



Интегрисане академске студије фармације  
Инструменталне методе- Б14

**П7. Високо ефикасна течна хроматографија-  
HPLC.**

**Проф. др Недељко Манојловић**

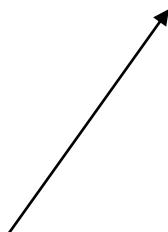
ТЕХНИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

НРПС

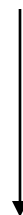
ВИСОКИХ МОГУЩЕСТВ

## **HPLC МЕТОДА**

КВАЛИТАТИВНА  
КВАНТИТАТИВНА



**МОБИЛНА ФАЗА** СЕ ПОД ПРИТИСКОМ  
УБРИЗГАВА У HPLC И ПРЕЛАЗИ  
ПРЕКО СТАЦИОНАРНЕ ФАЗЕ



## **СТАЦИОНАРНА ФАЗА**

-ЧВРСТА

- ТЕЧНА

-ЧВРСТА СТАЦИОНАРНА ФАЗА

представља колону испуњену  
чврстим адсорбенсом

-ТЕЧНУ СТАЦИОНАРНУ ФАЗУ

чине чврсти адсорбенс (носач колоне)  
и растварач или смеша адсорбовани  
на носачу

РЕЗУЛТАТ СУ  
**ЕЛУАЦИОНИ ХРОМАТОГРАМИ И  
РЕТЕНЦИОНИ ПАРАМЕТРИ**  
КОЈИ СЛУЖЕ ЗА  
КВАЛИТАТИВНУ И  
КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ

- **Мобилна фаза:**  
течност се (под притиском) уноси у систем из једне или неколико боца и протиче кроз колону константном брзином, а затим кроз детектор.

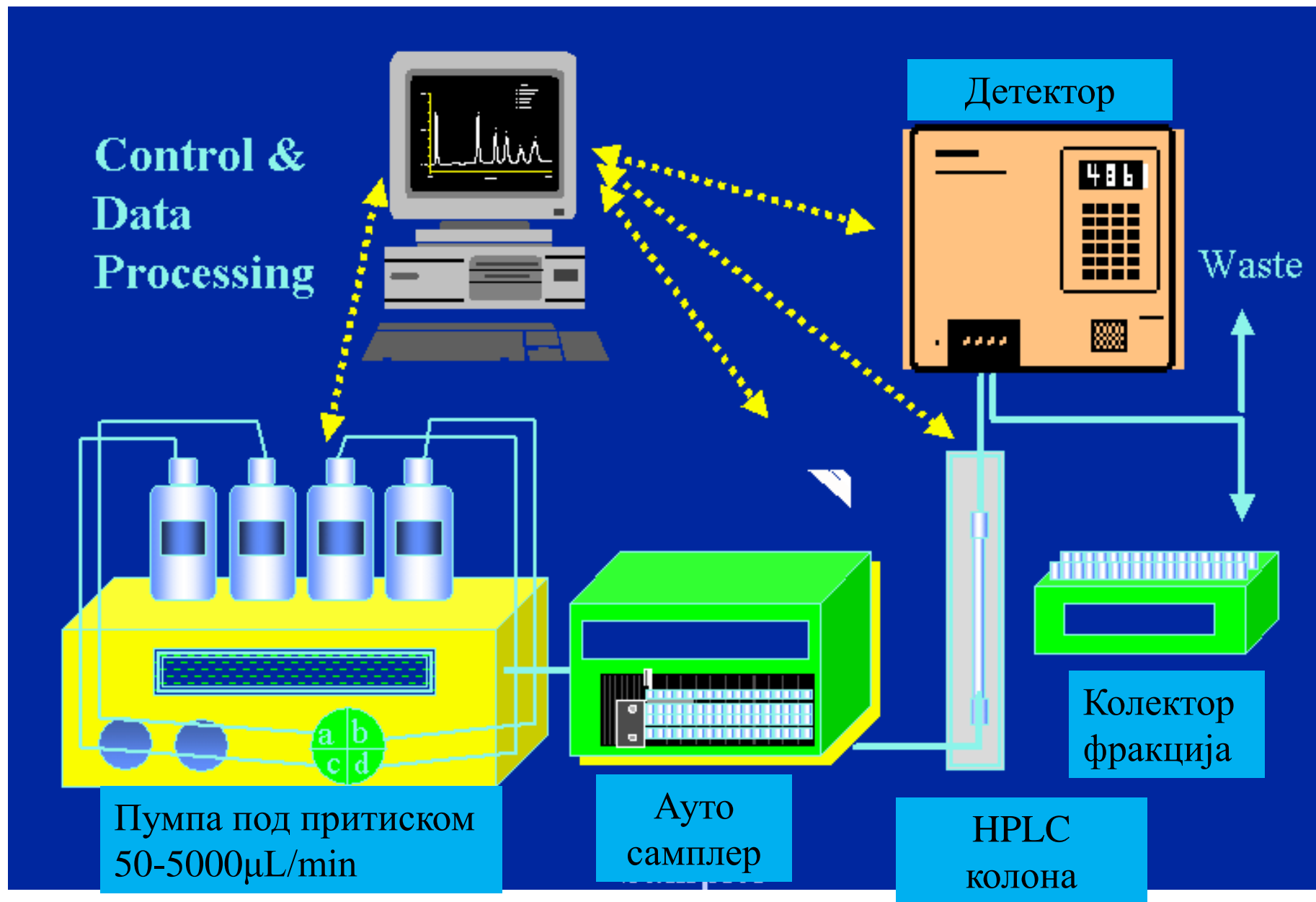


**Figure 1. Array of glass reservoirs.**

- **Стационарана фаза:**  
фино уситњена чврста материја или течност нанета на чврст носач или чврст носач који је хемијски модификован увођењем огранских група.
- Заснива се на адсорпцији, расподели измени јона или расподели по величини масе.

