյուրեսցենցվող ճառագայթման ալիքի երկարությունը սովորաբար գերազանցում է կլանման ալիքի երկարությանը: Ֆլյուրեսցենտային դետեկտորների զգայունությունը գրեթե 1000 անգամ գերազանցում է սպեկտրոֆոտոմետրիկ դետեկտորների զգայունությանը:

Այն միացությունների համար, որոնք ունեն թույլ կլանում ուլտրամանուշակագույն և տեսանելի մարզերում, կիրառվում են ռեֆրակտոմետրիկ դետեկտորներ: Այս դետեկտորների աշխատանքային սկզբունքը հիմնված է շարժուն ֆազի բեկման ցուցիչի փոփոխության գրանցման վրա: Դրանց թերությունը շատ ցածր զգայունությունն է, ինչպես նաև դրանց կիրառման անհնարինությունը գրադիենտային էլուցման ժամանակ:

ԲԱՀՔ համակարգերում կիրառվում են նաև ամպերմետրիկ դետեկտորներ էլեկտրոակտիվ միացությունների դետեկցման

համար, կոնդուկտոմետրիկ՝ իոնային քրոմատոգրաֆիայում անիոնների և կատիոնների դետեկցման համար, մասսսպեկտրոմետրիկ դետեկտորներ և այլն:

Շարժուն ֆազ

ՇՖ-ն ԲԱՀՔ համակարգում կատարում է կրկնակի գործողություն՝ ապահովում է դեսորբված մոլեկուլների տեղաշարժը աշտարակով և կարգավորում է հավասարակշռության հաստատումը, հետևաբար նաև միացությունների պահումը անշարժ ֆազի հետփոխազդեցության արդյունքում: Այսպիսով, փոխելով ՇՖ-ի կազմը՝ կարելի է ազդել պահման ժամանակի, ընտրողականության և բաժանման արդյունավետության վրա: ՇՖ-ն կարող է կազմված լինել մեկ, հաճախ երկու, երբեմն երեք լուծիչներից: ՇՖ-ի բաղադրությունը նշվում է որպես նրա մեջ մտնող լուծիչների ծավալային հարաբերություն: Որպես ՇՖ-ի բաղադրիչ կարող են օգտագործվել բուֆերային համակարգեր pH-ի որոշակի արժեքով, տարբեր աղեր, թթուներ, հիմքեր և այլ մոդիֆիկատորներ:

Միացությունների բաժանման արդյունավետության բարձրացման համար օգտագործվում են ջրային լուծույթներ pH-ի որոշակի արժեքով, ինչպես նաև որոշակի հավելումներ՝ ֆոսֆորական թթու, քացախաթթու՝ թթվային բնույթի միացությունների բաժանման դեպքում, և ամյակ կամ ալիֆատիկամիններ՝ հիմնային բնույթի միացությունների բաժանման դեպքում:

Քրոմատոգրաֆիական անալիզի վրա առավել մեծ ազդեցություն ունեն լուծիչների մաքրությունը. այդ պատճառով օգտագործվող լուծիչների վրա պետք է մակնշված լինի՝ ԲԱՀՔ կիրառության համար:

ՇՖ-ն և անալիզվող լուծույթները չպետք է պարունակեն չլուծվող մասնիկներ և օդային պղպջակներ: Բոլոր լուծիչները և

բուֆերային համակարգերը ենթարկվում են ֆիլտրման և դեգազացման: Դրա համար կիրառում են վակուում ֆիլտրման համակարգեր թաղանթային ֆիլտրերով, որոնք ունեն 0.2-0.45 մկմ անցքերի մեծություն:

Տվյալների հավաքագրման և մշակման ժամանակակից համակարգն իրենից ներկայացնում է համակարգչային բլոկ՝ իր ծրագրային ապահովմամբ, որը թույլ է տալիս գրանցել և մշակել քրոմատոգիրը, ինչպես նաև կառավարել քրոմատոգրաֆի աշխատանքը և հետևել աշխատանքային ցուցանիշներին:

ԲԱՀՔ-ի առավելություններն են՝

- ունիվերսալություն
- բաժանման բարձր ինտենսիվություն
- մեթոդի բարձր զգայունություն
- միացությունների բաժանման և տվյալների մշակման ավտոմատացված համակարգ:

ԲԱՀՔ մեթոդը զերծ չէ նաև թերություններից՝

- սարքավորման թանկարժեքություն
- մեծ քանակությամբ լուծիչների օգտագործում և թափոնների գոյացում:

Շարժուն և անշարժ ֆազերի բնույթից ելնելով՝ տարբերում են նորմալ-ֆազային և հետադարձ ֆազային քրոմատոգրաֆիաներ: Նորմալ-ֆազային ԲԱՀՔ-ի դեպքում անշարժ ֆազը բևեռային է (հաճախ սիլիկագել կամ սիլիկագել միացված -NH_2 կամ CN-խմբերով և այլն), իսկ շարժուն ֆազը ոչ բևեռային (հեքսան կամ հեքսանի խառնուրդ այլ բևեռային օրգանական միացությունների հետ՝ քլորոֆորմ, սպիրտամին և այլն):

Միացության պահումը մեծանում է պոլյարության մեծացմանը զուգընթաց:

ՀՖ ԲԱՀՔ-ի դեպքում անշարժ ֆազը ոչ պոլյար է (հիդրոֆոբ սիլիկագել միացված C4,C8, C18 խմբերով), շարժուն ֆազը՝ բևե-

ռային (ջրի և բևեռային լուծիչների խառնուրդ՝ ացետոնիտրիլ, մեթանոլ, տետրահիդրոֆուրան և այլն): Միացության պահումը մեծանում է հիդրոֆոբության մեծացմանը զուգահեռ (ոչ բևեռային): Ինչքան շատ է օրգանական լուծիչների պարունակությունը շարժուն ֆազում, այնքան մեծ է նրա էլուցիոն հատկությունները:

Աշտարակային քրոմատոգրաֆիայի տարատեսակները

Աշտարակային քրոմատոգրաֆիայի տարատեսակներն են՝ *ադսորբցիոն քրոմատոգրաֆիա (Adsorption chromatography), բաշխումային քրոմատոգրաֆիա (Partition chromatography), իոնափոխանակային (Ion exchange chromatography), էքսկլյուզյոն քրոմատոգրաֆիա (Molecular exclusion chromatography) և աֆինային քրոմատոգրաֆիա (Affinity chromatography):*

Ադսորբցիոն քրոմատոգրաֆիա:

Ադսորբցիոն քրոմատոգրաֆիան քրոմատոգրաֆիայի ամենահին տեսակներից մեկն է: Այս դեպքում անշարժ ֆազը լավ մանրացված պինդ նյութ է, որն ընտրվում է այնպես, որպեսզի ապահովվի նմուշի բաղադրամասերի դիֆերենցված փոխազդեցությունը: Դասական ԱՔ-ում կիրառում են սիլիկագել (թույլ թթվային), ալյումինի օքսիդ (թույլ հիմնային) և այլն: Ոչ մեծ քանակությամբ բևեռային խմբերով միացություններն ավելի երկար պահվում են բևեռային ադսորբենտների վրա և էլուցվում են ամենավերջում, իսկ ոչ բևեռային նյութերը էլուցվում են առաջին հերթին: Ադսորբցիոն քրոմատոգրաֆիայի դեպքում լուծված նյութի մոլեկուլների և լուծիչի մոլեկուլների միջև առաջանում է մրցակցություն ադսորբենտի ակտիվ կետերի նկատմամբ:

ԱՔ-ով իրականացվում են ոչ բևեռային արոմատիկ կամ ալիֆատիկ միացությունների, ճարպալույծ վիտամինների, լիպիդների, կարոտինների և այլ դասի նյութերի բաժանում:

Բաշխումային (հեղուկ-հեղուկային) քրոմատոգրաֆիա:

Քրոմատոգրաֆիայի այս տեսակում շարժուն ու անշարժ ֆազերն իրենցից ներկայացնում են երկու իրար չխառնվող կամ մասնակի խառնվող հեղուկներ: ԲՔ-ի անշարժ ֆազն իր պարզագույն տեսքով ներկայացնում է հեղուկով ծածկված պինդ կրիչ, որը պետք է լինի հնարավորինս չեզոք, ունենա մեծ մակերես, որպեսզի կարողանա առավելագույն քանակությամբ հեղուկ պահել մակերևույթին: Պինդ կրիչի օրինակ են սիլիկագելը, օսլան, ցելյուլոզը:

Իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիա:

Իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի դեպքում միացությունները դիսոցված են իոնների, և բաժանումը պայմանավորված է դրանց և անշարժ ֆազի իոնների միջև էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությամբ: Այս դեպքում անշարժ ֆազը պարունակում է դրական կամ բացասական լիցքավորված ֆունկցիոնալ խմբեր, և պահումը տեղի է ունենում ոչ թե մոլեկուլյար ադսորբցիայի, այլ տարբեր լիցքերով լիցքավորված իոնների էլեկտրոստատիկ փոխազդեցության արդյունքում: Անշարժ ֆազը (իոնափոխանակիչը) պարունակում է ֆիքսված ֆունկցիոնալ խմբեր, որոնք լիցքավորված են կամ դրական, կամ բացասական լիցքերով: Առանձին բաղադրիչների իոնները կարող են տեղակալվել ուրիշ իոններով կամ էլ դուրս մղվել էլուենտի մեջ գտնվող սորբենտի իոնոգեն խմբերի հակաիոններով կամ էլուենտի մեջ հատուկ այդ նպատակով մտցված իոններով: Այս դեպքում խառնուրդի բաղադրիչների բաժանման հնարավորությունը պայմանավորված է դրանց գումարային լիցքերի արժեքների տարբերությամբ: Վերջիններս պայմանավորված են մոլեկուլի մեջ իոնոգեն խմբերի թվով և

բնույթով, ինչպես նաև դրանց դիսոցման աստիճանով, որով կարելի է կարգավորել էլուենտի իոնային ուժը և pH-ը:

ԻՔ-ն կիրառում են ամինաթթուների, շաքարների, ալկալոիդների, սպիտակուցների, բազմաթիվ դեղերի, թթուների, իոնացվող միացությունների բաժանման համար:

Մոլեկուլ-էկսկլյուզիոն քրոմատոգրաֆիա:

Քրոմատոգրաֆիայի այս տեսակը հայտնի է նաև ժել-ֆիլտրացիա անվանումով, որտեղ չկա փոխազդեցություն ստացիոնար ֆազի և լուծված նյութի մինչև: Այս դեպքում անշարժ ֆազը սորբենտ է, որում ծակոտիների չափերը համարժեք են բաժանվող նյութի մոլեկուլների չափերին: Այդ պատճառով ավելի խոշոր մոլեկուլներն անցնում են աշտարակի միջով մեծ արագությամբ, քան փոքր մոլեկուլները և աշտարակից էլուցվում են ամենասկզբում:

Էքսկլյուզիոն քրոմատոգրաֆիան լայնորեն կիրառվում է մակրոմոլեկուլների՝ սպիտակուցների և ածխաջրերի բաժանման համար:

Աֆինային քրոմատոգրաֆիա:

Այն գործնականում կիրառվող քրոմատոգրաֆիաների ամենաընտրողական տեսակն է, որը հիմնված է լուծված նյութի և անշարժ ֆազի վրա գտնվող լիգանդի միջև յուրահատուկ դարձելի փոխազդեցության վրա: Աֆինային քրոմատոգրաֆիան կարելի է դիտարկել որպես ադսորբումային քրոմատոգրաֆիայի տարատեսակ: ԱՔ-ում, սովորաբար, որպես անշարժ ֆազեր կիրառվում են լիգանդներ: Այդ լիգանդները կարող են լինել հակամարմիններ, ֆերմենտների ինհիբիտորներ, որոնք ընտրողաբար և դարձելի կապվում են անալիզվող նմուշում նյութի համապատասխան մոլեկուլների հետ: Բաժանման մեխանիզմը հիմնված է կենսաբանական համակարգի «բանալի-կողպեք» սկզբունքի վրա: Լիգանդի ընտրությունը պայմանավորված է բաժանման ենթակա

մոլեկուլի բնույթով: Այն նստեցնում են համապատասխան կրիչի վրա, որի հիման վրա պատրաստված աշտարակով անցկացնում են նմուշը, որից մոլեկուլները խիստ ընտրողաբար կապվում են լիգանդի հետ, իսկ մյուս մոլեկուլները չեն ադսորբվում լիգանդի կողմից և էլուցվում են շարժուն ֆազով: Աֆինային քրոմատոգրաֆիան բացի սպիտակուցների և ֆերմենտների բաժանումից և մաքրումից, կիրառվում է նաև մեծ մոլեկուլային կառուցվածքների՝ բջիջների, օրգանելների, վիրուսների բաժանման համար:

Քիրալային քրոմատոգրաֆիայի դեպքում տեղի է ունենում էնանտիոմերների բաժանում, որն իրականացվում է քիրալային սորբենտների վրա:

Քիրալային քրոմատոգրաֆիայի նպատակը օպտիկական իզոմերների բաժանումն է: Բաժանումն իրականացվում է քիրալային անշարժ ֆազի վրա կամ սովորական աքիրալ ֆազի վրա, քիրալային շարժուն ֆազերի կիրառմամբ: Որպես քիրալային անշարժ ֆազ՝ օգտագործում են մոդիֆիկացված սորբենտներ, որոնք ունեն քիրալային կենտրոններ (խիտոզաններ, ցիկլոդեքստրիններ, պոլիսախարիդներ, սպիտակուց և այլն): Այս դեպքում որպես շարժուն ֆազ կարող են օգտագործվել այն լուծիչները, որոնք օգտագործվում են նորմալ ֆազային կամ հետադարձ ֆազային քրոմատոգրաֆիաների դեպքում: Աքիրալ սորբենտների կիրառման դեպքում էնանտիոմերների բաժանման համար շարժուն ֆազի մեջ ավելացնում են քիրալային մոդիֆիկատորներ՝ մետաղների քիրալային կոմպլեքսներ, չեզոք քիրալային լիգանդներ և այլն:

Գերբարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիա (ԳԲԱՀՔ):

ԳԲԱՀՔ-ը հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի տարատեսակ է, որը առանձնանում է իր արդյունավետությամբ: Հիմնական առանձնահատկությունը 1,5-2 մկմ չափսերով սորբենտների կիրա-

ռությունն է, իսկ կիրառվող քրոմատոգրաֆիական աշտարակնե-
րի չափերը տատանվում են 50-150 մմ երկարության և 1-4 մմ լայ-
նության սահմաններում, նմուշի ներարկվող ծավալը կարող է
կազմել 1-50 մկլ: Նման աշտարակների կիրառումը հնարավորու-
թյուն է տալիս զգալիորեն կրճատել անալիզի տևողությունը, լու-
ծիչների ծախսը և բարձրացնել քրոմատոգրաֆիական բաժան-
ման արդյունավետությունը: Սակայն այս դեպքում աշտարակի
վրա ընկնող ճնշումը կարող է հասնել 80-120 ՄՊա: Քրոմատոգ-
րաֆիական համակարգը և աշտարակները՝ իրենց տեխնիկական
ցուցանիշներով, հատուկ նախատեսված են գերբարձր ճնշու-
մային պայմաններում աշխատելու համար:

Միացությունների բաժանման եղանակները

Քրոմատոգրաֆիայի հնարավորությունները, որպես միացու-
թյունների անալիտիկ հետազոտության եղանակ, կախված է
բարդ խառնուրդն առանձին բաղադրիչների բաժանման հնարա-
վորության հետ: Դրանից կախված է հետազոտության արդյունա-
վետությունը կամ ընդհանրապես հետազոտության հնարավո-
րությունը:

Պակաս կարևոր չէ նաև անալիզի տևողությունը: Այլ ձևա-
կերպմամբ քրոմատոգրաֆիայի կարևորագույն պահանջն է
ստանալ հնարավորինս շատ բաժանում, հնարավորինս կարճ
ժամանակամիջոցում:

Բաժանման արդյունքների գրաֆիկական պատկերումը ան-
վանում են քրոմատոգիր, որը դետեկտորի ազդանշանի կախվա-
ծությունն է էլուցիայի ժամանակից: Քրոմատոգրումը սկսվում է
նմուշի ներարկման պահից և կարող է դադարեցվել ցանկացած
ժամանակ: Յուրաքանչյուր առանձին նյութ, որը գրանցվում է դե-
տեկտորի կողմից, քրոմատոգրի վրա պատկերվում է պիկի տես-

քով, որն իրենից ներկայացնում է էլուցվող նյութի կոնցենտրացիայի կախվածությունը էլուցման ժամանակից: Պիկի մակերեսը համամասնական է նմուշում նյութի կոնցենտրացիային: Նյութի հիմնական բնութագիրը տվյալ քրոմատոգրի վրա նրա պահման ժամանակն է աշտարակում, որը կարող է արտահայտվել տարբեր մեծություններով: Անմիջապես քրոմատոգրից, պիկի մաքսիմումից որոշվում է նրա պահման ժամանակը՝ t_R: Պահման ծավալը (V_R) հավասար է պահման ժամանակի և շարժուն ֆազի ծավալային արագության արտադրյալին.

$$V_R = t_R V \tag{1}$$

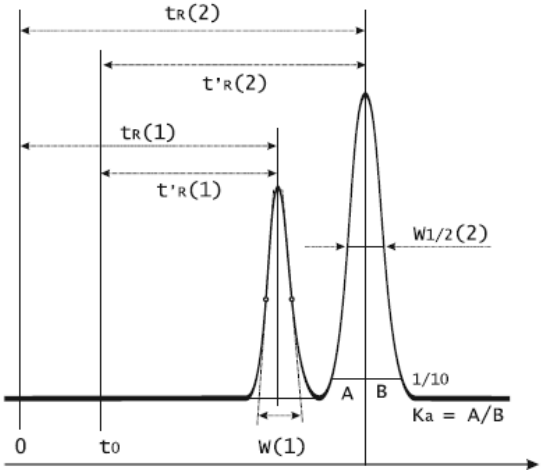
Միացությունների պահումը և բաժանումը քրոմատոգրաֆիական համակարգում:

Քննարկենք քրոմատոգրաֆիական որոշ հասկացություններ և ցուցանիշներ:

Ենթադրենք՝ նմուշում կա միացություն, որը չի ադսորբվում աշտարակի վրա, այսինքն՝ չի պահվում ընտրված պայմաններում: Սակայն տվյալ միացությունը անմիջապես դուրս չի գալիս անալիզի սկզբնական պահին. դրան անհրաժեշտ է էլուենտի հետ անցնել որոշակի ուղի, որը կպահանջի որոշակի ժամանակ: Այդ ժամանակը կոչվում է զրոյական կամ «մեռյալ» ժամանակ: Այսպիսով, զրոյական ժամանակ (t_0) կոչվում է այն ժամանակը, որի ընթացքում չսորբվող միացությունը անցնում է քրոմատոգրաֆիական համակարգի միջով՝ սկսած ներարկման հանգույցից մինչև դետեկտորի կյուվետը: Զրոյական ծավալը (v_0) մոտավորապես հավասար է կապիլյարների ներսով հոսող շարժուն ֆազի (v_c) ծավալի 70 %-ին:

Զրոյական ծավալը որոշվում է զրոյական ժամանակի և էլուենտի տրման ծավալային արագության արտադրյալով.

$$V_0 = t_0 V \tag{2}$$



Նկար 1. Քրոմատոգիրը բնութագրող որոշ ֆիզիկական ցուցանիշներ

Որտեղ՝

t_0-զրոյական ժամանակ,

$t_R(1)$- առաջին պիկի պահման ժամանակ,

$t'_R(1)$- առաջին պիկի ճշտված պահման ժամանակ,

w (1)- առաջին պիկի հիմքի լայնություն,

$w_{1/2}(2)$- երկրորդ պիկի բարձրության կեսի լայնություն:

Բերված t'_R պահման ժամանակը իրենից ներկայացնում է նյութի պահման ժամանակի և զրոյական ժամանակի տարբերությունը.

$$t'_R = t_R - t_0 \qquad (3)$$

Որպես օրինակ՝ նշենք, որ 250x4.6 մմ չափերով քրոմատոգրաֆիական աշտարակների համար 2մլ/ր էլուենտի հոսքի արագության դեպքում զրոյական ժամանակը մոտավորապես 1.3 բոպե մեծությունն է:

Ինչպես երևում է նկարից, քրոմատոգիրը ունի բազային գիծ: Այն համապատասխանում է ժամանակի այն միջակայքին, որի ընթացքում դետեկտորը ազդանշան է արձանագրում միայն շարժուն ֆազի համար: Քրոմատոգրի վրա առանձին պիկը նկարագրում է տվյալ նյութի կոնցենտրացիայի աստիճանական աճը աշտարակից դուրս գալիս, ինչպես նաև դրա աստիճանական նվազումը: Պիկի հիմնական ցուցանիշներից է համարվում պահման ժամանակը: Պահման ժամանակը կախված է նյութի բնույթից, հետևաբար այն կարող է ծառայել որպես որակական բնութագիր: Պահման ժամանակի արժեքը, բացի նյութի բնույթից, կախված է նաև տարբեր փորձարարական ցուցանիշներից, ինչպիսիք են՝ աշտարակի ջերմաստիճանի տատանումները, էլուենտի հոսքի արագությունը և ճնշումը, աշտարակում սորբենտի խտությունը և այլն: Արդյունքում, հետազոտվող նմուշում նյութերի նույնականացումը կատարվում է կամ ստանդարտ (էտալոնային) նմուշների հետ համեմատման եղանակով, կամ համեմատական պահման եղանակով:

Միացության պահման գործակիցը (K’) իրենից ներկայացնում է նյութի պահման ժամանակի հարաբերությունը զրոյական ժամանակին.

$$K' = \frac{t'_R}{t_0} \tag{4}$$

Պահման գործակցի կարևորությունն այն է, որ պահման ժամանակը, որը չափվում է վայրկյաններով, րոպեներով, խիստ կապված է քրոմատոգրաֆիական աշտարակի չափսերից և շարժուն ֆազի ծավալային արագությունից, իսկ պահման գործակիցը ոչ մի կերպ դրանցից կախված չէ: Դա չափողականություն չունեցող մեծություն է և տվյալ ադսորբենտի վրա տվյալ էլուենտի կիրառման դեպքում տվյալ նյութի պահման չափն է: Եվ եթե անալիտիկ քիմիայի խնդիրների համար բավարար է միայն պահման

ժամանակը, ապա տարբեր աշտարակների վրա տարբեր արդյունքների համեմատման համար օգտագործվում է միայն K'-ի արժեքները:

Քրոմատոգրաֆիայում միացությունների բաժանումը հնարավոր է միայն նրանց պահման ժամանակների տարբերության հաշվին: Երկու միացությունների բաժանման աստիճանը բնութագրվում է բաժանման (resolution) գործակցի արժեքով:

Երկու պիկերի բաժանման գործակիցը հաշվվում է քրոմատոգրից որպես երկու նյութերի պահման ժամանակների տարբերության հարաբերությունը պիկերի բարձրության կեսի լայնությունների գումարին.

$$R = 2(t_{R1} - t_{R2})/(W_1 + W_2) \qquad (5)$$

Եթե նյութերը չեն բաժանվում, ապա բաժանման գործակիցը հավասար է զրոյի, երբ բաժանման գործակիցը հավասար է 1-ի, ապա վերածածկվում է պիկերի մակերեսների ընդամենը 2%-ը, եթե իհարկե պիկերը սիմետրիկ են և ունեն գաուսյան կորի տեսք: Կարելի է համարել, որ եթե R-ը մեծ կամ հավասար է 1-ի, ապա պիկերը բաժանվում են մինչև բազային գիծը:

Պիկերի բաժանման վրա ազդող կարևոր գործոններից է նաև քրոմատոգրաֆիական աշտարակի արդյունավետությունը:

Արդյունավետությունը կարելի է հաշվել քրոմատոգրի վրա ցանկացած պիկով՝ համաձայն հետևյալ բանաձի.

$$N = 5.545\left(t_R/W_{1/2}\right)^2 \qquad (6)$$

Որտեղ՝

N-արդյունավետություն,

t_R-պահման ժամանակ,

$w_{1/2}$- պիկի բարձրության կեսի լայնություն:

Արդյունավետությունը չափողականություն չունեցող մեծություն է, քրոմատոգրաֆիայում այն անվանում են նաև տեսական հարթակների քանակ (plate number):

Անալիտիկ կիրառման համար աշտարակը բնութագրում են արդյունավետությամբ, իսկ երբ խոսքը քրոմատոգրաֆիայի տեսության մասին է, ապա օգտվում են դրա հակադարձ մեծությունից, որը անվանում են բարձրություն, որը համեմատական է թեորետիկ հարթակների քանակին (HETP, H).

$$H = L/N \tag{7}$$

Որտեղ՝

H-բարձրություն, որը համարժեք է թեորետիկ հարթակների քանակին, մմ,

L-աշտարակի երկարություն, մմ,

N-աշտարակի արդյունավետություն:

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակի արդյունավետության ֆորմալ որոշման գործընթացն անվանում են թեստավորում: Թեստավորումը իրականացվում է էլուենտի որոշակի ընդհանուր ընդունված հոսքի արագությամբ, որպես կանոն, 1 մլ/րոպե՝ 4.6 մմ շառավղով աշտարակների համար, և որոշակի ընդունված ադսորբատներով, օր.՝ տոլուոլ, նավթալին:

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակի արդյունավետությունը մեծապես կախված է նրա երկարությունից: Աշտարակի ադսորբենտով լցման որակի գնահատման համար օգտագործում են տեսակարար արդյունավետության ցուցանիշը, այսինքն՝ արդյունավետությունը վերցրած միավոր երկարության վրա: Ժամանակակից բարձրարդյունավետ աշտարակների համար տեսակարար արդյունավետության հիմքում ընկած տեսական հարթակների թիվը տատանվում է 80-230 հազար մեկ մետրում:

Դասական դեպքում պիկը պետք է ունենա գաուսյան կորի տեսք, սակայն գործնականում ոչ միշտ է այդպես, այս երևույթն

անվանում են պիկի ասիմետրիկություն, որը քրոմատոգրաֆիայում խիստ անցանկալի երևույթ է: Պիկի ասիմետրիկությունը գրաֆիկորեն արտահայտելու համար բազային գծին զուգահեռ պիկի 1/10-րդ բարձրության վրա կառուցում են ուղիղ, որին զուգահեռ են իջեցնում պիկի գագաթից, վերջինս բաժանում է պիկը երկու մասի (տե՛ս նկար 1):

Պիկի ասիմետրիկության հիմնական պատճառներից են քրոմատոգրաֆիական համակարգում ընթացող սորբցիայի և դեսորբցիայի գործընթացները:

Ժամանակակից ԲԱՀՔ համակարգերում աշտարակի առավելագույն թույլատրելի ծանրաբեռնվածությունը կազմում է 10մկգ 1գ սորբենտի հաշվարկով: Հետազոտվող նմուշի մեծ քանակների ներմուծումը աշտարակ հանգեցնում է բաժանման արդյունավետության անկման: Համարվում է, որ պիկի ասիմետրիկությունը չի ազդում բաժանման արդյունավետության վրա, եթե ասիմետրիայի գործակիցը չի գերազանցում 2-2.5-ը ($A_s = A/B$):

Անալիտիկ հետազոտությունների ժամանակ հիմնական խնդիրը պայմանավորված է նրանով, որ երբ պիկի ասիմետրիկությունը գերազանցում է թույլատրելի շեմը, խախտվում է էլուցվող միացության պիկի մակերեսի և կոնցենտրացիայի ուղիղ համեմատական կախվածությունը, ինչպես նաև երկարում է միացության պահման ժամանակը:

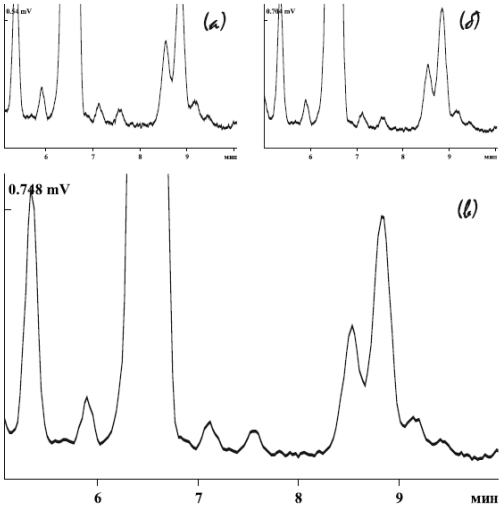
Առաջնային գործողությունները պիկի ասիմետրիկության վերացման ուղղությամբ կապված են քրոմատոգրաֆիական համակարգի ամբողջական փոփոխության հետ, մասնավորապես, էլուենտի կազմի և սորբենտի փոփոխություն:

Բազային գծի աղմուկների և տատանումների պատճառները, էլուետների հայտնաբերման և որոշման սահմանները:

Բազային գիծը դետեկտորի ֆոնային ազդանշանն է: Այն ունի ուղիղ գծի տեսք, եթե աշտարակից ոչինչ չի էլուցվում, կամ տվյալ դետեկտորը զգայուն չէ էլուցվող նյութերի նկատմամբ: Գործնականում բազային գիծը չունի ուղիղ գծի տեսք, ինչպես ցանկացած ազդանշան, որը ստացվում է էլեկտրական սարքավորումից, այն ունի աղմուկ, որը կարելի է բնութագրել որպես միջինացված բազային գծի շեղումը այս կամ այն ուղղությամբ: Բարձր հաճախականության աղմուկների հաճախականությունը որոշվում է միավոր ժամանակում քրոմատոգրի վրա եղած կետերով, որոնք իրենց հերթին կախված են երկու ցուցանիշներից՝ կամ ժամանակի հաստատունից (դետեկտորի ցուցանիշ), կամ տվյալների հավաքման հաճախականությունից: Դա այն հաճախականությունն է, ինչով թվային փոխարկիչը ընդունում է դետեկտորի ցուցանիշները: Ժամանակի հաստատունը այն ժամանակն է, երբ դետեկտորը կուտակում է տվյալներ, որը այնուհետև փոխանցվում է թվային փոխարկիչին: Որպես կանոն, եթե հնարավորություն կա փոխելու այս երկու ցուցանիշները, ապա կիրառվում է 10 Հց հաճախականություն և 0,1 վայրկյան հաստատուն ժամանակ, արդյունքում ստացվում է 10 կետ վայրկյանում: Ժամանակի հաստատունի մեծացումը բերում է աղմուկի ամպլիտուդի փոքրացմանը դետեկտորի ազդանշանի միջինացման հաշվին, սակայն տվյալների հավաքման հաճախականության փոփոխումը չի բերում աղմուկի ամպլիտուդի փոփոխության:

Բարձր հաճախականության աղմուկի պատճառ կարող են հանդիսանալ սարքի էլեկտրոնային ապահովման համակարգը, դետեկցվող միացությունը, լույսի աղբյուրը, դետեկտորի կյուվետը: Եթե աղմուկի տատանումները գերազանցում են նորմայով սահմանված չափը, ապա պետք է համոզվել, որ էլուենտները բա-

վականաչափ դեգազացված են, քանի որ միկրոպղպջակները հաճախ հանդիսանում են աղմուկի պատճառ. աղմուկի պատճառ կարող է հանդիսանալ լամպի անկայուն աշխատանքը, երբ անհրաժեշտություն կա այն փոխարինել նորով: Աղմուկ կարող է առաջանալ նաև էլեկտրական ցանցի տատանումներից, հատկապես, եթե սարքը չունի հողանցում: Աղմուկի ամպլիտուդը բնորոշվում է նրա ներքին և վերին սահմանների տարբերությամբ, պիկի բարձրության հարաբերությունը աղմուկի ամպլիտուդին կոչվում է ազդանշան/աղմուկ հարաբերություն:



Նկար 2. Քրոմատոգրի վրա աղմուկի դրսևորումը

Ազդանշան/աղմուկ հարաբերությունը հանդիսանում է կարևոր բնութագիր, որը ազդում է պիկի մակերեսի որոշման ճշտության վրա: Համարվում է, որ նյութի հայտնաբերման արդյունավետ պայմանները նպատակային պիկի եռակի գերազանցումն է աղմուկին: Ընտրված պայմաններում նմուշում նյութի կոնցենտ-

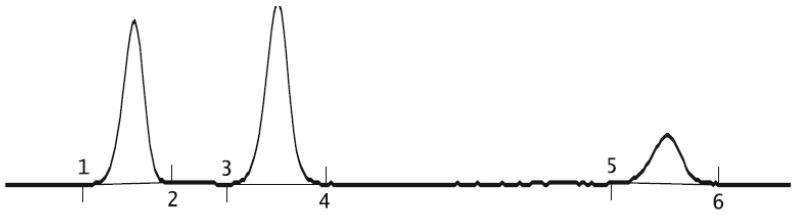
բացիան, որի դեպքում SN (աղմուկ/ազդանշան)=3, անվանում են հայտնաբերման սահման:

Քանակական որոշման կարևոր պայմանը նպատակային պիկի ազդանշանի տասնապատիկ գերազանցումն է աղմուկի ամպլիտուդին՝ SN ≥10:

Նյութի կոնցենտրացիան նմուշում, որի դեպքում ընտրված պայմաններում SN=10, կոչվում է տվյալ նյութի հայտնաբերման սահման:

Բացի բարձր հաճախականության աղմուկից քրոմատոգրի վրա կարող են երևալ նաև ցածր հաճախականության աղմուկներ, որոնք կապված են մխոցային համակարգի սխալ շահագործման հետ և մեծ ամպլիտուդի դեպքում կարող են դժվարացնել քանակական որոշումը:

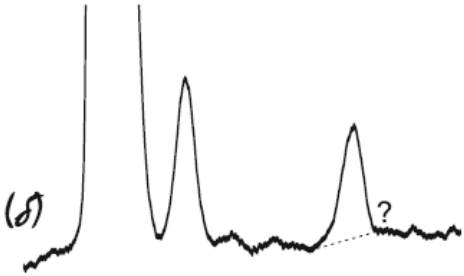
Բազային գծի շեղումը հորիզոնական ուղղությունից անվանում են դրեյֆ: Միացության քանակական անալիզի համար անհրաժեշտ է որոշել պիկի մակերեսը, կատարել ինտեգրում, որի համար պետք է սահմանել նրա սկիզբը և վերջը, իսկ համակարգչային ծրագիրը ավտոմատ կերպով կհաշվի մակերեսը: Ծրագիրը պիկի սկիզբը և վերջը միացնում է ուղիղ գծով, որը թվացյալ համապատասխանում է բազային գծին, որը կոչվում է պիկի հիմք:



Նկար 3. Պիկերի նշման օրինակ. 1,3,5՝ պիկի սկիզբ, 2,4,6՝ պիկի ավարտ

Այս դեպքում դժվարություններ չեն առաջանում պիկի սկիզբը և վերջը նշելու, մակերեսը ճիշտ հաշվելու ժամանակ, ինչով և պայմանավորված է քանակական որոշման ճշտությունը:

Սակայն, լինում են դեպքեր, երբ պիկի սկիզբը հորիզոնական բազային գծի մի մակարդակի վրա է, իսկ վերջը մեկ այլ, այսինքն՝ բազային գիծը գտնվում է պիկի տակ: Օրինակ՝



Դժվարությունը այն է, որ անհասկանալի է՝ որտեղ նշել պիկի ավարտը, որպեսզի քանակական որոշման ժամանակ սխալի տոկոսը նվազագույն լինի:

Կարող է լինել նաև ուժեղ գծային դրեյֆ, օրինակ՝

Երկու դեպքում էլ դժվար է նշել և՛ պիկի սկիզբը, և՛ վերջը: Որևէ թվային հաշվարկներով որոշել մակերեսը անհնար է. պետք է գտնել և վերացնել դրեյֆի պատճառը: Պատճառ կարող է հան-

դիսանալ էլուենտի կոնցենտրացիայի փոփոխությունը գրադիենտային էլուցման դեպքում, որոշ դետեկտորներ այնքան զգայուն են, որ պիտանի չեն գրադիենտային դետեկցման համար: ՈւՄ դետեկտորների համար դրեյֆի մեծությունը փոքր է 230 նմ-ից ցածր ալիքների դեպքում:

Աստիճանական դրեյֆը իզոկրատիկ էլուցման դեպքում պայմանավորված է մշակված բաժանման մեթոդի անարդյունավետության հետ, և հաճախ էլուցվող պիկը համադրվում է նախորդ անալիզներից էլուցվող ավելի լայն պիկերի հետ: Դրեյֆի ևս մեկ պատճառ կարող է հանդիսանալ նպատակային նյութի դեգրադացիան քրոմատոգրաֆիական անալիզի ընթացքում:

Որակական անալիզի հիմունքները: Միացությունների նույնականացման եղանակները: Նույնականացման կեղծ դրական և կեղծ բացասական արդյունքները

Որակական անալիզի արդյունքները կարող են լինել դրական (միացությունը հայտնաբերված է և նույնականացված) և բացասական (միացությունը հայտնաբերված չէ): Քրոմատոգրաֆիայում որակական անալիզի խնդիրը լուծվում է նմուշի քրոմատոգրում նպատակային նյութի պիկի բնութագրերի և մաքուր նպատակային նյութի, որը անվանում են ստանդարտ կամ ստանդարտ նմուշ, պիկի բնութագրերի համեմատությամբ: Նպատակային նյութի բացակայությունը հետազոտվող նմուշում ապացուցելը ավելի հեշտ է, քան նրա առկայությունը:

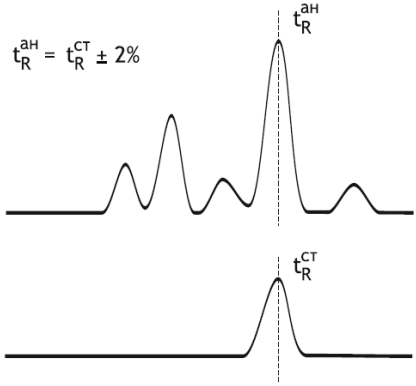
Բացակայությունն ապացուցելու համար բավարար է ընդգծել, որ քրոմատոգրի վրա բացակայում է տվյալ նպատակային նյութն իրեն համապատասխան էլուցման ռոպեին:

Այն բոլոր դեպքերում, երբ համապատասխան էլուցման ժամանակահատվածում քրոմատոգրի վրա առկա է պիկ, հնարավոր

է երկու տարբերակ՝ կամ ազդանշանը պատկանում է նպատակային նյութին, կամ ազդանշանը պատկանում է այլ նյութի, որն ունի գրեթե նույն հատկությունները: Ապացուցելու համար, որ այդ նյութերը՝ ստանդարտը և, այսպես կոչված, նպատակային նյութի թեկնածուն, տարբեր նյութեր են, անհրաժեշտ է, որ նրանք գոնե մեկ բնութագրով տարբերվեն:

Գործնականում, սակայն, կան ավելի մատչելի եղանակներ՝ նպատակային նյութի առկայությունը կամ բացակայությունը նմուշում հաստատելու համար:

Դրանցից կարելի է նշել նյութի պահման ժամանակի բնութագիրը, որը բավական ունիվերսալ բնութագիր է: Նրա կիրառության ապահովությունը իհարկե կախված է կրկնելիությունից: Այսինքն, եթե քրոմատոգրաֆիական բաժանման մեթոդը անցել է վալիդացիա, այսինքն՝ ճանաչվել է կայուն, ապա պահման ժամանակի միջին քառակուսային շեղումը անալիզների մեկ հաջորդականությունում չպետք է գերազանցի 0,2 %-ը: Սակայն գործնականում պահման ժամանակի շեղումը կարող է լինել և ավելին՝ մոտ 2 % իզոկրատիկ և ավելի քիչ՝ գրադիենտային էլուցիայի ժամանակ:



Նկար 4. Նյութի նույնականացումը ըստ պահման ժամանակի

Ինչպիսին էլ որ լինի կրկնելիությունը՝ բավարար, թե գերազանց, անհրաժեշտ է նյութի տվյալ հաջորդականության անալիզի ընթացքում հետևել պահման ժամանակի փոփոխություններին: Դա արվում է, որպեսզի ժամանակին հայտնաբերվի ցանկացած աշխատանքային խաթարում, որը կբերի արդյունքների անճշտության: Նման հսկողությունը իրականացվում է ստանդարտ նմուշի պարբերական անալիզի միջոցով: Անալիզի սկզբում իրականացվում է 1-3 ստանդարտ նմուշների անալիզ, իսկ վերջում՝ 1 ստանդարտ նմուշի անալիզ: Այս գործողությունը վերաբերում է ներլաբորատոր որակի հսկմանը (quality assurance/quality control, QA/QC):

Ինչ վերաբերում է նպատակային նյութի առկայության ժխտման գաղափարին, ապա պիկի բացակայությունը քրոմատոգրում բավարար և անհրաժեշտ պայման է ժխտման համար: Այնուամենայնիվ, երբ ժխտող արդյունքը հանդիսանում է անսպասելի է, այն կարելի է ստուգել նմուշի մեջ ավելացնելով ստանդարտ, սակայն նման որոշման կայացումը պետք է լինի տրամաբանական և անհրաժեշտ:

Դրական արդյունքի հաստատման համար պահման ժամանակը անհրաժեշտ, բայց ոչ բավարար պայման է: Քննարկենք իրավիճակ, երբ քրոմատոգրի վրա առկա է պիկ, որի պահման ժամանակը համընկնում է նպատակային նյութի պահման ժամանակի հետ: Հնարավոր տարբերակները երեքն են՝ 1) պիկը իսկապես նպատակային նյութի պիկն է, 2) պիկը պատկանում է այլ նյութի, որը շատ նման է պահման ժամանակով, 3) ուղղակի գործ ունենք երկու կամ ավելի պիկերի համադրման հետ, որոնցից մեկը նպատակային նյութի պիկն է:

Առաջին տարբերակը պարզ է: Պետք է ուշադիր նայել պիկի տեսքին. այն պետք է նման լինի գաուսյան կորի, եթե պիկի վրա կա ծնկանման հատվածներ, ամենայն հավանականությամբ այս-

տեղ գործ ունենք վերադրման հետ, նման դեպքում ո՛չ քանակական, ո՛չ որակական անալիզ հնարավոր չէ: Երկրորդ տարբերակում անհրաժեշտ է նմուշին ավելացնել ստանդարտ և կրկնել անալիզը, եթե քրոմատոգրում հայտվում է երկրորդ մաքսիմումը կամ փոխվում է պիկի տեսքը դեպի գաուսյան կորի ուղղությամբ, ապա գործ ունենք այլ նյութի պիկի հետ, որի պահման ժամանակը մոտ է նպատակային նյութի պահման ժամանակին: Հնարավոր է նաև անշարժ ֆազի փոփոխություն՝ պահպանելով քրոմատոգրման պայմանները՝ իսկությունը ապացուցելու նպատակով, որը համարվում է ավելի բարդ հետազոտություն, և բացառված չէ, որ այս դեպքում ևս կարող ենք ունենալ վերը նկարագրված շեղումները:

Երբեմն, բացի պահման ժամանակից, էլուցվող նյութերի որակական հետազոտության համար անհրաժեշտ են նաև այլ սպեկտրալ տվյալներ: Կան երկալիքային և բազմալիքային դետեկտորներ, որոնք ավելի ընդգրկուն սպեկտրալ տեղեկատվություն են տալիս էլուցվող նյութի մասին: Դրանցից են սկանավորող սպեկտրոֆոտոմետրիկ դետեկտորը, սպեկտրոֆոտոմետրիկ դետեկտոր դիոդային մատրիցայով, մասսսպեկտրոմետրիկ դետեկտոր և այլն:

Այն բոլոր դեպքերում, երբ առկա են կասկածներ նույնականացման ճշտության վերաբերյալ, օգտագործում են այսպես կոչված արբիտրաժային մեթոդ: Որպես արբիտրաժային մեթոդ՝ հեղուկային քրոմատոգրաֆիայում օգտագործում են ԲԱՀՔ համակարգ մասսսպեկտրոմետրիկ դետեկտորով:

Որակական նույնականացման սխալ արդյունքները կարելի է պայմանական բաժանել երեք խմբի՝ 1) կեղծ դրական, 2) կեղծ բացասական և 3) սխալ նույնականացման արդյունքներ: Եթե նպատակային նյութը առկա է նմուշում, սակայն այն նույնականացված չէ, արդյունքը կոչվում է կեղծ բացասական: Եթե նպա-

տակային նյութը նմուշում առկա չէ, բայց նույնականացվել է, արդյունքը կոչվում է կեղծ դրական: Այն դեպքերում, երբ նպատակային նյութին վերագրում են այլ նյութի պիկը, կամ համաէլուցվող խմբի պիկերը նույնականացվում են որպես մաքուր նպատակային նյութ, ապա դա համարվում է նույնականացման սխալ:

Կեղծ բացասական արդյունքի պատճառ են նմուշառման կամ նմուշապատրաստման ժամանակ նպատակային նյութի կորուստը կամ նպատակային նյութի դեգրադացումը նմուշում:

Կեղծ դրական նույնականացման պատճառ կարող են հանդիսանալ կամ սխալ նույնականացումը, կամ հետազոտվող նմուշի մեջ արտաքին կամ ներքին աղբյուրներից նպատակային նյութով «աղտոտումը»:

Հեղուկ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով միացությունների քանակական անալիզի սկզբունքները

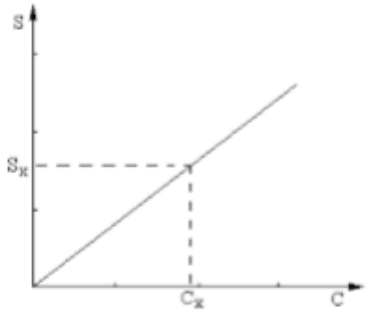
Գոյություն ունեն նպատակային միացությունների քանակական որոշման մի քանի եղանակներ՝

- մակերեսների հարաբերման եղանակ,
- կալիբրման եղանակ,
- ներքին ստանդարտի եղանակ,
- ստանդարտ նմուշի հետ համեմատման եղանակ:

Քանակական անալիզի ամենամատչելի եղանակը մակերեսների հարաբերման եղանակն է: Այն հիմնված է այն ենթադրության վրա, որ խառնուրդի բոլոր նյութերը բաժանվում են աշտարակում և գրանցվում են դետեկտորի կողմից: Այնուհետև բոլոր պիկերի մակերեսներն ընդունում են որպես որոշիչ: Որևէ նյութի տոկոսային հարաբերությունը հաշվելու համար օգտագործում են հետևյալ բանաձևը.

$$X = \frac{S_i\,100\%}{\sum S_n} \qquad (8)$$

Կալիբրման եղանակի հիմքում ընկած է պիկի մակերեսի և նյութի զանգվածի միջև եղած գծային կախվածությունը: Պատրաստում են տարբեր կոնցենտրացիայի ստանդարտ լուծույթներ, կատարում են անալիզ, կառուցում են ստանդարտի կոնցենտրացիայի և պիկի մակերեսի միջև կախվածության գրաֆիկ: Գրաֆիկը իրենից ներկայացնում է ուղիղ, որն անցնում է կոորդինատային համակարգի սկզբնակետով: Ապա չափում են հետազոտվող նյութի պիկի մակերեսը (Sx) և գրաֆիկի միջոցով որոշում են նրա քանակությունը (Cx):



Նկար 6. Կալիբրման կորի տեսքը

Առավել քիչ ժամանակատար և առավել ճշգրիտ եղանակ է ստանդարտ նմուշի հետ համեմատման եղանակը: Մեթոդի սխալի չափը կազմում է 2-3%: Պատրաստում են հետազոտվող նյութի լուծույթ և նույն նյութի ստանդարտ լուծույթ, հերթափոխով քրոմատագրում և չափում են պիկերի մակերեսները: Քանի որ պիկի մակերեսն ուղիղ համեմատական է նյութի կոնցենտրացիային, ապա ստացվում է հավասարումների համակարգ.

$$S_{CO} = C_{CO}S_X = C_X \qquad (9)$$

Գտնում են ստանդարտ և փորձարկվող նմուշների պիկերի մակերեսների հարաբերությունը, որը, ինչպես կարելի է դիտել վերոնշված հավասարումից, ուղիղ համեմատական է դրանց կոնցենտրացիաների հարաբերակցությանը: Հավասարումից կարելի է գտնել կոնկրետ նյութի քանակությունը.

$$\frac{S_{CO}}{S_X} = \frac{C_{CO}}{C_X} \tag{10}$$

$$C_X = \frac{S_X C_{CO}}{S_{CO}} \tag{11}$$

Եթե անհրաժեշտ է բարելավել հետազոտության ճշգրտությունը, ապա կիրառում են ներքին ստանդարտի մեթոդը: Ներքին ստանդարտը բացառիկ միացություն է, որը բացակայում է հետազոտվող խառնուրդում, բայց կառուցվածքով նման է հետազոտվող միացությանը: Ներքին ստանդարտի պիկը պետք է հնարավորինս հեռու գտնվի այլ միացությունների պիկերից, բայց միևնույն ժամանակ այն պետք է հնարավորինս մոտ լինի հաստատվող նյութի պիկին: Փորձարկվող խառնուրդի և ստանդարտի մեջ ներառում են ներքին ստանդարտը, չափում են մակերեսները և հաշվարկում են անալիզվող խառնուրդի և դրա ստանդարտի լուծույթի պիկի հարաբերական մակերեսները՝

$$S_X^I = \frac{S_X}{S_{CT}} S_{CO}^I = \frac{S_{CO}}{S_{CT}} \tag{12}$$

Որտեղ՝

$S_{ст}$–ներքին ստանդարտի պիկի մակերեսն է,

S_x և S_{co}–հաստատվող նյութի և նրա ստանդարտի պիկի մակերեսներն են,

S_x^1ևS_{co}^1–հաստատվող նյութի և նրա ստանդարտի պիկի հարաբերական մակերեսներն են:

Պիկերի հարաբերական մակերեսների ստացված արժեքները տեղադրում են հավասարման մեջ և որոշում հետազոտվող նյութի (C_x) պարունակությունը:

Անալիտիկ մեթոդի վալիդացիոն ցուցանիշներ

Մշակված մեթոդի կիրառելիության հնարավորությունը հաստատելու համար ցանկացած նոր մշակված մեթոդ պետք է ենթարկվի փորձաքննության, վալիդացիայի՝ համապատասխան միջազգային ուղեցույցների պահանջների:

Մասնավորապես, անհրաժեշտ է ուսումնասիրել մեթոդի ներքոնշյալ ցուցանիշները.

- ընտրողականություն
- ճշգրտություն
- գծայնություն
- հայտնաբերման ստորին սահման
- քանակական որոշման ստորին սահման
- ճշտություն:

Ընտրողականություն: Անալիտիկ մեթոդի ընտրողականությունը բնութագրում է նմուշում քայքայման արգասիքների, կողմնակի խառնուրդների առկայության պայմաններում նպատակային միացության ճշգրիտ կերպով նույնականացման հնարավորությունը: Ընտրողականության թույլատրելի ցուցանիշներից է՝ պիկերի վերադրման բացակայություն կամ չնչին վերադրում, որի դեպքում վերադրված նյութի մակերեսի հարաբերությունը նպատակային միացության մակերեսին փոքր է 0.2-ից:

Ցուցանիշի գնահատման համար կատարվում է շարժուն ֆազի ներարկում, որից հետո իրականացվում է հետազոտվող նմուշների երեքական ներարկում:

Պահման ժամանակի շեղումը չպետք է գերազանցի 1%-ը, իսկ մակերեսները՝ 2%-ը:

Ճշգրտություն: Մեթոդի ճշտության և ճշգրտության որոշման ժամանակ գնահատվում է տարբեր գործոնների ազդեցությունը վալիդացվող մեթոդի կայունության վրա: Ճշգրտությունն իր մեջ

ներառում է նաև ներլաբորատոր ճշգրտություն, որը բնութագրվում է տարբեր օրերի, տարբեր սարքերի վրա տարբեր մասնագետների կողմից իրականացված հետազոտությունների տվյալների հիման վրա:

Ներլաբորատոր ճշգրտության դեպքում հարաբերական ստանդարտ շեղման արժեքը չի կարող գերազանցել 5%-ը:

Գծայնություն: Անալիտիկ մեթոդի գծայնությունը ապահովում է ուղիղ համեմատական կախվածություն նմուշում նպատակային միացության կոնցենտրացիայի և մակերեսի միջև: Մեթոդի գծայնության ստուգման համար կարելի է պատրաստել 5 կամ 6 տարբեր կոնցենտրացիաների լուծույթներ և յուրաքանչյուրից կատարել երկու ներարկում:

Երկու ներարկումների արդյունքները միջինացվում են և ստացված արդյունքների հիման վրա “Excel” համակարգչային ծրագրի միջոցով կատարվում է կորելիացիայի գործակցի հաշվարկ և գծայնության կորի կառուցում:

Գծայնության տիրույթ է համարվում գծայնության ամբողջ միջակայքի միջին արժեքի ±20% տիրույթը: Վերջինս լրացուցիչ փորձաքննություն չի պահանջում, և կարելի է հիմնվել գծայնության կորի տվյալների վրա: Գծայնության տիրույթը համարվում է քանակական որոշման աշխատանքային տիրույթ:

Միացությունների հայտնաբերման ստորին սահման (LOD): Միացությունների քանակական որոշման ստորին սահման (LOQ):

Կախված սարքի, մեթոդի զգայունությունից և նյութի հատկություններից՝ տարբեր նյութերի համար հայտնաբերման և քանակական որոշման նվազագույն կոնցենտրացիաները կարող են լինել տարբեր: Հայտնաբերման ստորին սահմանը հետազոտվող լուծույթում նյութի այն նվազագույն կոնցենտրացիան է, որից ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում հնարավոր չէ տվյալ մեթո-

դով հայտնաբերել տվյալ նյութը: Քանակական որոշման ստորին սահմանը հետազոտվող լուծույթում նյութի այն նվազագույն կոնցենտրացիան է, որից ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում հնարավոր չէ տվյալ մեթոդով քանակապես որոշել տվյալ նյութը:

Հաշվարկներն իրականացվում են հետևյալ հավասարումներով.

$$LOQ = 10\,SD/S \quad LOD = 3.3\,SD/S \qquad (14)$$

Որտեղ՝

LOD-ը և LOQ-ը համապատասխանաբար հայտնաբերման և քանակական որոշման ստորին սահմաններն են,

SD-ն՝ ստանդարտ շեղումը,

S-ը՝ գծայնության կորի թեքությունը բնութագրող բաղադրիչը:

Որքան փոքր են այս սահմանները, այնքան մեծ է մեթոդի զգայունությունը:

Ճշտություն: Մեթոդի ճշտությունն իրենից ներկայացնում է գծայնության կորի միջոցով որոշված կոնցենտրացիայի և նախապես հայտնի կոնցենտրացիայի տարբերությունը՝ արտահայտված տոկոսներով:

Ճշտության ստուգման համար պատրաստվում է գծայնության տիրույթում հայտնի կոնցենտրացիաների լուծույթներ և յուրաքանչյուրից ներարկվում է երկու անգամ: Ստացված արդյունքները տեղադրվում են գծայնության կորի մեջ և էքստրապոլյացիայի միջոցով հաշվվում կոնցենտրացիաները՝ ըստ մեթոդի գծայնության կորի: Մեթոդի ճշտության արդյունքները չպետք է գերազանցեն ± 2,5 %-ը (97,5-102,5%):

ՓՈՐՁՆԱԿԱՆ ՄԱՍ

ՓՈՐՁ 1

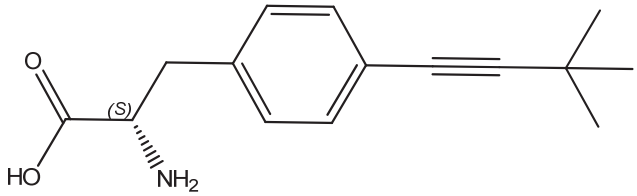
ԲԱՀՔ եղանակով կողքային ռադիկալում չհագեցած խումբ պարունակող 2-ամինո-3-(4-(3,3-դիմեթիլբուտ-1-իլ-1-իլ)ֆենիլ) պրոպիոնաթթվի քիրալային անալիզ

Անհրաժեշտ սարքավորումներ, ռեագենտներ, ստանդարտներ

Սարքավորումներ	
Բարձրարդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիական համակարգ «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ)	
ավտոմատ ներարկման համակարգ	Waters
դետեկտոր	Waters, UV 2487
աշտարակային թերմոստատ	Waters
քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Nautilus-E C18, 5u, 250 x 4,6 mm
անալիտիկ կշեռք	Sartorius cp2p, Italy
ցենտրիֆուգ	MPW-310
դեիոնիզացված ջրի համակարգ	Purelab, ELGA
“Vortex” առանցքային խառնիչ	Stuart, BioCote, UK
0,2 մկմ թաղանթային ֆիլտրեր	E-chrom Tech, Taiwan
Ռեագենտներ	
ացետոնիտրիլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
մեթանոլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
ջուր	Milli-Q որակի, Millipore
պերքլորաթթու	մ.ա.h

Ստանդարտներ	
2-ամինո-3-(4-(3,3-դիմեթիլ-բուտ-1-իլ-1-իլ)ֆենիլ) պրոպիոնաթթու	ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և պեպտիդների սինթեզի լաբ.
Լաբորատոր ապակեղեն	
ԲԱՀՔ սրվակներ	Macherey-Nagel, Germany
տարբեր տարողության ապակյա չափագլաններ, բաժակներ, պիպետներ, չափիչ փորձանոթներ	
լուծիչների և էլուենտների վակուում ֆիլտրման համակարգ	Pall Corporation, USA

Նմուշապատրաստում: ԲԱՀՔ եղանակով կողքային ռադիկալում չհագեցած խումբ պարունակող 2-ամինո-3-(4-(3,3-դիմեթիլբուտ-1-իլ-1-իլ)ֆենիլ) պրոպիոնաթթվի քիրալային անալիզ իրականացվում է «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ) հեղուկային քրոմատոգրաֆով հետադարձ ֆազային քրոմատոգրաֆիական համակարգի օրինակով:



Նկար 7. 2-ամինո-3-(4-(3,3-դիմեթիլբուտ-1-իլ-1-իլ)ֆենիլ) պրոպիոնաթթվի կառուցվածքային բանաձևը

Որպես քրոմատոգրաֆիական աշտարակ՝ օգտագործվում է «Nautilus-E C18, 5մկմ, 250 x 4,6մմ»: Նախքան հետազոտությունների իրականացումը՝ կատարվում է էլուենտների և նմուշների պատրաստում՝ համաձայն ԲԱՀՔ եղանակով իրականացվող հետազոտություններ պահանջների:

Էլուենտի պատրաստումը: ՀՖ ԲԱՀՔ քիրալային անալիզի համար օգտագործվող էլուենտը իրենից ներկայացնում է ացետոնիտրիլ և պերքլորաթթվի ($HClO_4$) 0,05%-ոց ջրային լուծույթ pH=3, 95:5 ծ/ծ հարաբերությամբ: Բուֆերի պատրաստման համար 1 լ դեիոնիզացված ջրի մեջ ավելացվում է 0,5 մլ պերքլորաթթու և pH-ի արժեքը հասցվում 3-ի, լավ խառնվում է, մոտ 5 րոպե մշակվում ուլտրաձայնով, ապա ֆիլտրվում վակուում ֆիլտրման համակարգով 0,45 մկմ անցքերի մեծությամբ թաղանթային ֆիլտրերով, ֆիլտրատը տեղափոխվում է ԲԱՀՔ սարքի էլուենտների համար նախատեսված ծավալի մեջ:

Անալիտիկ կշեռքով (Sartorius cp2p, Italy) կշռվում է առանձին ոչ սպիտակուցային ամինաթթվի նմուշը՝ սկսած 0,3-ից մինչև 2 մգ կշռազանգված:

Նշված կշռազանգվածները տեղափոխվում են համապատասխան ԲԱՀՔ սրվակների մեջ և լուծվում 1մլ շարժուն ֆազի մեջ, սրվակը 10 րոպե պահվում է ուլտրաձայնային բաղնիքի մեջ, ապա խառնվում “VORTEX” առանցքային խառնիչով 10 րոպե:

Լուծույթը ֆիլտրվում է PTFE 0,45 մկմ անցքերի մեծություն ունեցող ֆիլտրերով և տեղադրվում ԲԱՀՔ սարքի ավտոմատ ներարկման համակարգի մեջ հետազոտվող նմուշների համար նախատեսված հարթակի վրա, որոնք ունեն որոշակի համարակալում:

Սարքը աշխատանքային վիճակի բերելուց և համապատասխան կարգաբերումները անելուց հետո «Waters Separations module 2695» քրոմատոգրաֆի ծրագրային ապահովման

(«Empower») համապատասխան ենթաբաժիններում անհրաժեշտ տվյալները և պարամետրերը լրացնելուց հետո իրականացվում է հետազոտությունը:

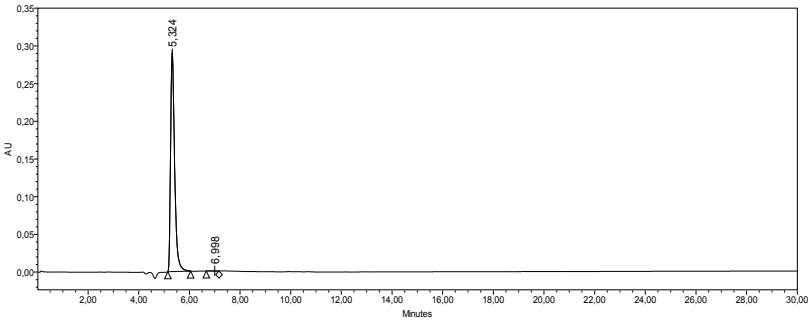
Քրոմատոգրման պայմանները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1

Կողքային ռադիկալում չհագեցած խումբ պարունակող α-ամինաթթուների քիրալային անալիզի քրոմատոգրման պայմանները

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Nautilus-E C18, 5 մկմ, 250 x 4,6 մմ
Դետեկտորի ալիքի երկարություն	210 նմ
Հոսքի արագություն	0,5մլ/ր
Ներարկման ծավալ	10 մկլ
Աշտարակի ջերմաստիճան	30 °C
Պոմպի աշխատանքային ռեժիմ	Իզոկրատիկ
Շարժուն ֆազ	95:5 ծ/ծ ացետոնիտրիլ և պերքլորաթթվի ($HClO_4$) 0,05%-ոց ջրային լուծույթ pH3

Նկար 8-ում ներկայացված է 2-ամինո-3-(4-(3,3-դիմեթիլբուտ-1-իլ-1-իլ)ֆենիլ) պրոպիոնաթթվի քիրալային անալիզի քրոմատոգիրը:



Անվանումը	Պահման ժամանակ, բոպե	Մակերես, (AU*բոպե)	Մակերես, %	Պիկի բարձրություն, AU
(*S*)- 2-ամինո-3-(4-(3,3-դիմեթիլ-բուտ-1-իլ-1-իլ)-ֆենիլ) պրոպիոնաթթու	5,324	3223681	99,80	290962
(*R*)- 2-ամինո-3-(4-(3,3-դիմեթիլ-բուտ-1-իլ-1-իլ)-ֆենիլ) պրոպիոնաթթու	6,998	6484	0,20	368

Նկար 8.2-ամինո-3-(4-(3,3-դիմեթիլբուտ-1-իլ-1-իլ)ֆենիլ) պրոպիոնաթթվի քիրալային անալիզի քրոմատոգիրը

ՓՈՐՁ 2

1-(4-քլորֆենիլ)-N,N-դիմեթիլ-α-(2-մեթիլպրոպիլ) ցիկլոբութան մեթանամինհիդրոքլորիդի(սիբուտրամին) մոդելային լուծույթի քրոմատոգրում ԲԱՀՔ եղանակով

Անհրաժեշտ սարքավորումներ, ռեագենտներ, ստանդարտներ

Սարքավորումներ	
Բարձրարդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիական համակարգ «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ)	
ավտոմատ ներարկման համակարգ	Waters
դետեկտոր	Waters, UV 2487
աշտարակային թերմոստատ	Waters
քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Altima C18, 5u, 250 x 4,6 mm
անալիտիկ կշեռք	Sartorius cp2p, Italy
ցենտրիֆուգ	MPW-310
դեիոնիզացված ջրի համակարգ	Purelab, ELGA
“Vortex” առանցքային խառնիչ	Stuart, BioCote, UK
0,2մկմ թաղանթային ֆիլտրեր	E-chrom Tech, Taiwan
Ռեագենտներ	
ացետոնիտրիլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
մեթանոլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
ջուր	Milli-Q որակի, Millipore
եռֆտորքացախաթթու	մ.ա.h

Ստանդարտներ	
1-(4-քլորֆենիլ)-N,N-դիմեթիլ-α-(2-մեթիլպրոպիլ) ցիկլոբութանմեթանմեթանամին հիդրոքլորիդ	ԲԱՀՔ ստանդարտ
Լաբորատոր ապակեղեն	
ԲԱՀՔ սրվակներ	Macherey-Nagel, Germany
տարբեր տարողության ապակյա չափագլաններ, բաժակներ, պիպետներ, չափիչ փորձանոթներ	
լուծիչների և էլուենտների վակուում ֆիլտրման համակարգ	Pall Corporation, USA

Նմուշապատրաստում: ԲԱՀՔ եղանակով սիբուտրամինի մոդելային լուծույթի քրոմատոգրումն իրականացվել է «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ) հեղուկային քրոմատոգրաֆով հետադարձ ֆազային քրոմատոգրաֆիական համակարգի օրինակով: Որպես քրոմատոգրաֆիական աշտարակ՝ օգտագործվել է Altima C18, 5 մկմ, 250 x 4,6մմ: Նախքան հետազոտությունների իրականացումը՝ կատարվել է էլուենտների և նմուշների պատրաստում՝ համաձայն ԲԱՀՔ եղանակով իրականացվող հետազոտություններ պահանջների:

Էլուենտի պատրաստումը: Օգտագործվող էլուենտն իրենից ներկայացնում է մեթանոլ և 0,1%-ոց ԵՖՔ-ի ջրային լուծույթ և ջուր, որի pH=3.5՝ 80:20 հարաբերությամբ: Բուֆերի պատրաստման համար 1լ դեիոնիզացված ջրի մեջ ավելացվում է 1մլ եռֆտորքացախաթթու և pH-ի արժեքը հասցվում է 3.5-ի, լավ խառնվում է, ապա ֆիլտրվում վակուում ֆիլտրման համակարգով 0,45մկմ անցքերի մեծությամբ թաղանթային ֆիլտրերով, ֆիլտ-

ռատը տեղափոխվում է ԲԱՀՔ սարքի էլուենտների համար նախատեսված ծավալի մեջ:

Անալիտիկ կշեռքի վրա (Sartorius cp2p, Italy) կշռվում է սիբուտրամինի ստանդարտ նմուշներ՝ 0,4-ից մինչև 5 մգ կշռազանգվածներով:

Կշռազանգվածները տեղափոխվում են համապատասխան ԲԱՀՔ սրվակների մեջ և լուծվում 1մլ շարժուն ֆազի մեջ, սրվակները 10 րոպե պահվում են ուլտրաձայնի մեջ, ապա խառնվում է VORTEX առանցքային խառնիչով 10 րոպե: Լուծույթը ֆիլտրվում է PTFE 0,2 մկմ անցքերի մեծություն ունեցող ֆիլտրերով և տեղադրվում ԲԱՀՔ սարքի ավտոմատ ներարկման համակարգի մեջ հետազոտվող նմուշների համար նախատեսված հարթակի վրա, որոնք ունեն որոշակի համարակալում:

Սարքը աշխատանքային վիճակի բերելուց և համապատասխան կարգաբերումները անելուց հետո «Waters Separations module 2695» քրոմատոգրաֆի ծրագրային ապահովման («Empower») համապատասխան ենթաբաժիններում անհրաժեշտ տվյալները և պարամետրերը լրացնելուց հետո իրականացվում է հետազոտությունը:

Քրոմատոգրման պայմանները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում:

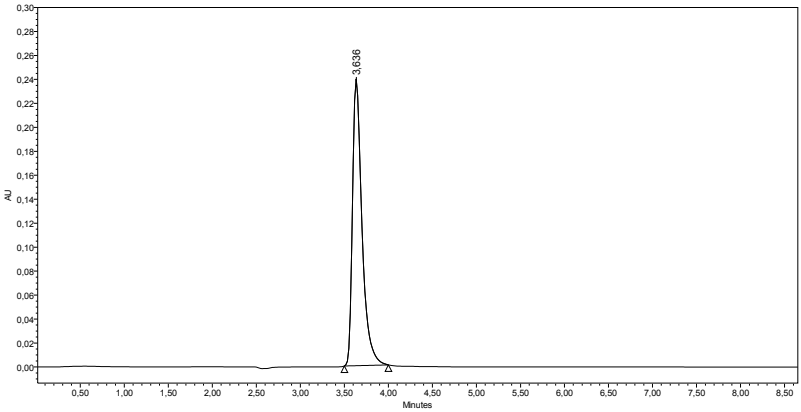
Աղյուսակ 2

1-(4-քլորֆենիլ)-N,N-դիմեթիլ-α-(2-մեթիլպրոպիլ)ցիկլոբութանմեթանամին հիդրոքլորիդ քրոմատոգրման պայմանները

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Nautilus-E C18, 5մկմ, 250 x 4,6 մմ
Դետեկտորի ալիքի երկարություն	225 նմ
Հոսքի արագություն	1մլ/ր
Ներարկման ծավալ	10 մկլ
Աշտարակի ջերմաստիճան	30 °C

Պոմպի աշխատանքային ռեժիմ	իզոկրատիկ
Շարժուն ֆազ	80:20 ծ/ծ մեթանոլ և եռֆտորքացախաթթվի 0,1%-ոց ջրային լուծույթ pH 3.5

Նկար 9-ում ներկայացված է 1-(4-քլորֆենիլ)-N,N-դիմեթիլ-α-(2-մեթիլպրոպիլ) ցիկլոբութանմեթանամինհիդրոքլորիդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը:



Անվանումը	Պահման ժամանակ, րոպե	Մակերես, (AU*րոպե)	Մակերես, %	Պիկի բարձրություն, AU
Սիբուտրամին	3,636	1802653	100,00	238889

Նկար 9. 1-(4-քլորֆենիլ)-N,N-դիմեթիլ-α-(2-մեթիլպրոպիլ) ցիկլոբութան-մեթանամինհիդրոքլորիդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը

ՓՈՐՁ 3

Էնալապրիլի նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով

Անհրաժեշտ սարքավորումներ, ռեագենտներ, ստանդարտներ

Սարքավորումներ	
Բարձրարդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիական համակարգ «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ)	
ավտոմատ ներարկման համակարգ	Waters
դետեկտոր	Waters, UV 2487
աշտարակային թերմոստատ	Waters
քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Altima C18, 5u, 250 x 4,6 mm
անալիտիկ կշեռք	Sartorius cp2p, Italy
ցենտրիֆուգ	MPW-310
դեիոնիզացված ջրի համակարգ	Purelab, ELGA
“Vortex” առանցքային խառնիչ	Stuart, BioCote, UK
0,2 մկմ թաղանթային ֆիլտրեր	E-chrom Tech, Taiwan
Ռեագենտներ	
ացետոնիտրիլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
մեթանոլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
ջուր	Milli-Q որակի, Millipore
եռֆտորքացախաթթու	մ.ա.h
Ստանդարտներ	
էնալապրիլ	
Լաբորատոր ապակեղեն	
ԲԱՀՔ սրվակներ	Macherey-Nagel, Germany
տարբեր տարողության ապա-	

կյա չափագլաններ, բաժակներ, պիպետներ, չափիչ փորձանոթներ	
լուծիչների և էլուենտների վակուում ֆիլտրման համակարգ	Pall Corporation, USA

ԲԱՀՔ եղանակով էնալապրիլի նույնականացումն իրականացվել է «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ) հեղուկային քրոմատոգրաֆով հետադարձ ֆազային քրոմատոգրաֆիական համակարգի օրինակով: Որպես քրոմատոգրաֆիական աշտարակ՝ օգտագործվել է Altima C18, 5մկմ, 250 x 4,6 մմ:

Նախքան հետազոտությունների իրականացումը՝ կատարվում է էլուենտների և նմուշների պատրաստում՝ համաձայն ԲԱՀՔ եղանակով իրականացվող հետազոտությունների պահանջների:

Էլուենտի պատրաստումը*:* ՀՖ ԲԱՀՔ եղանակով էնալապրիլի նույնականացման մեթոդում օգտագործվող էլուենտները իրենից ներկայացնում են մեթանոլ, դեիոնիզացված ջուր, որի pH-ի արժեքը կարգավորվում է եռֆտորքացախաթթվով (ԵՖՔ):

Բուֆերի պատրաստման համար 300 մլ դեիոնիզացված ջրին ավելացվում է 0,45 մլ ԵՖՔ, ապա 380մլ մեթանոլին ավելացվում է 20մլ ջուր և 0.52մլ ԵՖՔ, լավ խառնվում է, ապա ֆիլտրվում վակուում ֆիլտրման համակարգով 0,45մկմ անցքերի մեծությամբ թաղանթային ֆիլտրերով, ֆիլտրատը տեղափոխվում է ԲԱՀՔ սարքի էլուենտների համար նախատեսված ծավալի մեջ:

Նմուշապատրաստում: Անալիտիկ կշեռքի վրա (Sartorius cp2p, Italy) կշռվում են էնալապրիլի ստանդարտի 0,82մգ, 2,375մգ և 5,680մգ կշռազանգվածներ և լուծվում 1մլ շարժուն ֆազի մեջ, սրվակները 10 րոպե պահվում են ուլտրաձայնային բաղնիքի մեջ, ապա խառնվում VORTEX առանցքային խառնիչով 10 րոպե: Լու-

ծույթը ֆիլտրվում է PTFE 0,45մկմ անցքերի մեծություն ունեցող ֆիլտրերով և տեղադրվում ԲԱՀՔ սարքի ավտոմատ ներարկման համակարգի մեջ հետազոտվող նմուշների համար նախատեսված հարթակի վրա, որոնք ունեն որոշակի համարակալում:

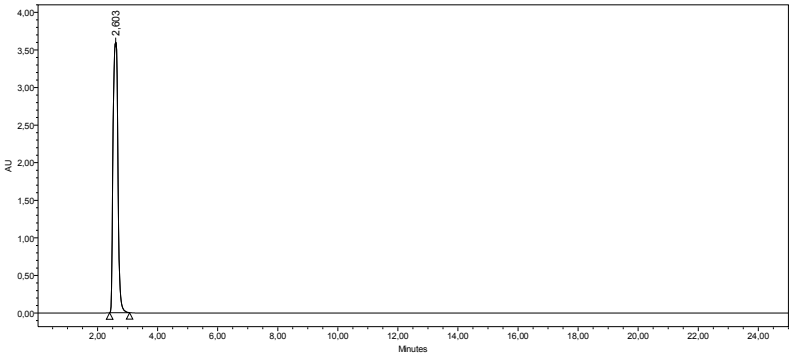
Սարքը աշխատանքային վիճակի բերելուց և համապատասխան կարգավորումները անելուց հետո «Waters Separations module 2695» քրոմատոգրաֆի ծրագրային ապահովման («Empower») համապատասխան ենթաբաժիններում անհրաժեշտ տվյալները և պարամետրերը լրացնելուց հետո իրականացվում է հետազոտությունը: Քրոմատոգրման պայմանները ներկայացված են աղյուսակ 3-ում:

Աղյուսակ 3

ԲԱՀՔ եղանակով էնալապրիլի փորձաքննության քրոմատոգրման պայմանները

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Altima C18, 5u, 250 x 4,6 mm
Դետեկտորի ալիքի երկարություն	215նմ
Հոսքի արագություն	1 մլ/ր
Ներարկման ծավալ	10 մկլ
Աշտարակի ջերմաստիճան	30 °C
Պոմպի աշխատանքային ռեժիմ	Իզոկրատիկ
Շարժուն ֆազ	20:80 ծ/ծ մեթանոլ+ջուր+TFA և ջուր+TFA

Նկար 10-ում ներկայացված է էնալապրիլի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը:



Անվանումը	Պահման ժամանակ, րոպե	Մակերես, (AU*րոպե)	Մակերես, %	Պիկի բարձրություն, AU
Էնալապրիլ մալեատ	2,603	40405230	100,00	3605029

Նկար 10. Էնալապրիլի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը

ՓՈՐՁ 4

Օրգանական թթուների (ասպարագինաթթու, թրթնջկաթթու, գինեթթու, խնձորաթթու, կիտրոնաթթու, սաթաթթու, ֆումարաթթու) բաժանում և նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով

Անհրաժեշտ սարքավորումներ, ռեագենտներ, ստանդարտներ

Սարքավորումներ	
Բարձրարդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիական համակարգ «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ)	
ավտոմատ ներարկման համակարգ	Waters
դետեկտոր	Waters, UV 2487
աշտարակային թերմոստատ	Waters
քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Altima C18, 5u, 250 x 4,6 mm
անալիտիկ կշեռք	Sartorius cp2p, Italy
ցենտրիֆուգ	MPW-310
դեիոնիզացված ջրի համակարգ	Purelab, ELGA
“Vortex” առանցքային խառնիչ	Stuart, BioCote, UK
0,2մկմ թաղանթային ֆիլտրեր	E-chrom Tech, Taiwan
Ռեագենտներ	
ացետոնիտրիլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
մեթանոլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
ջուր	Milli-Q որակի, Millipore
ֆոսֆորական թթու	մ.ա.h
Ստանդարտներ	
օրգանական թթուների ստանդարտներ	Sigma-Aldrich

Լաբորատոր ապակեղեն	
ԲԱՀՔ սրվակներ	Macherey-Nagel, Germany
տարբեր տարողության ապակյա չափագլաններ, բաժակներ, պիպետներ, չափիչ փորձանոթներ	
լուծիչների և էլուենտների վակուում ֆիլտրման համակարգ	Pall Corporation, USA

Նմուշապատրաստում: ԲԱՀՔ եղանակով օրգանական թթուների որակական և քանակական հետազոտությունն իրականացվում է «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ) հեղուկային քրոմատոգրաֆով հետադարձ ֆազային քրոմատոգրաֆիական համակարգի օրինակով: Որպես քրոմատոգրաֆիական աշտարակ՝ օգտագործվում է «Altima» C18, 5մկմ, 250 x 4,6մմ: Նախքան հետազոտությունների իրականացումը՝ կատարվում է էլուենտների և նմուշների պատրաստում՝ համաձայն ԲԱՀՔ եղանակով իրականացվող հետազոտությունների պահանջների:

Էլուենտի պատրաստում: Օրգանական թթուների նույնականացման մեթոդի համար օգտագործվող էլուենտը իրենից ներկայացնում է ացետոնիտրիլի, մեթանոլի, ֆոսֆորական թթվի ջրային բուֆեր՝ հետևյալ տոկոսային հարաբերությամբ՝ 0,5% ացետոնիտրիլ, 0,5% մեթանոլ, 0,1% ֆոսֆորական թթու: Բուֆերի պատրաստման համար 1լ դեիոնիզացված ջրի մեջ ավելացվում է 5մլ մեթանոլ, 5մլ ացետոնիտրիլ, 1մլ ֆոսֆորական թթու, ջրային լուծույթը լավ խառնվում է, ապա ֆիլտրում վակուում ֆիլտրման համակարգով 0.45մկմ անցքերի մեծությամբ թաղանթային ֆիլտրերով, ֆիլտրատը տեղափոխվում է ԲԱՀՔ սարքի էլուենտների համար նախատեսված ծավալի մեջ:

Անալիտիկ կշեռքի վրա (Sartorius cp2p, Իտալիա) կշռվում է առանձին օրգանական թթուների ստանդարտներ՝ հետևյալ կշռազանգվածներով՝

- ասպարագինաթթու-2.334մգ,
- թրթնջկաթթու-0.4մգ,
- գինեթթու-1.5մգ,
- խնձորաթթու-2.25մգ,
- կիտրոնաթթու-3.3մգ,
- սաթաթթու-5.6մգ,
- ֆումարաթթու-0.05մգ:

Նշված կշռազանգվածների որոշումը հիմնված է բազմակի փորձերի արդյունքների վրա՝ կախված կոնկրետ միացության կլանման ինտենսիվությունից, որպեսզի օրգանական թթուների խառնուրդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգրում հետազոտվող բոլոր միացությունները ունենան գրեթե հավասարաչափ կլանում:

Նշված կշռազանգվածները տեղափոխվում են համապատասխան ԲԱՀՔ սրվակների մեջ և լուծվում 1մլ շարժուն ֆազում, սրվակները 10 րոպե պահվում է ուլտրաձայնի մեջ, ապա խառնվում VORTEX առանցքային խառնիչով 10 րոպե: Լուծույթը ֆիլտրվում է PTFE 0,45մկմ անցքերի մեծություն ունեցող ֆիլտրերով և տեղադրվում ԲԱՀՔ սարքի ավտոմատ ներարկման համակարգի մեջ հետազոտվող նմուշների համար նախատեսված հարթակի վրա, որոնք ունեն որոշակի համարակալում:

Սարքն աշխատանքային վիճակի բերելուց և համապատասխան կարգաբերումներն անելուց հետո «Waters Separations module 2695» քրոմատոգրաֆի ծրագրային ապահովման («Empower») համապատասխան ենթաբաժիններում անհրաժեշտ տվյալները և պարամետրերը լրացնելուց հետո իրականացվում է հետազոտությունը:

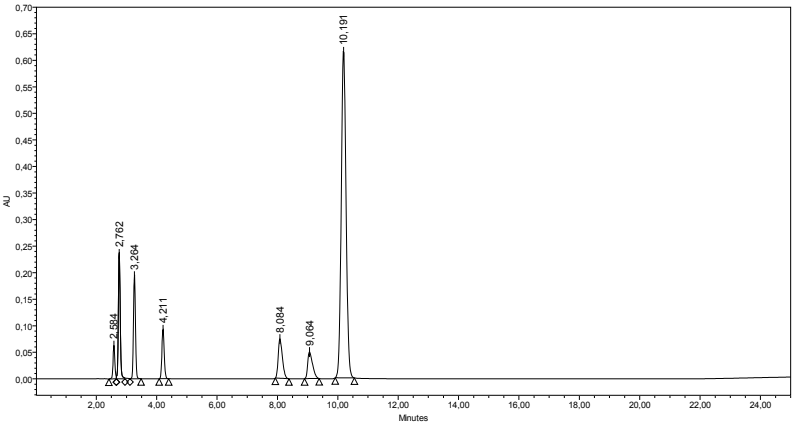
Քրոմատոգրման պայմանները ներկայացված են աղյուսակ 4-ում:

Աղյուսակ 4

Օրգանական թթուների որակական և քանակական որոշման մեթոդի քրոմատոգրման պայմանները

Քրոմատոգրաֆիական աշ-տարակ	Altima C18, 5մկմ, 250 x 4,6 մմ
Դետեկտորի ալիքի երկարու-թյուն	210 նմ
Հոսքի արագություն	1 մլ/ր
Ներարկման ծավալ	5 մկլ
Աշտարակի ջերմաստիճան	30 °C
Պոմպի աշխատանքային ռե-ժիմ	իզոկրատիկ
Շարժուն ֆազ	0.5 % ացետոնիտրիլ, 0.5 % մեթանոլ, 0.1 % ֆոսֆորական թթու ջրում

Նկար 11-ում ներկայացված է օրգանական թթուների խառ-նուրդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը:



Անվանումը	Պահման ժամանակ, րոպե	Մակերես, (AU*րոպե)	Մակերես, %	Պիկի բարձրություն AU
Аспаргиновая кислота	2,584	264136	2,45	63086
Щавелевая кислота	2,762	1018588	9,45	234289
Винная кислота	3,264	884624	8,21	196247
Яблочная кислота	4,211	500778	4,65	92676
Лимонная кислота	8,084	714135	6,63	73813
Янтарная кислота	9,064	557381	5,17	49955
Фумаровая кислота	10,191	6833645	63,43	617497

Նկար 11. Օրգանական թթուների խառնուրդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը

ՓՈՐՁ 5

Բենզոական թթվի նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով

Անհրաժեշտ սարքավորումներ, ռեագենտներ, ստանդարտներ

Սարքավորումներ	
Բարձրարդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիական համակարգ «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ)	
ավտոմատ ներարկման համակարգ	Waters
դետեկտոր	Waters, UV 2487
աշտարակային թերմոստատ	Waters
քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Altima C18, 5u, 250 x 4,6 mm
անալիտիկ կշեռք	Sartorius cp2p, Italy
ցենտրիֆուգ	MPW-310
դեիոնիզացված ջրի համակարգ	Purelab, ELGA
“Vortex” առանցքային խառնիչ	Stuart, BioCote, UK
0,2 մկմ թաղանթային ֆիլտրեր	E-chrom Tech, Taiwan
Ռեագենտներ	
ացետոնիտրիլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
ջուր	Milli-Q որակի, Millipore
եռֆտորքացախաթթվի անհիդրիդ	մ.ա.h
Ստանդարտներ	
բենզոական թթվի ստանդարտ	Sigma-Aldrich
Լաբորատոր ապակեղեն	
ԲԱՀՔ սրվակներ	Macherey-Nagel, Germany
տարբեր տարողության ապակյա	

չափագլաններ, բաժակներ, պիպետներ, չափիչ փորձանոթներ	
լուծիչների և էլուենտների վակուում ֆիլտրման համակարգ	Pall Corporation, USA

Նմուշապատրաստում: ԲԱՀՔ եղանակով բենզոական թթվի որակական և քանակական հետազոտությունն իրականացվում է «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ) հեղուկային քրոմատոգրաֆով հետադարձ ֆազային քրոմատոգրաֆիական համակարգի օրինակով: Որպես քրոմատոգրաֆիական աշտարակ՝ օգտագործվում է «Altima» C18, 5 մկմ, 250 x 4.6 մմ: Նախքան հետազոտությունների իրականացումը՝ կատարվում է էլուենտների և նմուշների պատրաստում՝ համաձայն ԲԱՀՔ եղանակով իրականացվող հետազոտությունների պահանջների:

Էլուենտի պատրաստում: ԲԱՀՔ մեթոդով բենզոական թթվի նույնականացման համար օգտագործվող էլուենտն իրենից ներկայացնում է 0.1 % եռֆտորքացախաթթվի անհիդրիդ+ացետոնիտրիլ և 0.1 % եռֆտորքացախաթթվի անհիդրիդ ջրային բուֆեր:

Բենզոական թթվի մոդելային լուծույթի պատրաստման համար վերցվում է 3մգ բենզոական թթվի ստանդարտի կշռազանգված, տեղափոխվում նմուշների անալիզի համար նախատեսված սրվակի մեջ և լուծվում 1մլ շարժուն ֆազում, սրվակները 10 րոպե պահվում է ուլտրաձայնի մեջ, ապա խառնվում VORTEX առանցքային խառնիչով 10 րոպե: Լուծույթը ֆիլտրվում է PTFE 0,45 մկմ անցքերի մեծություն ունեցող ֆիլտրերով և տեղադրվում ԲԱՀՔ սարքի ավտոմատ ներարկման համակարգի մեջ հետազոտվող նմուշների համար նախատեսված հարթակի վրա, որոնք ունեն որոշակի համարակալում:

Սարքն աշխատանքային վիճակի բերելուց և համապատասխան կարգաբերումներն անելուց հետո «Waters Separations

module 2695» քրոմատոգրաֆի ծրագրային ապահովման («Empower») համապատասխան ենթաբաժիններում անհրաժեշտ տվյալները և պարամետրերը լրացնելուց հետո իրականացվում է հետազոտությունը:

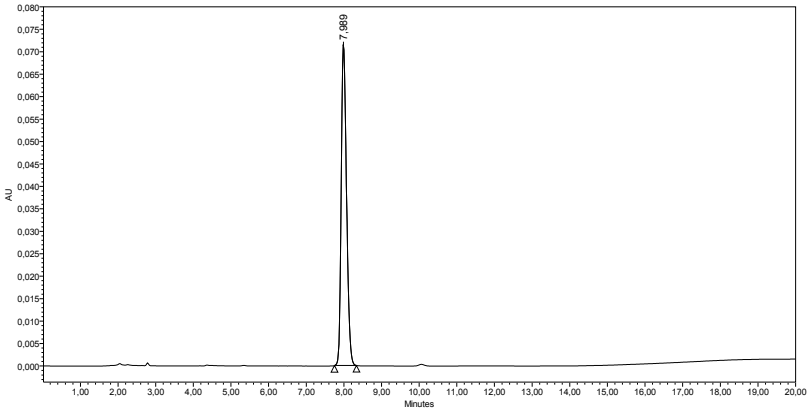
Քրոմատոգրման պայմանները ներկայացված են աղյուսակ 5-ում:

Աղյուսակ 5

Բենզոական թթվի նույնականացման ԲԱՀՔ մեթոդի քրոմատոգրման պայմանները

Քրոմատոգրաֆիական աշ-տարակ	Altima C18, 5մկմ, 250 x 4,6 մմ
Դետեկտորի ալիքի երկարու-թյուն	220 նմ
Հոսքի արագություն	1 մլ/ր
Ներարկման ծավալ	5 մկլ
Աշտարակի ջերմաստիճան	30 °C
Պոմպի աշխատանքային ռե-ժիմ	Իզոկրատիկ
Շարժուն ֆազ	30:70 ծ/ծ 0.1 % եռֆտորքացախաթթվի անհիդրիդ+ացետոնիտրիլ և 0.1 % եռ-ֆտորքացախաթթվի անհիդրիդ ջրային բուֆեր

Նկար 12-ում ներկայացված է բենզոական թթվի մոդելային լուծույթի նույնականացման քրոմատոգիրը:



Անվանումը	Պահման ժամանակ, րոպե	Մակերես, (AU*րոպե)	Մակերես, %	Պիկի բարձրություն, AU
Բենզոական թթու	7,989	698131	100,00	71718

