



УДК 546.34'137:543.544.42

## Применение перхлората лития в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии аминокислот

Азарова И.Н., Барам Г.И.

ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", Новосибирск

Поступила в редакцию 10.07.2013 г.

### Аннотация

Исследовано влияние перхлората лития как компонента подвижной фазы (ПФ) на хроматографическое поведение соединений с аминогруппами в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Показано, что добавка  $LiClO_4$  в ПФ ( $pH 2$ ) как в изократическом, так и в градиентном режимах элюирования, приводит к увеличению удерживания и уменьшению асимметрии и ширины пиков протонированных оснований. Найдено, что максимальный эффект наблюдается при концентрациях  $LiClO_4$  в ПФ  $\geq 0.2$  М.

**Ключевые слова:** ОФ ВЭЖХ; ион-парный агент, перхлорат лития, аминокислоты

The influence of lithium perchlorate as a mobile phase (MP) component on chromatographic behavior of amino compounds in reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was studied. It was shown that the addition of  $LiClO_4$  in MP ( $pH 2$ ) in both isocratic and gradient elution mode leads to the increase of retention for protonated bases and to the decrease of their peak asymmetry and peak widths. It was found that the maximal effect observed at concentrations of  $LiClO_4$  in MP  $\geq 0.2$  M.

**Keywords:** RP-HPLC; ion-pairing agent; lithium perchlorate; amino compounds

### Введение

Хроматографический анализ образцов, содержащих одновременно полярные и неполярные вещества, уже многие годы чаще всего выполняется методом градиентной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для увеличения удерживания ионов карбоновых кислот и аминов в ОФ ВЭЖХ в состав подвижной фазы обычно вводят соли гидрофобных оснований и кислот (ион-парные агенты), в качестве которых применяют соответственно алкиламины и алкилсульфаты или алкилсульфонаты [1, 2]. Если в изократической ВЭЖХ, когда концентрация ион-парных агентов в подвижной фазе постоянна, добиться хорошей воспроизводимости удерживания ионов на обращенной фазе достаточно просто, то в градиентной ВЭЖХ это сделать труднее. Проблема связана с тем, что оптимальная концентрация перечисленных ион-парных агентов весьма низкая и составляет, как правило, 0.1-1 мМ, что требует после окончания анализа очень длительной промывки колонки исходным элюентом для восстановления ее равновесного состояния перед инъекцией нового образца. Именно по этой причине

гидрофобные алкилсульфаты, алкилсульфонаты и алкиламины целесообразно применять только в изократической обращенно-фазовой ВЭЖХ [3, 4].

Другая проблема, связанная с низкой концентрацией ион-парного агента в элюенте, зачастую соизмеримой с концентрацией аналитов в инжестируемой пробе, заключается в том, что в случае недостатка ион-парного агента ширина хроматографических пиков может заметно увеличиться [5].

В градиентной ОФ ВЭЖХ для увеличения удерживания анионов в элюент иногда вводят соли умеренно гидрофобных алкиламинов [4, 6]. Эти вещества, сами обладая заметным поглощением в области коротких длин волн (200-210 нм), довольно быстро окисляются с образованием УФ-поглощающих продуктов, что еще больше затрудняет детектирование, когда требуется высокая чувствительность анализа. По этим соображениям, когда приходится иметь дело с анионами карбоновых кислот, то, в общем случае, при их анализе методом градиентной ОФ ВЭЖХ целесообразно не вводить в состав ПФ гидрофобный катион (ион-парный агент), а снизить значение  $pH$  элюента до 2-3. Большинство органических кислот в этих условиях не диссоциированы и хроматографируются в виде достаточно гидрофобных и хорошо удерживаемых веществ.

В градиентной ОФ ВЭЖХ протонированных аминокислот широко применяемым ион-парным агентом является анион трифторацетата в виде трифторуксусной кислоты (ТФУ), концентрацию которой в элюенте выбирают обычно в диапазоне 0.01-0.05 М [5]. Пожалуй, единственным недостатком ТФУ является то, что она существенно поглощает УФ-излучение при 200-210 нм, что накладывает понятные ограничения на чувствительность анализа.