- **Инструмент**
- **Резервоар за растварач**
- **пумпа** способна за потисак течности на високом притиску и проток од 10 ml/min
- **инјектор** који може да прими од 1 до 200 ml, најчешће 20 ml се користи као стандард, (шприц или инјекциони вентил),

- **хроматографска колона**, најчешће од нерђајућег челика пакована обично са октадецилсиланом превученим силикагелом (3, 5 или 10 mm).
- **детектор**, обично UV-VIS детектор
- **систем за хватање података** (интегратор или РС) и **писач**.
- Температура је константна.



- Метода: Колона се кондиционира прописаном мобилном фазом. Испитивана супстанца и референтни раствор се ињицирају и снине хроматограми. Одреди се површине пикова.
- Проценат одређене компоненте израчуна се одређивањем површине пика као процента укупне површине свих пикова.

- Број теоријских подова  $n$  израчунава се из података добијених под изотермалним условима према следећем изразу:

$$n = 5,54 (t_r/W_{1/2})^2$$

- $t_r$  = растојање у мм од тачке ињицирања до нормале спуштене из врха датог пика
- $W_{1/2}$  = ширина пика на половини висине (у mm)



- **Ефикасност колоне** представља теоријске подове по метру:  $n \times 100/L$
- Где је  $L$  дужина колоне у cm.
- Однос расподеле масе  $D_m$  (фактор капацитета)

количина растворене супстанце у стационарној фази

$$D_m = \frac{\text{количина растворене супстанце у стационарној фази}}{\text{количина растворене супстанце у мобилној фази}}$$

количина растворене супстанце у мобилној фази

$K$  = равнотежни коефицијент расподеле

$V_s$  = запремина стационарне фазе

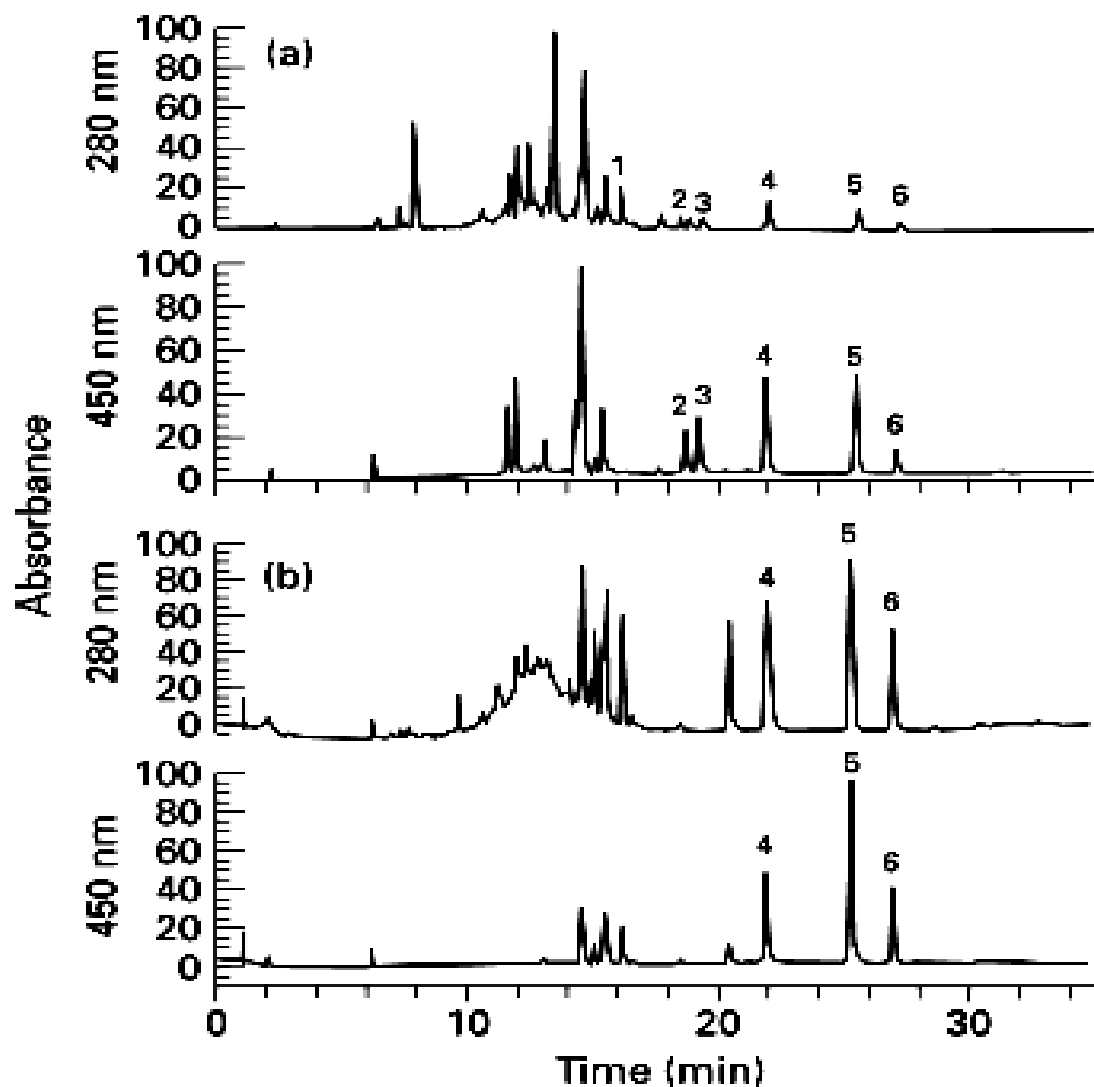
$V_m$  = запремина мобилне фазе

$$K = \frac{V_s}{V_m}$$

- Однос расподеле масе неке компоненте може се одредити из хроматограма према следећем изразу:

$$D_m = \frac{t_R - t_{R'}}{t_{R'}}$$

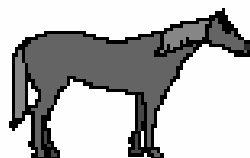
- $t_R$  = растојање у mm, дуж базне линије од тачке ињицирања до нормале спуштене из врха пика, који одговара датој компоненти
- $t_{R'}$  = растојање у mm, дуж базне линије од тачке ињицирања до нормале спуштене из врха пика, који одговара незадржаној компоненти



HPLC анализа метанолских екстраката: a) *Rheum palmatum* b) *Rumex dentatus*. Апсорбанца је измерена на 280 и 450 nm. Пикови представљају следећа једињења 1) Циметна киселина 2) реин 3) алое-емодин 4) реум емодин 5) хризифанол 6) фисцион

# Примена HPLC

Ветерина



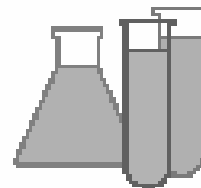
Животна  
средина



Пољопривреда и  
храна



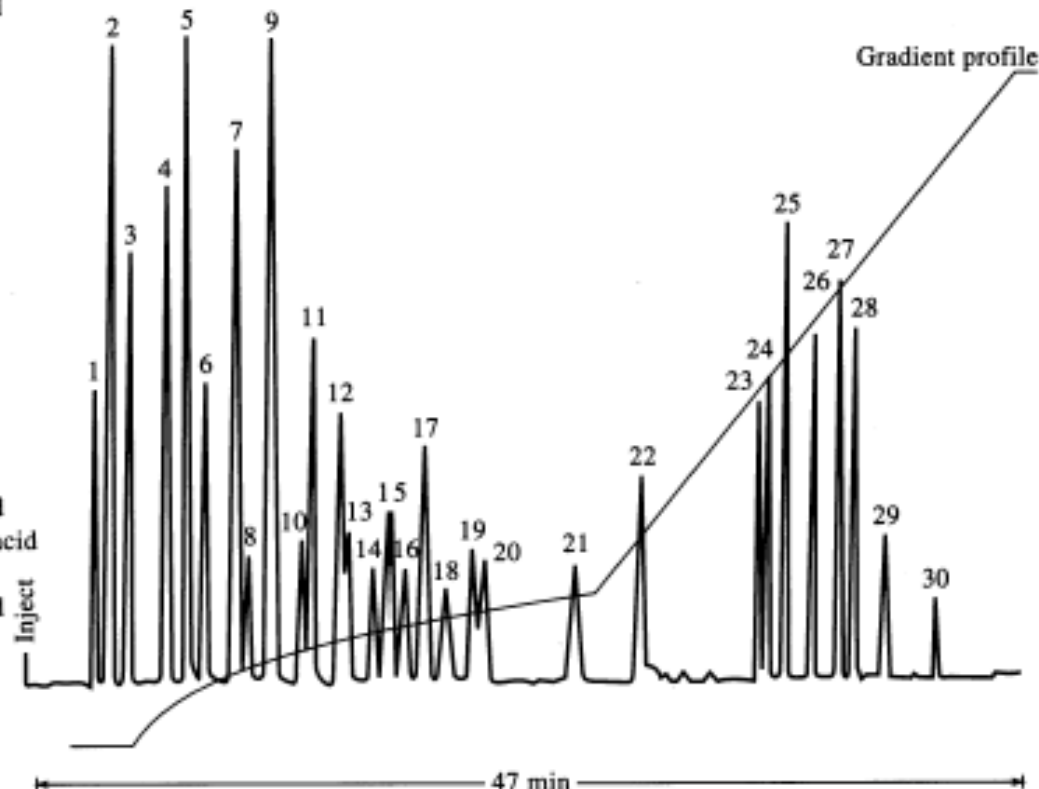
Биомедицина



Хемија- Фармацеутска  
анализа

Figure 28-18:

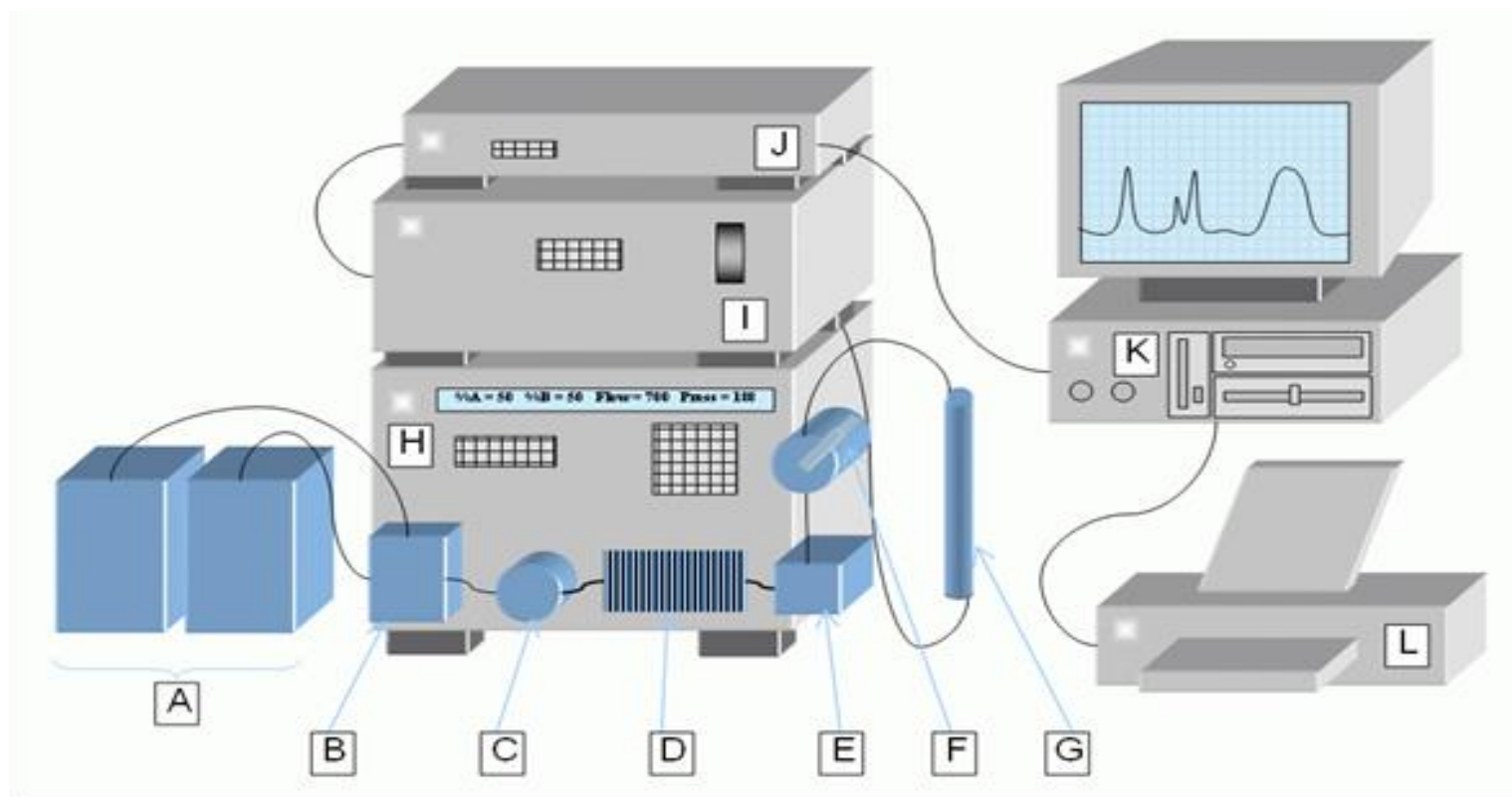
1. Phosphoserine
2. Aspartic acid
3. Glutamic acid
4.  $\alpha$ -Amino adipic acid
5. Asparagine
6. Serine
7. Glutamine
8. Histidine
9. Glycine
10. Threonine
11. Citrulline
12. 1-Methylhistidine
13. 3-Methylhistidine
14. Arginine
15.  $\beta$ -Alanine
16. Alanine
17. Taurine
18. Anserine
19.  $\beta$ -Aminobutyric acid
20.  $\beta$ -Aminoisobutyric acid
21. Tyrosine
22.  $\alpha$ -Aminobutyric acid
23. Methionine
24. Valine
25. Tryptophan
26. Phenylalanine
27. Isoleucine
28. Leucine
29.  $\delta$ -Hydroxylysine
30. Lysine



# ВРСТЕ КОЛОНА

- ОД НЕРЂАЈУЋЕГ ЧЕЛИКА ИЛИ ДЕБЉЕГ СТАКЛА
- **СТАКЛЕНЕ КОЛОНЕ** СЕ НАЛАЗЕ У ЧЕЛИЧНИМ ЦЕВИМА, А ДУГЕ СУ ОД 10-30 cm, УНУТРАЧЊЕГ ПРЕЧНИКА 1-5 mm. Користе се у аналитици лекова.