Նկար 12. Բենզոական թթվի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը

Սպիտակուցային ամինաթթուների նույնականացման առանձնահատկությունները

Ամինաթթուներն օրգանական միացություններ են, որոնց կառուցվածքի մեջ մտնում են ամինային և կարբոքսիլային խմբեր, վերջիններս բացառիկ նշանակությամբ կենսապոլիմերներ են:

Բնության մեջ հանդիպում են ավելի քան 70 ամինաթթուներ, որոնք ունեն $RCH(NH_2)COOH$ ընդհանուր բանաձևը, բացառությամբ պրոլինի և օքսիպրոլինի:

Ամինաթթուները հանդիսանում են բավական բարդ միացություններ քիմիական անալիզի համար: Դա առաջին հերթին պայմանավորված է մոլեկուլում հիդրոֆոբ (ոչ բևեռային ածխաջրածնային մնացորդներ) և հիդրոֆիլ (կարբոքսիլ, ամինո, հիդրոքսի, մերկապտո) խմբերով: Երկրորդ՝ ամինաթթուների ամֆոտեր բնույթը, որը պայմանավորված է կառուցվածքում առկա հիմնային և թթվային խմբերով, հանգեցնում է չեզոք լուծույթներում ամինաթթուների ցվիտերիոնների առաջացմանը:

Հետևաբար, ամինաթթուների հետազոտության համար անհրաժեշտ է հաշվի առնել նրանց իզոէլեկտրիկ կետի արժեքը (լուծույթի pH-ի արժեքը): Բոլոր սպիտակուցային ամինաթթուները, բացառությամբ գլիցինի, շնորհիվ իրենց քիրալային կառուցվածքի, կարող են հանդես գալ տարբեր էնանտիոմերների տեսքով:

Ժամանակակից բժշկության մեջ կիրառվում են դեղեր և դեղապատրաստուկներ, որոնք ստեղծվել են ամինաթթուների, պեպտիդների և սպիտակուցների հիման վրա:

Ամինաթթուների անալիզը լավ ուսումնասիրված և միևնույն ժամանակ անալիտիկ քիմիայի զարգացող բաժիններից մեկն է: Ամինաթթուների նույնականացումը սննդամթերքում, ըմպելիքներում և դեղերում կարևոր նշանակություն ունի արտադրական

պրոցեսների վերահսկման, հումքի և պատրաստի արտադրանքի որակի գնահատման, կեղծումների բացահայտման համար: Վերջին ժամանակներս արդիական է սննդամթերքում և դեղերում ամինաթթուների D-իզոմերների որոշումը: Դա պայմանավորված է նրանով, որ D-իզոմերների ազդեցությունը մարդու օրգանիզմի վրա քիչ է ուսումնասիրված: Վերջիններիս քիչ քանակություններ կարող են ի հայտ գալ սննդամթերքի ջերմային մշակման ընթացքում, իսկ դեղապատրաստուկներում, օրինակ՝ սինթետիկ ամինաթթուների կիրառման դեպքում:

Հարկ է նշել, որ ներկայումս տարբեր նմուշներում ամինաթթուների որոշման միասնական մոտեցում չկա: Հաշվի առնելով վերոնշյալը՝ անհրաժեշտ է նշել, որ ֆարմացիայի արդիական խնդիրներից մեկը տարբեր օբյեկտներում ամինաթթուների որոշման հարմար հասանելի մեթոդների մշակումն է:

Բաժանման և նույնականացման արդյունավետ մեթոդներ են համարվում բարձր ճնշումային հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի վրա հիմնված մեթոդները: Վերջիններիս մշակման ժամանակ հիմնական ջանքերը ուղղված են զգայունության սահմանների բարձրացման և անալիզվող նմուշի քանակի նվազեցման ուղղությամբ:

Քանի որ բնական ամինաթթուների լուծույթները, որպես կանոն, թույլ են կլանում ՈՒՄ-ն և տեսանելի լույսը, չունեն իրենց սեփական ֆլյուորեսցենցիան, և նրանց մոլեկուլներում չկան էլեկտրոակտիվ խմբեր, ապա նրանց նույնականացման զգայունությունը համապատասխանաբար սպեկտրոֆոտոմետրիկ, ֆլյուրոմետրիկ և էլեկտրոքիմիական մեթոդներով բավական ցածր է:

Ամինաթթուների նույնականացման համար մեթոդի զգայունությունը բարձրացնելու նպատակով վերջիններիս ենթարկում

են քիմիական փոխարկման՝ դերիվատիզացիայի, որի արդյունքում ստացվում են ֆլյուրեսցենցվող ածանցյալներ:

Առանձնակի հետաքրքրություն են ներկայացնում ամինաթթուների նույնականացման այնպիսի մեթոդների մշակումը, որոնք թույլ կտան իրականացնել ամինաթթուների քանակական և որակական նույնականացում կենսաբանական հեղուկներում, դեղապատրաստուկներում և սննդամթերքում:

ՓՈՐՁ 6

Սպիտակուցային ամինաթթուների քանակական և որակական նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով

Անհրաժեշտ սարքավորումներ, ռեագենտներ, ստանդարտներ

Սարքավորումներ	
Ամինաթթվային անալիզատոր “Shimadzu Nexera X2”	
բարձր ճնշումային պոմպային համակարգ	LC-30AD “Shimadzu”
դեգազատոր	DGU-20A “Shimadzu”
ավտոմատ ներարկման համակարգ	SIL 30AC “Shimadzu”
դետեկտոր	RF-20A “Shimadzu”
աշտարակային թերմոստատ	CTO-20A “Shimadzu”
քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Waters, Novo-Pak C 18, 4 μm, 3,9 x 150 mm
անալիտիկ կշեռք	Sartorius cp2p, Italy
դենտրիֆուգ	MPW-310
դեիոնիզացված ջրի համակարգ	Purelab, ELGA
“Vortex” առանցքային խառնիչ	Stuart, BioCote, UK
0,2 մկմ թաղանթային ֆիլտրեր	E-chrom Tech, Taiwan
Ռեագենտներ	
ացետոնիտրիլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
մեթանոլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
ջուր	Milli-Q որակի, Millipore
նատրիումի ֆոսֆատ երկհիմն	≥ 99,0 %, Sigma
նատրիումի ֆոսֆատ միա-	≥ 99,0 %, Sigma

հիմն	
աղաթթու	≥ 99,0 %, Sigma
օրթոֆտալդիալդեհիդ ռեագենտ	CAS: 643-79-8, Sigma
Ստանդարտներ	
սպիտակուցային ամինաթթուների ստանդարտ հավաքածու	Sigma-Aldrich
Լաբորատոր ապակեղեն	
ԲԱՀՔ սրվակներ	Macherey-Nagel, Germany
տարբեր տարողության ապակյա չափագլաններ, բաժակներ, պիպետներ, չափիչ փորձանոթներ	
լուծիչների և էլուենտների վակուում ֆիլտրման համակարգ	Pall Corporation, USA

Ամինաթթուների խառնուրդի մոդելային լուծույթի կազմի որակական և քանակական հետազոտությունն իրականացվում է «Shimadzu Nexeria X2» ամինաթթվային անալիզատորի կիրառմամբ նախաաշտարակային դերիվատիզացման եղանակով: Նախքան մոդելային լուծույթների հետազոտումը՝ իրականացվում է նմուշապատրաստում՝ համապատասխան սարքի շահագործման պահանջներին: Ամինաթթուների մոդելային լուծույթը նոսրացվում է 0,01Ն աղաթթվի լուծույթով, սրվակները 10 րոպե պահվում է ուլտրաձայնի մեջ, ապա խառնվում VORTEX առանցքային խառնիչով 10 րոպե: Այնուհետև ֆիլտրվում են PTFE 0,2մկմ անցքերի մեծություն ունեցող թաղանթային ֆիլտրերով, ֆիլտրատը տեղափոխվում է նմուշառման համար նախատեսված տարայի մեջ և տեղադրվում անալիզատորի ավտոմատ նմուշառման

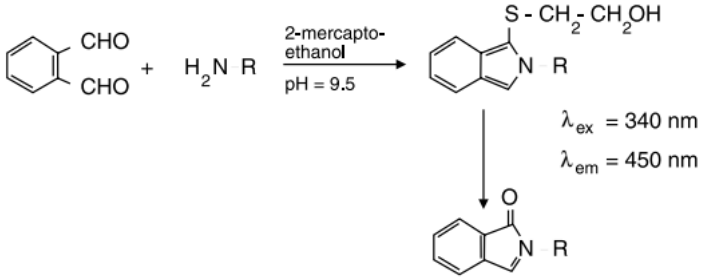
համակարգի մեջ հետազոտվող նմուշների համար նախատեսված հարթակի վրա:

Մոդելային լուծույթի ամինաթթվային կազմի հետազոտության հիմքում ընկած է նմուշների նախաաշտարակային դերիվատիզացման (ածանցյալի ստացում) սկզբունքը: Որպես նախաաշտարակային դերիվատիզացիոն ռեագենտ՝ կիրառվում է օրտոֆտալդիալդեհիդը՝ մերկապտոէթանոլի միջավայրում: Ամինաթթուների ածանցյալների ստացումն իրականացվում է ավտոմատ ներարկման համակարգի բլոկում, նախապես ծրագրային ապահովման համապատասխան ենթաբաժնում տվյալների և մեթոդի պարամետրերի ներմուծման արդյունքում: Հետազոտության տվյալները արձանագրվում են քրոմատոգրի տեսքով և մշակվում “LabSolution” ծրագրային ապահովման միջոցով: Ամինաթթուների մոդելային լուծույթների քրոմատոգրման պայմանները ներկայացված են աղյուսակ 6-ում:

Աղյուսակ 6

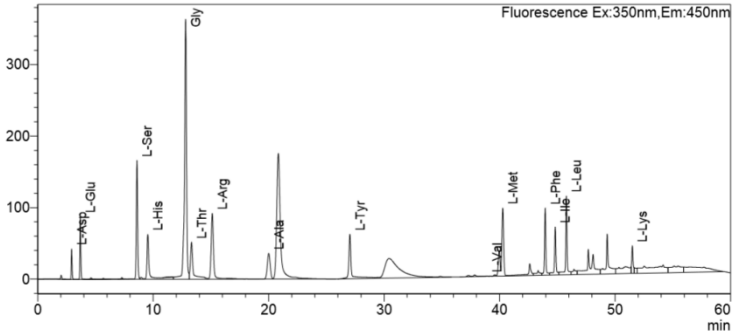
Սպիտակուցային ամինաթթուների մոդելային լուծույթի քրոմատոգրման պայմանները

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Waters, Novo-Pak C 18, 4 մկմ, 3,9 x 150 մմ (Waters, USA)
Դետեկտորի ալիքի երկարություն	ex350-em450 նմ
Հոսքի արագություն	1 մլ/ր
Ներարկման ծավալ	10 մկլ
Աշտարակի ջերմաստիճան	30 °C
Պոմպի աշխատանքային ռեժիմ	Գրադիենտային
Շարժուն ֆազ	Ա՝ ացետոնիտրիլ:մեթանոլ:ջուր= 45:40:15 (v/v) Բ՝ ֆոսֆատային բուֆեր pH=7,2



Նկար 13. Սպիտակուցային ամինաթթվի և օրթոֆտալդիալդեհիդի միացման արդյունքում ֆլյուրեսցենցվող ածանցյալի ստացման ռեակցիայի սխեման

Նկար 14-ում ներկայացված է սպիտակուցային ամինաթթուների խառնուրդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգրամման:



Հ	Անվանումը	Պահման ժամանակ, րոպե	Մակերես, (AU*րոպե)	Պիկի բարձրություն	Կոնցենտրացիա մգ/մլ
1	L-Asp	2.937	216887	42543	0.33275
2	L-Glu	3.694	520005	85947	0.36775
3	L-Ser	8.596	1335463	164092	0.26275
4	L-His	9.535	924918	61088	0.388
5	Gly	12.812	4556095	361339	0.1877
6	L-Thr	13.323	866415	46645	0.29775
7	L-Arg	15.113	1366010	87680	0.4355

8	L-Ala	20.013	630702	35283	0.222725
9	L-Tyr	27.036	988382	59554	0.453
10	L-Val	38.902	18375	366	0.293
11	L-Met	40.281	1423033	88867	0.373
12	L-Phe	43.972	756620	54274	0.413
13	L-Ile	44.808	616763	45698	0.328
14	L-Leu	45.778	977639	52277	0.328
15	L-Lys	51.477	322363	25799	0.3655

Նկար 15. Սպիտակուցային ամինաթթուների խառնուրդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգրամման

Փորձ 7

Որոշ մոնո- և դիշաքարների (գլյուկոզ, ֆրուկտոզ, սախարոզ, մալթոզ, լակտոզ) քանակական և որակական որոշում ԲԱՀՔ եղանակով

Անհրաժեշտ սարքավորումներ, ռեագենտներ, ստանդարտներ

Սարքավորումներ	
Բարձրարդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիական համակարգ «Knauer, Germany»	
դետեկտոր	RI 2300, Knauer
ավտոմատ ներարկման համակարգ	3950, Knauer
բարձր ճնշումային պոմպային համակարգ	Azura p 6.1L, Knauer
անալիտիկ կշեռք	Sartorius cp2p, Italy
ցենտրիֆուգ	MPW-310
դեիոնիզացված ջրի համակարգ	Purelab, ELGA
“Vortex” առանցքային խառնիչ	Stuart, BioCote, UK
0,2մկմ թաղանթային ֆիլտրեր	E-chrom Tech, Taiwan
Ռեագենտներ	
ացետոնիտրիլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
մեթանոլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
ջուր	Milli-Q որակի, Millipore
Ստանդարտներ	
գլյուկոզի, ֆրուկտոզի, սախարոզի, մալթոզի, լակտոզի ստանդարտներ	Sigma-Aldrich
Լաբորատոր ապակեղեն	
ԲԱՀՔ սրվակներ	Macherey-Nagel, Germany

տարբեր տարողության ապակյա չափագլաններ, բաժակներ, պիպետներ, չափիչ փորձանոթներ	
լուծիչների և էլուենտների վակուում ֆիլտրման համակարգ	Pall Corporation, USA

Նմուշապատրաստում: Շաքարների մոդելային լուծույթի պատրաստման համար յուրաքանչյուր ստանդարտից վերցվում է 2մգ կշռազանգված և լուծվում 1մլ շարժուն ֆազի մեջ, սրվակները 10 րոպե պահվում է ուլտրաձայնի մեջ, ապա խառնվում VORTEX առանցքային խառնիչով 10 րոպե: Լուծույթը ֆիլտրվում է PTFE 0,45մկմ անցքերի մեծություն ունեցող ֆիլտրերով և տեղադրվում ԲԱՀՔ սարքի ավտոմատ ներարկման համակարգի մեջ հետազոտվող նմուշների համար նախատեսված հարթակի վրա, որոնք ունեն որոշակի համարակալում:

Էլուենտի պատրաստում: ԲԱՀՔ մեթոդով շաքարների նույնականացման համար օգտագործվող էլուենտն իրենից ներկայացնում է ացետոնիտրիլ և ջուր՝ 79:21 ծավալային հարաբերությամբ: Էլուենտը պատրաստելուց հետո լավ խառնվում է, ապա ֆիլտրվում վակուում ֆիլտրման համակարգով 0,45մկմ անցքերի մեծությամբ թաղանթային ֆիլտրերով, ֆիլտրատը տեղափոխվում է ԲԱՀՔ սարքի էլուենտների համար նախատեսված ծավալի մեջ:

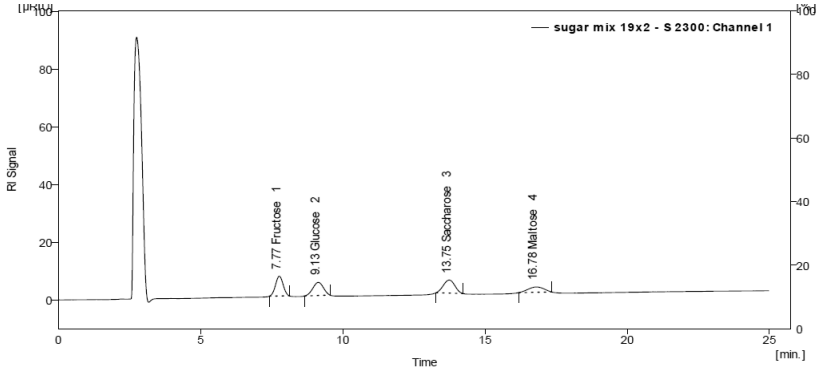
ԲԱՀՔ համակարգի ծրագրային ապահովման համապատասխան ենթաբաժնում տվյալների և մեթոդի պարամետրերի ներմուծումից հետո իրականացվում է մոդելային լուծույթի շաքարային կազմի հետազոտություն, արդյունքները գրանցվում են քրոմատոգրի տեսքով և մշակվում “*Clarity*Chrom” ծրագրային ապահովման միջոցով:

Աղյուսակ 7

Որոշ մոնո- և դիշաքարների մոդելային լուծույթի քրոմատոգրման պայմանները

Քրոմատոգրաֆիական աշ-տարակ	Nucleodur 100-5 NH_2-RP, 5.0 մկմ, 250մմ, Macherey-Nagel (Գերմանիա)
Դետեկտոր	RI 2300, KNAUER (Գերմանիա)
Հոսքի արագություն	1 մլ/ր
Ներարկման ծավալ	30 մկլ
Աշտարակի ջերմաստիճան	30 °C
Պոմպի աշխատանքային ռե-ժիմ	Իզոկրատիկ
Շարժուն ֆազ	ացետոնիտրիլ:ջուր= 79:21 (ծ/ծ)

Նկար 15-ում ներկայացված է ֆրուկտոզի, գլյուկոզի, սախա-րոզի և մալթոզի խառնուրդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը:



Result Table (Uncal - sugar mix 19x2 - S 2300: Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mRIU.s]	Height [mRIU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	7.767	0.128	0.007	28.8	38.5	0.32	Fructose
2	9.133	0.117	0.005	26.4	25.5	0.43	Glucose
3	13.750	0.127	0.005	28.7	25.5	0.47	Saccharose
4	16.783	0.071	0.002	16.1	10.4	0.65	Maltose
	Total	0.444	0.018	100.0	100.0		

Նկար 15. Ֆրուկտոզի, գլյուկոզի, սախարոզի և մալթոզի խառնուրդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը

ՓՈՐՁ 8
Տանինի, կվարցետինի և ռուտինի նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով

Անհրաժեշտ սարքավորումներ, ռեագենտներ, ստանդարտներ

Սարքավորումներ	
Բարձրարդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիական համակարգ «Waters Separations module 2695» (ԱՄՆ)	
ավտոմատ ներարկման համակարգ	Waters
դետեկտոր	Waters, UV 2487
աշտարակային թերմոստատ	Waters
քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Altima C18, 5u, 250 x 4,6 mm
անալիտիկ կշեռք	Sartorius cp2p, Italy
ցենտրիֆուգ	MPW-310
դեիոնիզացված ջրի համակարգ	Purelab, ELGA
“Vortex” առանցքային խառնիչ	Stuart, BioCote, UK
0,2 մկմ թաղանթային ֆիլտրեր	E-chrom Tech, Taiwan
Ռեագենտներ	
ացետոնիտրիլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
մեթանոլ	HPLC Grad, 99,9 %, Sigma
ջուր	Milli-Q որակի, Millipore
քացախաթթու	մ.ա.h
Ստանդարտներ	
տանինի, կվարցետինի և ռուտինի ստանդարտներ	Sigma-Aldrich

Լաբորատոր ապակեղեն	
ԲԱՀՔ սրվակներ	Macherey-Nagel, Germany
տարբեր տարողության ապակյա չափագլաններ, բաժակներ, պիպետներ, չափիչ փորձանոթներ	
լուծիչների և էլուենտների վակուում ֆիլտրման համակարգ	Pall Corporation, USA

Նմուշապատրաստում: Տանինի, կվարցետինի և ռուտինի խառնուրդի մոդելային լուծույթի պատրաստման համար յուրաքանչյուր ստանդարտից վերցվում է 0,5մգ կշռազանգված և լուծվում 1մլ շարժուն ֆազի մեջ, սրվակը 10 րոպե պահվում է ուլտրաձայնի մեջ, ապա խառնվում VORTEX առանցքային խառնիչով 10 րոպե: Լուծույթը ֆիլտրվում է PTFE 0,45մկմ անցքերի մեծություն ունեցող ֆիլտրերով և տեղադրում ԲԱՀՔ սարքի ավտոմատ ներարկման համակարգի մեջ հետազոտվող նմուշների համար նախատեսված հարթակի վրա, որոնք ունեն որոշակի համարակալում:

Էլուենտի պատրաստում: ԲԱՀՔ մեթոդով տանինի, կվարցետինի և ռուտինի նույնականացման համար օգտագործվող էլուենտն իրենից ներկայացնում է ացետոնիտրիլ, ջուր և քացախաթթու՝ 50:45:5 ծավալային հարաբերությամբ: Էլուենտը պատրաստելուց հետո լավ խառնվում է, ապա ֆիլտրվում վակուում ֆիլտրման համակարգով 0,45մկմ անցքերի մեծությամբ թաղանթային ֆիլտրերով, ֆիլտրատը տեղափոխվում է ԲԱՀՔ սարքի էլուենտների համար նախատեսված ծավալի մեջ:

ԲԱՀՔ համակարգի ծրագրային ապահովման համապատասխան ենթաբաժնում տվյալների և մեթոդի պարամետրերի ներմուծումից հետո իրականացվում է մոդելային լուծույթի հե-

տազոտություն, արդյունքները գրանցվում են քրոմատոգրի տեսքով և մշակվում «*Empower*» ծրագրային ապահովման միջոցով:

Քրոմատոգրման պայմանները ներկայացված են աղյուսակ 8-ում:

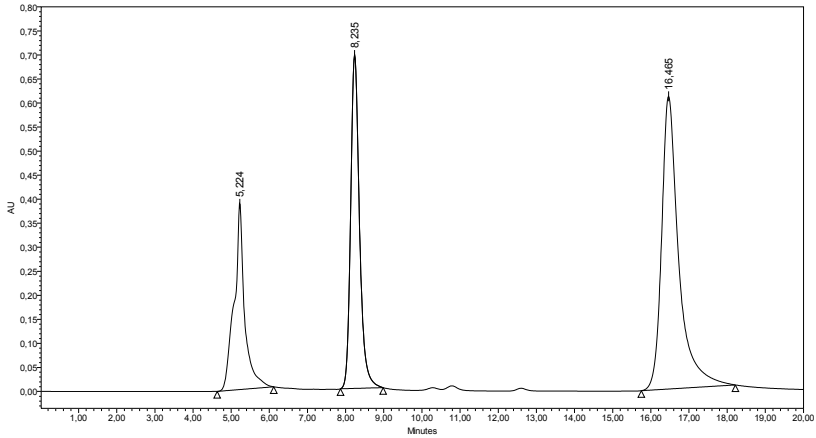
Աղյուսակ 8

Տանինի, կվարցետինի և ռուտինի որակական և քանակական որոշման մեթոդի քրոմատոգրման պայմանները

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Altima C18, 5մկմ, 250 x 4,6 մմ
Դետեկտորի ալիքի երկարություն	254 նմ
Հոսքի արագություն	1 մլ/ր
Ներարկման ծավալ	10 մկլ
Աշտարակի ջերմաստիճան	30 °C
Պոմպի աշխատանքային ռեժիմ	Իզոկրատիկ
Շարժուն ֆազ	Ացետոնիտրիլ, ջուր, քացախաթթու՝ 50:45:5 (ծ/ծ)

Մոդելային լուծույթի անալիզից հետո յուրաքանչյուր միացության առանձին նույնականացման համար պատրաստվում է տանինի, կվարցետինի և ռուտինի մոդելային լուծույթներ առանձին-առանձին և կատարվում հետազոտություն միևնույն քրոմատոգրման պայմաններում: Որակական նույնականացումն իրականացվում է ըստ պահման ժամանակների:

Նկար 17-ում ներկայացված է ռուտինի, տանինի և կվարցետինի խառնուրդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը:



Անվանումը	Պահման ժամանակ, Ռոպե	Մակերես, (AU*ռոպե)	Մակերես, %	Պիկի բարձրություն, AU
Տանին	5,224	7371342	19,63	388986
Ռուտին	8,235	11146677	29,68	694508
Կվարցետին	16,465	19032028	50,68	609171

Նկար 17. Ռուտինի, տանինի և կվարցետինի խառնուրդի մոդելային լուծույթի քրոմատոգիրը

* Նշված բոլոր փորձնական աշխատանքները ներկայացված են մոդելային լուծույթների օրինակներով (ուսումնական գործընթացն արդյունավետ կազմակերպման նպատակով), սակայն ներկայացված մեթոդները կարելի է կիրառել տարբեր բնույթի հումքերի նմուշներում նշված ԿԱՄ-երի նույնականացման համար:

Օգտագործված գրականություն

1. **Հայրապետյան Ա. Ս.,** Կիրառական բարձրարդյունավետ հեղուկային քրոմատոգրաֆիա, Երևան, 2016:

2. **Сычев К. С.,** Практический курс жидкостной хроматографии, Москва, Кокоро, 2013.

3. **Сычев С., Гаврилина В.,** Высокоэффективная жидкостная хроматография, Аналитика, физическая химия, распознавание многокомпонентных систем, Москва, Лань, 2013.

4. **Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W.,** Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd ed, New York, John Wiley&Sons, 2010.

5. ICH-Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), 2005, 1-13.

6. US FDA Volume II: Methods, Method Verification and Validation ORA-LAB.5.4.5 October 2003, Revised August 2014. http://www.fda.gov/ScienceResearch/FieldScience/ucm171877.htm. Accessed November 10, 2018.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԱԽԱԲԱՆ 3
Բարձրարդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիա 5
Հեղուկային քրոմատոգրաֆի հիմնական աշխատանքային հանգույցները 7
Միխոցային համակարգ 8
Խառնիչ 8
Ինժեկտոր 9
Քրոմատոգրաֆիական աշտարակ 9
Անշարժ ֆազ կամ սորբենտ 10
Դետեկտորներ 11
Շարժուն ֆազ 13
Աշտարակային քրոմատոգրաֆիայի տարատեսակները 15
Ադսորբցիոն քրոմատոգրաֆիա 15
Բաշխումային (հեղուկ-հեղուկային) քրոմատոգրաֆիա 16
Իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիա 16
Մոլեկուլ-էկսկլյուզիոն քրոմատոգրաֆիա 17
Աֆինային քրոմատոգրաֆիա 17
Քիրալային քրոմատոգրաֆիայի 18
Գերբարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիա (ԳԲԱՀՔ) 18
Միացությունների բաժանման եղանակները 19
Միացությունների պահումը և բաժանումը քրոմատոգրաֆիական համակարգում 20
Բազային գծի աղմուկների և տատանումների պատճառները, էլուետների հայտնաբերման և որոշման սահմանները 26
Որակական անալիզի հիմունքները: Միացությունների նույնականացման եղանակները: Նույնականացման կեղծ դրական և կեղծ բացասական արդյունքները 30
Հեղուկ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով միացությունների քանակական անալիզի սկզբունքները 34
Անալիտիկ մեթոդի վալիդացիոն ցուցանիշներ 37

ՓՈՐՁՆԱԿԱՆ ՄԱՍ
ՓՈՐՁ 1
ԲԱՀՔ եղանակով կողքային ռադիկալում չհագեցած խումբ պարունակող 2-ամինո-3-(4-(3,3-դիմեթիլբուտ-1-իլ-1-իլ)ֆենիլ) պրոպիոնաթթվի քիրալային անալիզ 40
ՓՈՐՁ 2
1-(4-քլորֆենիլ)-N,N-դիմեթիլ-α-(2-մեթիլպրոպիլ) ցիկլոբութան մեթանամինհիդրոքլորիդի(սիբուտրամին) մոդելային լուծույթի քրոմատոգրում ԲԱՀՔ եղանակով 45
ՓՈՐՁ 3
Էնալապրիլի նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով 49
ՓՈՐՁ 4
Օրգանական թթուների (ասպարագինաթթու, թրթնջկաթթու, գինեթթու, խնձորաթթու, կիտրոնաթթու, սաթաթթու, ֆումարաթթու) բաժանում և նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով 53
ՓՈՐՁ 5
Բենզոական թթվի նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով 58
Սպիտակուցային ամինաթթուների նույնականացման առանձնահատկությունները 62
ՓՈՐՁ 6
Սպիտակուցային ամինաթթուների քանակական և որակական նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով 65
Փորձ 7
Որոշ մոնո- և դիշաքարների (գլյուկոզ, ֆրուկտոզ, սախարոզ, մալթոզ, լակտոզ) քանակական և որակական որոշում ԲԱՀՔ եղանակով 70
ՓՈՐՁ 8
Տանինի, կվարցետինի և ռուտինի նույնականացում ԲԱՀՔ եղանակով 73
Օգտագործված գրականություն 77

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՎԵՏԻՍ ՀՈՎՀԱՆՆԵՍԻ ԾԱՏՈՒՐՅԱՆ

ԲԱՐՁՐԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏ ՀԵՂՈՒԿԱՅԻՆ ՔՐՈՄԱՏՈԳՐԱՖԻԱՅԻ ՏԵՍԱԿԱՆ ԵՎ ԿԻՐԱՌԱԿԱՆ ՀԻՄՈՒՆՔՆԵՐԸ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ «ԴԵՂԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ» ԱՌԱՐԿԱՅԻՑ

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Պատվականյանի
Հրատ. սրբագրումը՝ Ա. Գույումջյանի

Տպագրված է «ՎԱՌՄ» ՍՊԸ-ում:
Ք. Երևան, Տիգրան Մեծի 48, բն. 43

Ստորագրված է տպագրության՝ 30.04.2021:
Չափսը՝ 60x84 1/16: Տպ. մամուլը՝ 5.125:
Տպաքանակը՝ 100:

ԵՊՀ հրատարակչություն
ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1
www.publishing.am