Хорошая альтернатива трифторуксусной кислоте при градиентной ОФ ВЭЖХ – перхлорат-анион, который практически не поглощает в коротковолновой области УФ-спектра. Перхлораты натрия и лития хорошо растворимы в ацетонитриле, метаноле, этаноле [7] и не обладают буферной емкостью, что позволяет применять их в высоких концентрациях в широком диапазоне значений  $pH$  подвижной фазы.

В данной работе мы приводим результаты систематического исследования применимости перхлорат-аниона в качестве ион-парного агента в градиентной ОФ ВЭЖХ аминов.

## Эксперимент

Исследования проводили на хроматографе "Милихром А-02" (ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск, Россия) с колонкой  $\varnothing 2 \times 75$  мм, заполненной адсорбентом *ProntoSIL 120-5-C18 AQ* (*Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH*, Германия). Хроматограммы обрабатывали с помощью компьютерной программы "Мультихром-СПЕКТР" (ЗАО "Амперсенд", г. Москва, Россия).

Хроматографические эксперименты проводили в изократическом и градиентном режимах элюирования при скорости потока 100 мкл/мин и температуре колонки 40°C. Детектирование осуществляли при длине волны 210 нм. Остальные условия приведены в тексте и подписях к рисункам.

Использовали ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (НПК "Криохром", Россия);  $LiClO_4 \cdot 3H_2O$  (*Panreac*, Испания) и безводный  $LiClO_4$  (*Sigma-Aldrich*); 70% хлорную кислоту (*Sigma-Aldrich*); серную кислоту "ос.ч."; натрия гидроокись "х.ч."; натрий сернокислый безводный "х.ч."; вещества-аналиты с содержанием основного вещества не менее 95%.

## Обсуждение результатов

Анализ литературных данных показывает, что при использовании перхлоратов в составе элюентов для ВЭЖХ концентрация перхлорат-иона в водной части ПФ может составлять от 0.01-0.02 М [8, 9] до 0.1-0.25 М [10-14]. В работе [15] для разделения аминокислот и пептидов на колонке *LiChrosorb RP-18* использовали 0.6 М  $HClO_4$  ( $pH$  0,2) и градиент концентрации ацетонитрила. Экстремально высокие концентрации перхлората (2 М  $ClO_4^-$  в водной части элюента, [16]) применяли, очевидно, для достижения максимального хаотропного эффекта, при анализе лекарственного вещества тилозина, относящегося к классу макролидов.

Исследование удерживания соединений основного характера в зависимости от концентрации перхлорат-иона в подвижной фазе в изократической ОФ ВЭЖХ на колонке *Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>* проведено в работах [17-20]. Было показано, что с увеличением концентрации  $ClO_4^-$  до 0.114 М (в расчете на водную часть ПФ;  $pH$  2) удерживание протонированных аминосоединений возрастает, в то время как для анионов и нейтральных веществ это явление не наблюдается. Область более высоких концентраций  $ClO_4^-$  в элюенте и эффект при градиентном элюировании авторами не рассматривались.