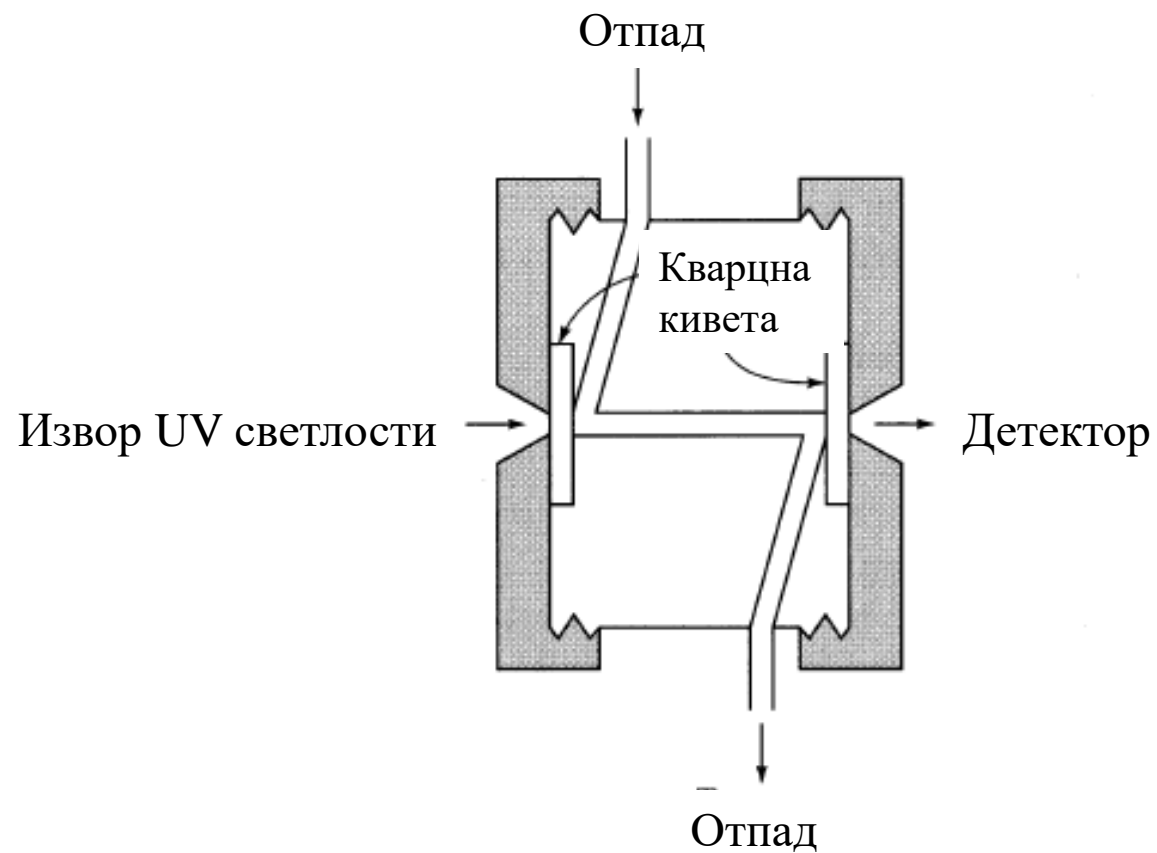
- **КАПИЛАРНЕ КОЛОНЕ** – мањи значај
- **ДЕТЕКТОРИ**
  - UV апсорпциони детектори
  - Флуоресцентни детектори
  - IR детектори
  - Електрохемијски детектори



Шема уређаја за течну хроматографију:

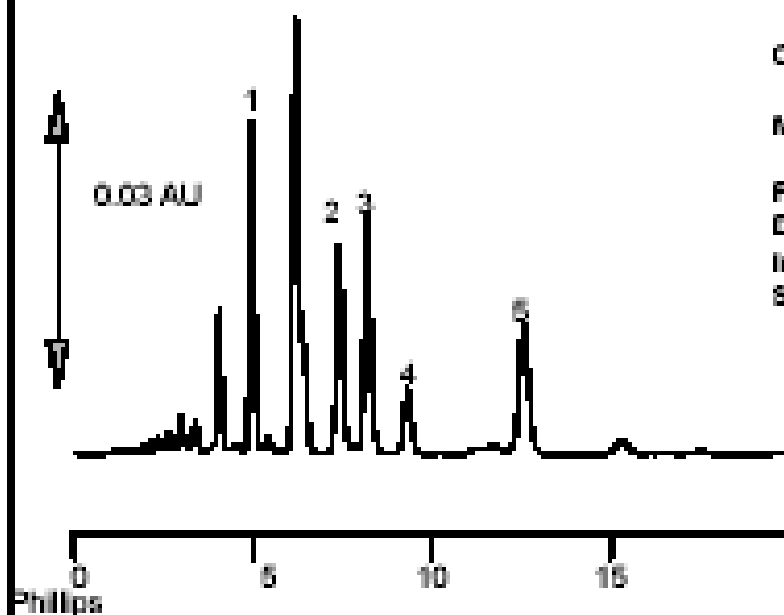
**A**-резервоар мобилне фазе; **B**-вентил за мешање и пумпа; **C**-*drain* вентил; **D**-уређај за контролу притиска **E**-комера за мешање (миксер); **F**-инјектор; **G**-колона; **H**-HPLC-компонента; **I**-детектор; **J**-контролер; **K**-компјутер; **L**-штампач

## UV-VIS детектор за HPLC



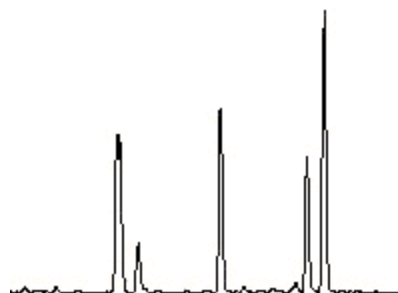


## Кофеин и његови метаболити



Column: SymmetryShield™ RP8, 5  $\mu$ m,  
3 mm x 150 mm  
Mobile Phase: 20 mM Ammonium Acetate pH 5:  
Acetonitrile (95:5)  
Flow Rate: 0.6 mL/min  
Detection: UV at 254 nm  
Injection Volume: 20  $\mu$ L  
Sample Identification:  
Peak 1: Theobromine  
Peak 2: Paraxanthine  
Peak 3: Theophylline  
Peak 4: Hydroxyethyltheophylline (L.S.)  
Peak 5: Caffeine