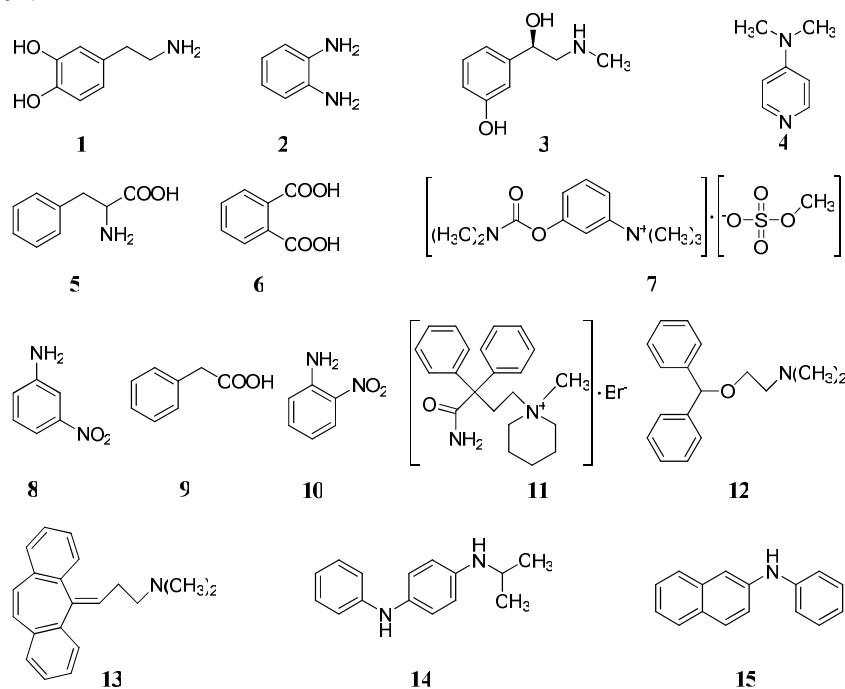


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых веществ: 1 – дофамин; 2 – 1,2-фенилендиамин; 3 – мезатон; 4 – 4-(диметиламино)пиридин; 5 – фенилаланин; 6 – *o*-фталевая кислота; 7 – прозерин; 8 – 3-нитроанилин; 9 – фенилуксусная кислота; 10 – 2-нитроанилин; 11 – фенпивериния бромид; 12 – димедрол; 13 – циклобензапрын; 14 – *N*-изопропил-*N'*-фенил-1,4-фенилендиамин; 15 – *N*-фенил-2-нафтиламин.

Для исследования хроматографического поведения соединений с разными кислотно-основными и гидрофобными свойствами в присутствии перхлората в составе ПФ нами были выбраны 15 веществ, формулы которых приведены на рис. 1. Хроматографические характеристики этих соединений исследовали как в изократическом, так и в градиентном режимах элюирования, варьируя концентрацию  $LiClO_4$  в подвижной фазе. В использованных нами кислых

подвижных фазах (их состав указан в подписях к рисункам) аминокислоты веществ, являющихся основаниями, протонированы, и такие аналиты в растворе существуют в форме катионов; диссоциация карбоксильных групп в значительной степени подавлена, и органические кислоты находятся преимущественно в неионизированной форме; молекулы *o*-нитроанилина, не проявляющего основных свойств, электронейтральны.

Выбранные вещества (рис. 1) значительно различаются по гидрофобности, и разделить их все в изократическом режиме элюирования, практически, невозможно. Поэтому исследуемые соединения были сгруппированы в три смеси, которые хроматографировали отдельно, при подходящих концентрациях ацетонитрила в подвижной фазе и одинаковых прочих условиях. На рис. 2 в качестве примера показаны хроматограммы шестикомпонентной смеси без добавки перхлората лития в ПФ (рис. 2А) и при его концентрации 0.2 М (рис. 2Б). Остальные хроматографические условия приведены в подписи к рисунку.

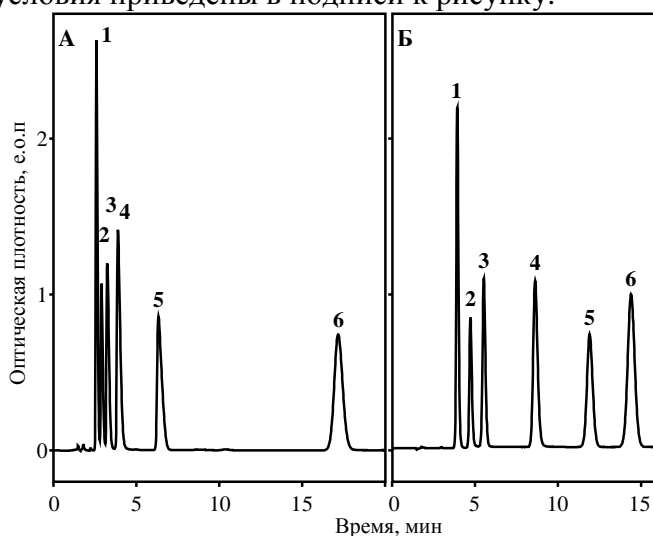


Рис. 2. Хроматограммы смеси веществ в изократическом режиме.

А – без добавки перхлората лития в ПФ; Б – с добавкой 0.2 М  $LiClO_4$ .

Названия веществ даны в подписи к рис. 1. Хроматографические условия: колонка *ProntoSIL-120-5-C18 AQ* ( $\varnothing 2 \times 75$  мм), 40°C; подвижная фаза [0.005 М  $HClO_4$  в воде – ацетонитрил] (95:5). Объем пробы 4 мкл.

Из рис. 2 видно, что аминсоединения 1-5 в присутствии 0.2 М перхлората лития в элюенте дают более узкие и симметричные пики и значительно лучше удерживаются на ОФ колонке. Фталевая кислота (пик 6), взятая здесь для сравнения, наоборот, выходит из колонки несколько раньше. Для остальных исследованных аминсоединений, за исключением наиболее гидрофобных веществ (соединения 14 и 15 на рис. 1), при использовании перхлоратсодержащих элюентов также характерно увеличение удерживания, улучшение симметрии пиков и уменьшение их ширины. Это видно из рис. 3, где приведены зависимости факторов удерживания от концентрации  $LiClO_4$  в ПФ.

Влияние перхлората наиболее существенно для относительно гидрофильных аминсоединений, хроматографирующихся при содержании ацетонитрила в ПФ до 50%. Для более гидрофобных аминсодержащих веществ (рис. 3 В) наличие соли в ПФ менее значимо, и их удерживание определяется, главным образом, содержанием органического растворителя в элюенте. При добавлении перхлората лития в ПФ может наблюдаться обращение порядка выхода пиков веществ с отличающимися

кислотно-основными свойствами (например, веществ 10 и 11 на рис. 3Б), что можно использовать для изменения селективности. Удерживание практически нейтральных в данных условиях *o*- и *m*-нитроанилинов не зависит от концентрации  $LiClO_4$ . Небольшое уменьшение удерживания можно объяснить общей тенденцией к некоторому уменьшению удерживания нейтральных соединений в присутствии ион-парных агентов [21].

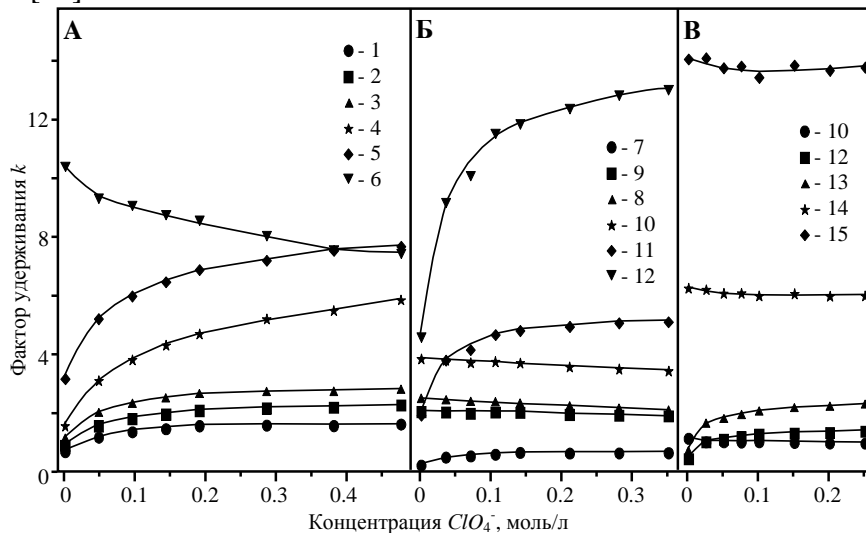


Рис. 3. Влияние добавки перхлората лития в ПФ на удерживание веществ при изократическом элюировании. Номера веществ даны в соответствии с рис. 1. Содержание ацетонитрила в ПФ на рис. 3А: 5% (об./об.); рис. 3Б: 30%; рис. 3В: 50%; остальные условия – в подписи к рис. 2.

Перхлорат лития в ПФ, как правило, способствует значительному улучшению формы и уменьшению ширины хроматографических пиков протонированных аминов (рис. 2), что связано, видимо, с подавлением ионообменных взаимодействий с остаточными силанольными группами адсорбента в присутствии катиона-конкурента  $Li^+$ . Эффективность колонки, рассчитанная, например, по пику 4-(диметиламино)пиридина (пик №4) возросла с 1600 теоретических тарелок (т.т.) в отсутствие перхлората лития до 4800 т.т. при его концентрации в элюенте 0.2 М. Фактор асимметрии  $A_{10\%}$  этого пика уменьшился соответственно с 2.6 до 1.3. При дальнейшем увеличении концентрации перхлората эффективность и асимметрия существенно не изменялись.