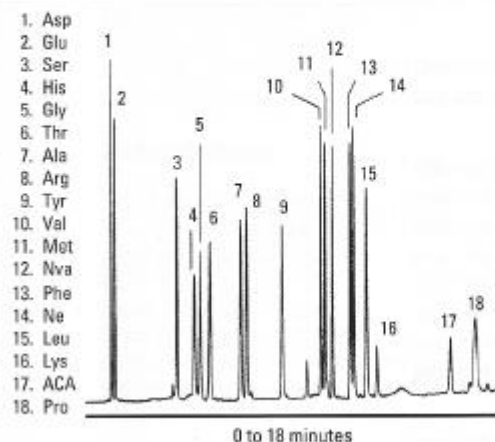




# HPLC-Примена

## Фармацеутска анализа

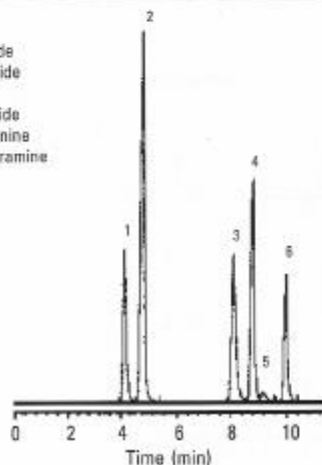
## Анализа животне средине полициклични ароматични угљоводоници



Sample: Amino acids (10 pmol each),  
AminoQuant derivatization  
Column: Amino Acid (C18) column, 2.1 x 200 mm, 5 µm,  
(P/N: 79915AA-572)  
Mobile phase: A = 20 mM sodium acetate, 0.018% TEA,  
pH 7.2, 0.3% THF  
B = 100 mM sodium acetate, pH 7.2,  
acetonitrile, methanol (1/2/2)  
Gradient: 0 to 60% B in 17 min  
Flow rate: 0.45 mL/min  
Temperature: 40°C  
Detection: Fluorescence

## Биотехнолошка анализа Амино киселине

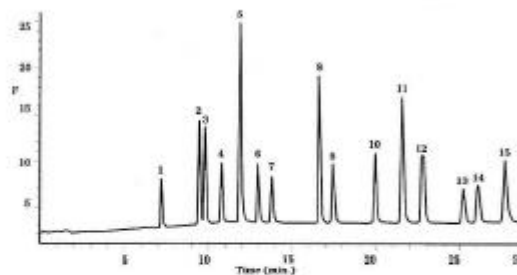
1. Tocainamide
2. Procainamide
3. Quinine
4. Disopyramide
5. Dihydroquinine
6. Diphenhydramine



Sample: Basic Drugs  
Column: Asahipak ODP-50, 4 x 250 mm,  
5 µm, (P/N: 79923DP-584)  
Mobile phase: A = Buffer pH 12,  
1:19 diluted  
B = Acetonitrile  
10–70% B in 8 min  
Gradient:  
Flow rate: 1 mL/min  
Temperature: 50°C  
Detection: UV

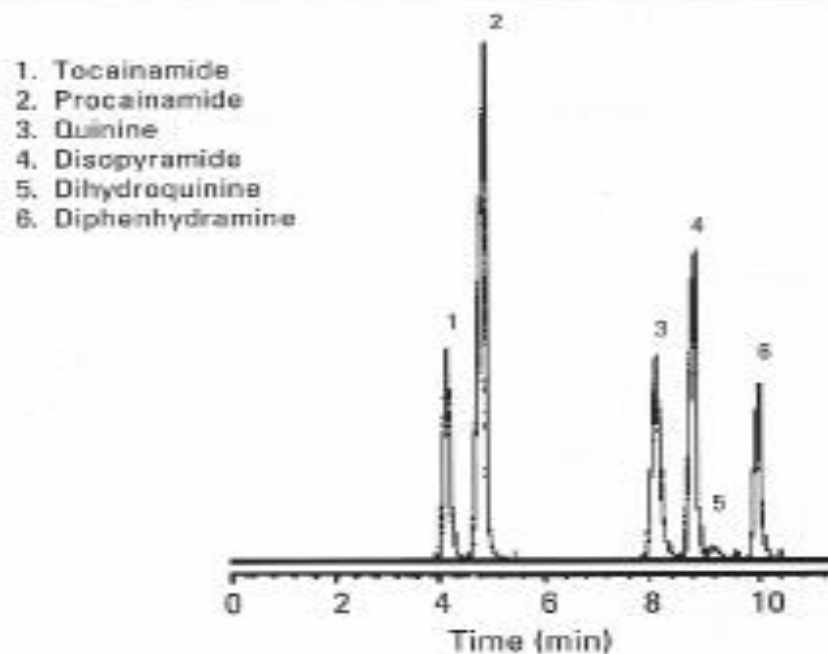
Pub No.: 12-51

1. Naphthalene
2. Acenaphthalene
3. Fluorene
4. Phenanthrene
5. Anthracene
6. Fluoranthene
7. Pyrene
8. Benzo(a)anthracene
9. Chrysene
10. Benzo(a)fluoranthene
11. Benzo(k)fluoranthene
12. Benzol(a)pyrene
13. Dibenzo(a,h)anthracene
14. Benzo(g,h,i)perylene
15. Indeno(1,2,3-cd)pyrene



Sample: PAH Standard  
Column: LiChrospher PAH, 3.0 X 250 mm, 5 µm,  
(P/N: 79925PA-583)  
Mobile phase: A = Water, B = Acetonitrile  
Gradient: 0 min 50% B, 3 min 60% B, 15.4 min 100% B,  
23.5 min 50% B  
Flow rate: 0.8 mL/min  
Temperature: 27°C  
Detection: 254 nm