Важное наблюдение, которое следует из приведенных на рис. 3 данных, состоит в том, что максимальное удерживание большинства аминокислот обеспечивается при концентрации перхлората лития в подвижной фазе 0.1–0.2 М, в зависимости от содержания в ней ацетонитрила. Чем больше ацетонитрила содержит ПФ, тем меньше так называемая "насыщающая" концентрация перхлората, при которой обеспечивается максимум и стабилизация удерживания протонированных оснований. Это весьма существенно для градиентного элюирования, о чем будет сказано ниже. Здесь отметим, что полученные нами данные согласуются с расчетной оценкой "насыщающей" концентрации  $ClO_4^-$  в ПФ [18]. Математическая модель, предложенная в данной работе для ряда алкилпиридинов (колонка *Zorbax Eclipse XDB-C18*; элюирующая система [ $NaClO_4$  и  $HClO_4$  в воде,  $pH$  2.6]:[ацетонитрил] (90:10); в расчет приняты значения  $k$ , составляющие 95% от их "предельных" величин) дает значения "насыщающей" концентрации перхлората в ПФ, близкие к 0.2 М.

Таким образом, концентрацию перхлората лития 0.2 М в элюенте можно считать оптимальной для обеспечения стабильного удерживания, повышения эффективности и симметрии хроматографических пиков аминсоединений в условиях изократической ОФ ВЭЖХ в диапазоне концентраций ацетонитрила в ПФ до 50% (об./об.).

Замена  $LiClO_4$  на  $NaClO_4$  в экспериментах, аналогичных выше описанным, показала, что катион соли не оказывает влияния на хроматографический результат. Преимуществом литиевой соли является ее существенно бóльшая растворимость в органических растворителях (табл. 1).

Таблица 1. Растворимость перхлоратов щелочных металлов и аммония в органических растворителях при 25°C (г/100 г растворителя) [7].

Растворитель	Перхлораты		
	$LiClO_4$	$NaClO_4$	$NH_4ClO_4$
Метилловый спирт	182.25	51.355	6.862
Этиловый спирт	151.76	14.705	1.907
<i>n</i> -Пропиловый спирт	105.00	4.888	0.3865
<i>n</i> -Бутиловый спирт	79.31	1.864	0.017
Изобутиловый спирт	58.05	0.786	0.1272
Ацетон	136.52	51.745	2.26
Уксусноэтиловый эфир	95.12	9.649	0.032
Этиловый эфир	113.72	нераств.	нераств.
Ацетонитрил <sup>*)</sup>	≥ 1 М	–	–

<sup>\*)</sup>Данные авторов.

Замена перхлорат-иона на гидрофильный сульфат-ион при остальных неизменных хроматографических условиях, как и ожидалось, не приводит к значимому закономерному увеличению удерживания катионогенных веществ (рис. 4). Это подтверждает роль перхлорат-иона в увеличении удерживания протонированных органических оснований, скорее всего, именно как слабогидрофобного ион-парного агента. Возможные механизмы взаимодействия анионных модификаторов ПФ с катионогенными веществами-аналитами в условиях ОФ ВЭЖХ в рамках данной работы нами не рассматриваются; подробное их обсуждение можно найти в работах [18, 19, 21, 22].

Исследование возможностей использования перхлората лития при градиентной ВЭЖХ аминов проводили в условиях линейного градиента концентрации ацетонитрила в ПФ, варьируя содержание перхлората в элюенте "А". На рис. 5 и 6 приведены примеры хроматограмм смесей исследуемых веществ в отсутствие перхлората и при его концентрации в элюенте "А" 0.2 М.

Как и при изократической ВЭЖХ, в градиентном режиме элюирования в присутствии перхлората лития наблюдаются увеличение удерживания, улучшение формы и уменьшение ширины пиков протонированных "относительно гидрофильных" веществ с аминогруппами. Стабилизация этих характеристик достигается при концентрации  $LiClO_4$  в элюенте "А"  $\geq 0.2$  М. На хроматографические параметры "гидрофобных" аминов и нейтральных компонентов смеси присутствие перхлората в составе ПФ практически не влияет.

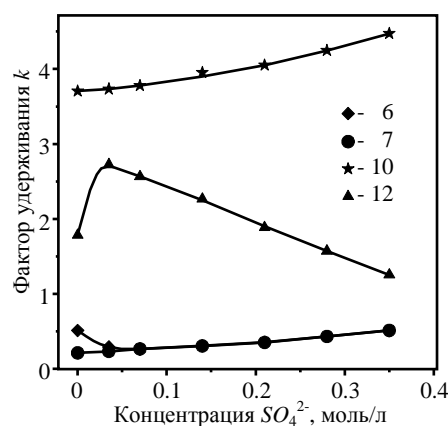


Рис. 4. Удерживание веществ в присутствии сульфат-иона в ПФ. Номера веществ даны в соответствии с рис. 1; хроматографические условия – в подписи к рис. 2.

Здесь нужно заметить, что обычно при работе в градиентном режиме с элюентами сложного состава добавки-модификаторы вводятся в оба элюента "А" и "Б" для поддержания их постоянных концентраций в ходе анализа [10, 12, 13]. Градиентные элюирующие системы типа: элюент "А" – [вода + буфер + ион-парный модификатор]; элюент "Б" – [органический растворитель] используют редко [11, 15].

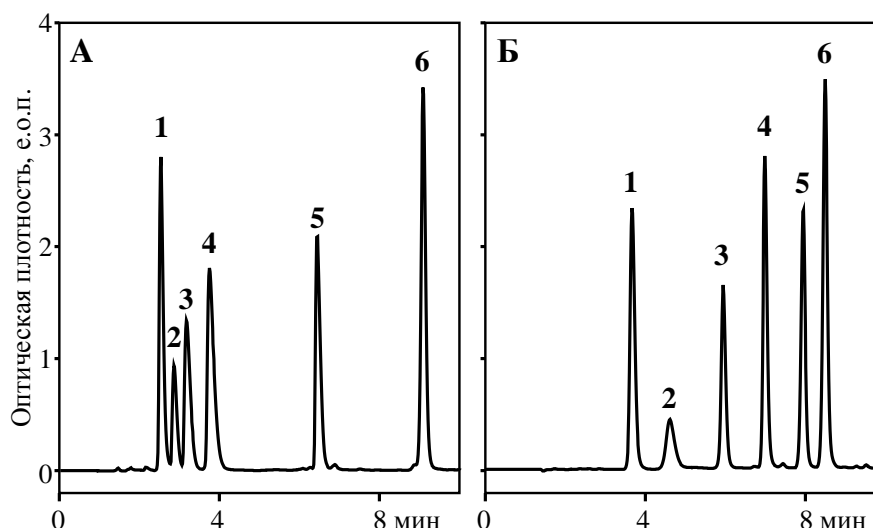


Рис. 5. Хроматограммы смеси веществ при градиентном режиме элюирования. Подвижная фаза: элюент "А"  $0.005 M HClO_4$  в воде, элюент "Б" ацетонитрил; градиент от 5 до 100% "Б" за 40 мин. Рис. 5А – без добавки  $LiClO_4$ , рис. 5Б – с добавкой  $0.2M LiClO_4$  в элюент "А". Номера веществ даны в соответствии с рис. 1; остальные условия – в подписи к рис. 2

В изократической ОФ ВЭЖХ, как было ранее показано авторами работы [18] и подтверждено нашими исследованиями, чем больше концентрация ацетонитрила в ПФ, тем меньшая концентрация перхлорат-ионов требуется для обеспечения при этом максимального и стабильного удерживания протонированных оснований. Это позволило предположить, что при введении добавки  $LiClO_4$  исключительно в элюент "А" и использовании в качестве растворителя "Б" чистого ацетонитрила монотонное возрастание доли органического растворителя при формировании линейного градиента может компенсировать формирующийся обратный градиент

концентрации перхлората и обеспечить соответствующее повышение и хорошую воспроизводимость времен удерживания аминсоединений в широком диапазоне их гидрофобности. На рис. 7 показаны хроматограммы, полученные в линейных градиентах (от 5 до 100% ацетонитрила за 40 мин), с введением перхлората лития только в элюент "А" (рис. 7А) и в оба элюента (рис. 7Б).