# Фармацевтска анализа: Основне дроге



Sample: Basic Drugs  
Column: Asahipak ODP-50, 4 x 250 mm,  
5  $\mu$ m, (P/N: 79923DP-584)  
Mobile phase: A = Buffer pH 12,  
1:19 diluted  
B = Acetonitrile  
Gradient: 10–70% B in 8 min  
Flow rate: 1 ml/min  
Temperature: 50°C  
Detection: UV

Pub No.: 12-51

- **Примена HPLC за квантативну анализу дрога**
- Анализа **парацетамол** таблета коришћењем калибрационе криве
- Мобилна фаза: 0.05 М сирћетна киселина/ацетонитрил (90:15)
- измерити 125 10 mg стандарда парацетамола, пренети у балон од 250 ml и допунити сирћетном киселином до црте (0,05 M). Промућкати да се садржај раствори (I).
- припремити серију стандардних раствора следећих концентрација 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 mg/100 ml парацетамола од раствора I.
- измерити и спрашити 20 таблета

- измерити прах од таблета који садржи 125 mg 10 mg парацетамола
- мешати спрашене таблете са 125 ml сирћетне киселине (0,05 M) у балону од 250 ml у току 5 минута и тада допунити балон до црте са сирћетном киселином (0,05 M).
- филтрирати 50 ml раствора у балон са округлим дном и тада пренети 25 ml аликвота филтрата у балон од 100 ml и допунити до црте са сирћетном киселином (0,05 M).
- узети 10 ml раствореног екстракта и пренети у балон од 100 ml који се допуни до црте са сирћетном киселином (0,05M)
- Анализирати стандарде и екстракт



- Тежина 20 таблета = 12,1891 g
- Тежина 1 таблете = 609,5 mg
- Тежина узете количине спрашених таблета = 150,5 mg
- Тежина калибрационог стандарда парацетамола = 126,1 mg
- Површина пика парацетамола екстрахованог из таблете = 45205
- Израчунати % садржаја парацетамола у анализираним спрашеним таблетама.
- Калибрациона крива fig 12.13

$$y = 35656,585x + 80,803$$

$$45205 = 35656,585x + 80$$

$$X = 1,266 \text{ mg/100 ml}$$

x = концентрација парацетамола у екстракту таблете  
коришћени кораци за разблаживања

25 ml у 100 ml (x 4)

10 ml у 100 ml (x 10)

Укупно x 40

количина очекиваног парацетамола  $150,5/609,5 \times 500 \text{ mg} =$   
123,5 mg

проценат састава  $126,6/123,5 \times 100 = 102,5 \%$

# Одређивање Пеницилина помоћу C18 RP-HPLC

**Услови за HPLC:**

**Колона: Spherisorb**

**Мобилна фаза:**

**0,01 M оксалне киселине**

**0,01 M тетраметиламонијумхлорида,**

**3 mM EDTA**

**pH 2,5/ацетонитрила(80:20)**

**Течна фаза: 1,0 ml/min**

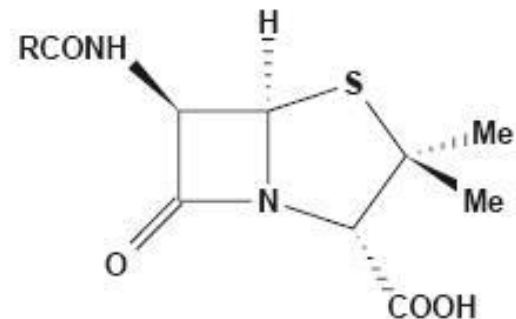
**Температура: 30°C.**

**Одређивање: UV на 265 nm.**

**Запремина ињектованог дела 20 µl**

**Стандардни препарат: 1,0 mg/ 10 ml**

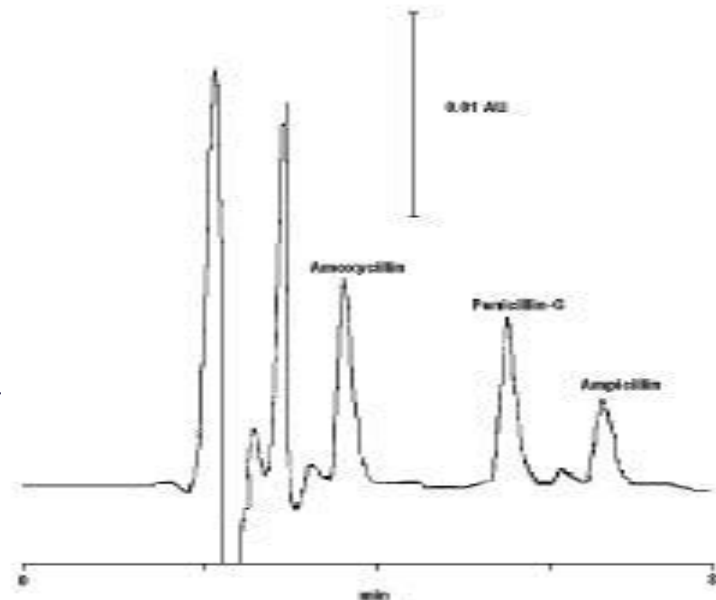
**0,01 M**



Amoxicillin  $R = -CH_2CH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$

Penicillin-G  $R = -CH_2CH_2C_6H_4CH_2CO_2H$

Ampicillin  $R = -CH_2CH_2CH_2NH_2$



# Одређивање хлорамфеникола са C18 RP-HPLC

Услови за извођење ХПЛЦ:

Колона: Spherisorb

Мобилна фаза: вода/метанол(40:60)