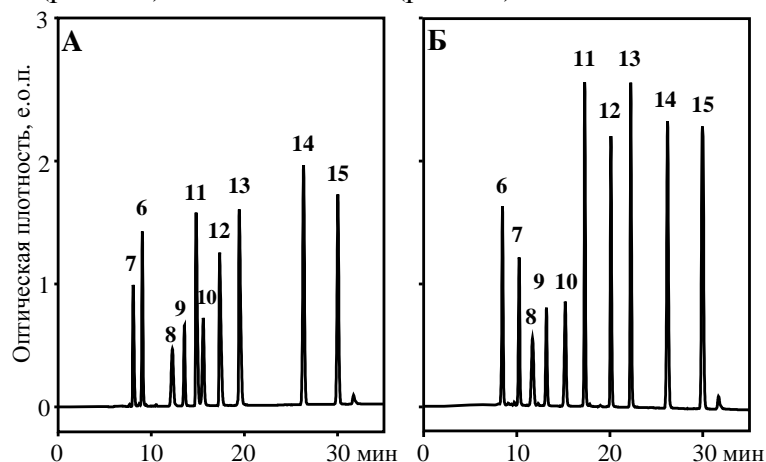


Рис. 6. Хроматограммы смеси веществ в градиентном режиме элюирования. Подвижная фаза: элюент "А" 0.005 М  $HClO_4$  в воде, элюент "Б" ацетонитрил; градиент от 5 до 100% "Б" за 40 мин. Рис. 6А – без добавки  $LiClO_4$ , рис. 6Б – с добавкой 0.2М  $LiClO_4$  в элюент "А". Номера веществ даны в соответствии с рис. 1; остальные условия – в подписи к рис. 2.

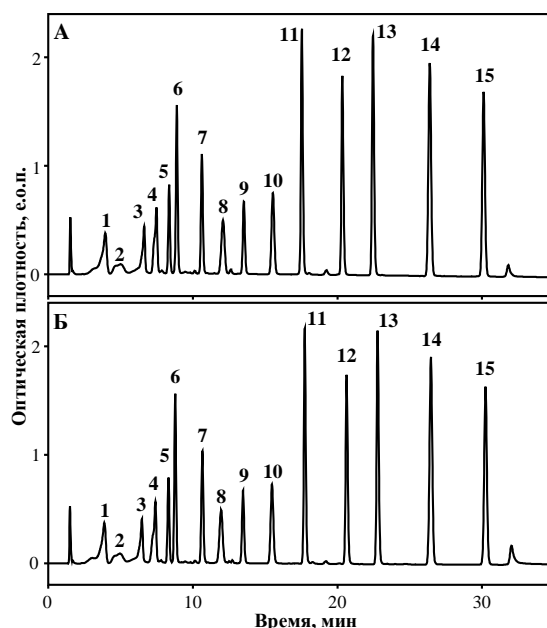


Рис. 7. Хроматограммы смеси 15 веществ в градиентном режиме элюирования. Подвижная фаза: элюент "А" 0.005 М  $HClO_4$  в воде; элюент "Б" – ацетонитрил; градиент от 5 до 100% "Б" за 40 мин. Рис. 7А – с добавкой 0.2М  $LiClO_4$  в элюент "А"; рис. 7Б – с добавкой 0.2М  $LiClO_4$  в оба элюента. Номера веществ даны в соответствии с рис. 1; остальные условия – в подписи к рис. 2.

Несмотря на то, что в первом случае (рис. 7А) концентрации кислоты и соли в подвижной фазе в ходе анализа монотонно уменьшались, значимых различий между этими хроматограммами не наблюдается. Это связано, очевидно, с уменьшением



степени диссоциации перхлората лития с ростом концентрации ацетонитрила. Наши эксперименты показали, что для стабильного улучшения хроматографических параметров протонированных аминосоединений в градиентной ОФ ВЭЖХ необходимо и достаточно ввести  $LiClO_4$  в элюент "А" в концентрации  $\geq 0.2$  М, а в качестве элюента "Б" использовать чистый ацетонитрил, что весьма удобно на практике.

### Заключение

Таким образом, исследованная нами бинарная элюирующая система для обращенно-фазовой ВЭЖХ (элюент "А": [0.005 М  $HClO_4$  и 0.2 М  $LiClO_4$  в воде]; элюент "Б": [ацетонитрил]) может рассматриваться в качестве "универсальной". Она пригодна для хроматографии как катионов аминосоединений, так и незаряженных органических веществ, в том числе при их совместном присутствии в анализируемой пробе. Такой подход экономит время, расходные материалы и позволяет существенно упростить решение широкого круга аналитических задач.

### Список литературы

1. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc. 2010. 912 p.
2. Miller J.M. Chromatography. Concepts and contrasts. Wiley-Interscience. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. 2005. 520 p.
3. Schoenmakers P.J. Optimization of chromatographic selectivity. A guide to method development. Elsevier. 1986. 345 p.
4. Cecchi T. Ion-pair chromatography and related techniques. CRC Press. Taylor & Francis Group. 2010. 215 p.
5. Chen Y., Mehok A.R., Mant C.T., Hodges R.S. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1043. P. 9-18.
6. Juergens U. Alkylamine/phosphoric acid as a universal buffer system for basic and acidic mobile phases in HPLC // J. of liquid chromatography. 1988. V. 11(9&10). P. 1925-1940.
7. Schumacher J.C. Perchlorates; their properties, manufacture and uses. Reinhold. New York. 1960. P. 43.
8. Nevado J.J.B., Peñalvo G.C., Bernardo F.J.G. Simultaneous determination of suifaquinoxaline, sulfamethazine and pyrimethamine by liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2000. V. 870. P. 169-177.
9. Дубовик Д.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н., Тихомирова Т.И. Влияние сильного электролита в элюенте на удерживание гетерополиоксидов фосфора и кремния в ион-парной ВЭЖХ // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. Т. 43. № 5. С. 300-303.
10. Meek J.L. Prediction of peptide retention times in high-pressure liquid chromatography on the basis of amino acid composition // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 1632-1636.
11. Certa U., Ehrenstein G. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of histones // Anal. Biochem. 1981. V. 118. P. 147-154.
12. Štulík K., Pacáková V., Suchánková J., Claessens H.A. Stationary phases for peptide analysis by high performance liquid chromatography: a review // Anal. Chim. Acta. 1997. V. 352. P. 1-19.

13. Mant C.T., Hodges R.S. Reversed-phase liquid chromatography as a tool in the determination of the hydrophilicity/hydrophobicity of amino acid side-chains at a ligand-receptor interface in the presence of different aqueous environments. I. Effect of varying receptor hydrophobicity // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 972. P. 45-60.

14. Лобачев А.Л., Колотвин А.А. Идентификация и количественное определение приоритетных неионогенных и амфотерных поверхностно-активных веществ в сырье и композициях моющих средств методами ВЭЖХ, тонкослойной хроматографии и УФ-спектрометрии // *Ж. аналит. химии*. 2006. Т. 61. №7. С. 678-685.

15. Molnár I., Horváth C. Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phases by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr.* 1977. V. 142. P. 623-640.

16. Kanfer I., Skinner M.F., Walker R.B. Analysis of macrolide antibiotics // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 812. P. 255-286.

17. LoBrutto R., Jones A., Kazakevich Y.V., McNair H.M. Effect of the eluent pH and acidic modifiers in high-performance liquid chromatography retention of basic analytes // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 913. P. 173-187.

18. LoBrutto R., Jones A., Kazakevich Y.V. Effect of counter-anion on retention in high-performance liquid chromatography of protonated basic analytes // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 913. P. 189-196.

19. Jones A., LoBrutto R., Kazakevich Y.V. Effect of the counter-anion type and concentration on the liquid chromatography retention of  $\beta$ -blockers // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 964. P. 179-187.

20. Kazakevich Y., LoBrutto R. HPLC for pharmaceutical scientists. A John Wiley & Sons, Inc. 2007. 1104 p.

21. Dai J., Carr W. Role of ion pairing in anionic additive effects on the separation of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1072. P. 169-184.

22. Dai J., Mendonsa S.D., Bowser M.T., Lucy C.A., Carr P.W. Effect of anionic additive type on ion pair formation constants of basic pharmaceuticals // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1069. P. 225-234.

---

**Азарова Ирина Николаевна** – к.х.н., химик-эксперт ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", Новосибирск, (383) 207 84 71

**Барам Григорий Иосифович** – д.х.н., заместитель генерального директора по науке ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", Новосибирск

**Azarova Irina N.** – PhD, Chemist expert, EcoNova, Ltd., Institute of Chromatography, Novosibirsk, Russia, [izarova@mail.ru](mailto:izarova@mail.ru)

**Baram Grigory I.** – Dr. Sci. (Chem.), Deputy Director General on Science, EcoNova, Ltd., Institute of Chromatography, Novosibirsk, Russia