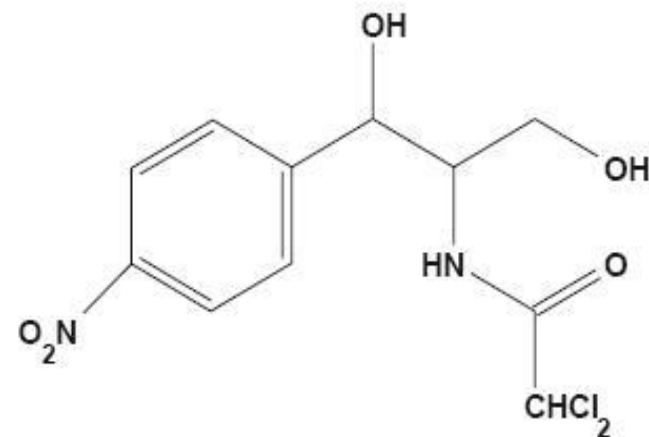
Тецна фаза: 1,0 ml/min.

Температура: 30°C

Одређивање: UV на 280 nm

Запремина инјектованог дела: 20 µl

Стандардни препарат: 1,0 mg  
хлорамфеникола у 10 ml метанола.



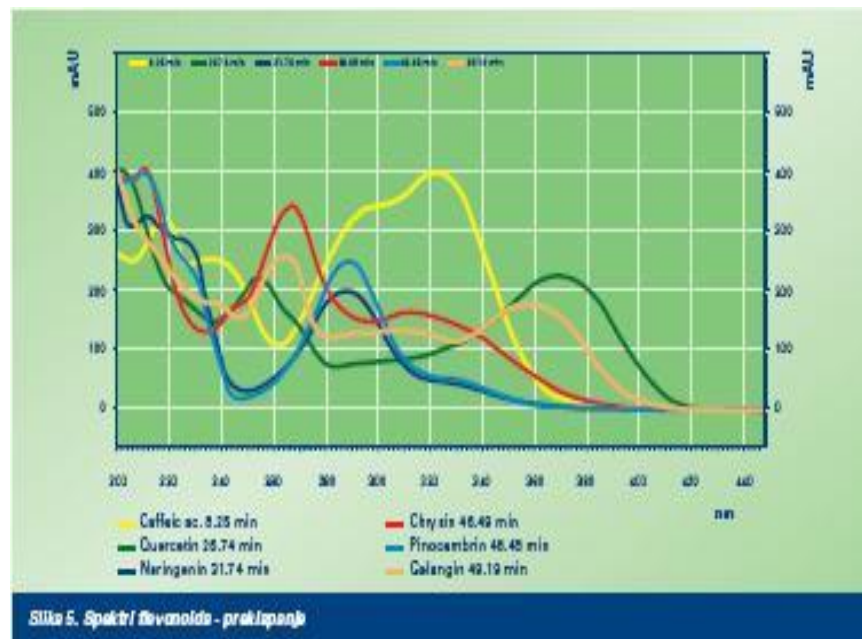
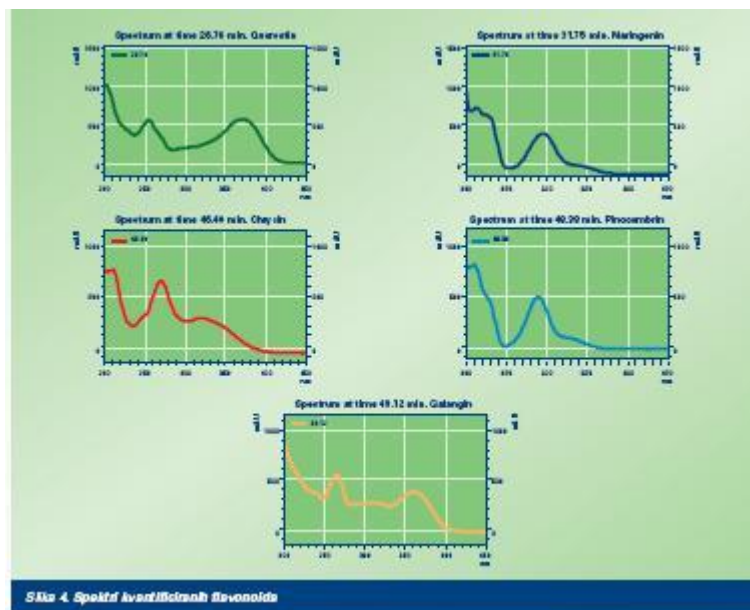
*Chloramphenicol*

# HPLC метода за анализу екстракта прополиса

- Испитује се непрецизност мерења током дана, токсичност и линеарност у очекиваном распону. Непрецизност мерења током дана изражена преко коефицијента варијације износила је за кверцетин 9,4 % , нарингенин 6,65% , а за кризин, пиноцебрин и галангин испод 1 % .
- Тачност је одређена преко теста искоришћења (Recovery test) додатком 10, 20 и 50  $\mu\text{g/ml}$  стандарда и износила је 92-109%.
- Линеарност методе спроведена је мерењем концентрације стандарда у распону од 6,25-100  $\mu\text{g/ml}$  и коефицијент корелације за све флавоноиде виси је од 0,9993.



# UV-VIS спектри кверцетина, нарингенина, хризина, пиноцебрина, галангина



Испитана HPLC метода поуздана је за квантитативно мерење флавоноидних компоненти прополиса, а применом карактеристичног UV-спектра могу се додатно потврдити поједине компоненте.





Спремите се за колоквијум.  
Желим Вам срећу