

Методы фармакопейного анализа

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

ОФС.1.2.1.2.0005.15

ВЭЖХ

Метод колоночной хроматографии, в котором подвижной фазой служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой.

Способ разделения, препаративного выделения и проведения качественного и количественного анализа нелетучих термолабильных соединений как с малой, так и с большой молекулярной массой.

ВЭЖХ

В зависимости от механизма разделения

Адсорбционная

Разделение происходит за счет различной способности веществ адсорбироваться и десорбироваться с поверхности сорбента

Распределительная

Разделение происходит за счет различия коэффициентов распределения между неподвижной и подвижной фазами

Ионообменная

Разделение происходит за счет различной силы взаимодействия определяемых ионов с ионными группами сорбента

Эксклюзионная

Разделение происходит за счет различной способности молекул веществ проникать в поры неподвижной фазы (разделение по размеру)

Хиральная

Разделение оптически активных соединений на отдельные энантиомеры

ВЭЖХ

В зависимости от типа подвижной и неподвижной фазы

Нормально-фазовая

Неподвижная фаза – полярная (силикагель или силикагель с привитыми NH_2 - и CN - группами), подвижная фаза – неполярная (гексан, гексан+хлороформ, гексан+спирты и др.)

Удерживание веществ растет с увеличением их полярности.

Элюирующая способность подвижной фазы увеличивается с увеличением полярности.

Обращенно-фазовая

Неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C_4 , C_8 , C_{18} и др.), подвижная фаза – полярная (вода+полярные растворители: ацетонитрил, метанол, тетрагидрофуран и др.).

Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности).

Элюирующая способность подвижной фазы увеличивается с увеличением содержания органического растворителя.

Оборудование



- Узел подготовки подвижной фазы (емкости с подвижной фазой и система дегазации);
- Насосная система;
- Смеситель подвижной фазы;
- Система ввода пробы (инжектор);
- Хроматографическая колонка;
- Термостат;
- Детектор;
- Система управления хроматографом, сбора и обработки данных

Режимы хроматографирования

- ❑ Изократический режим – на протяжении всего хроматографического процесса состав подвижной фазы и параметры хроматографирования остаются постоянными
- ❑ Градиентный режим – состав подвижной фазы и параметры хроматографирования меняются в ходе анализа

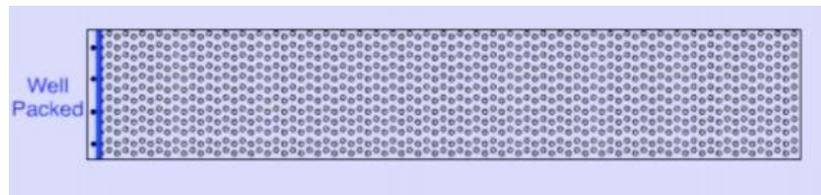
Хроматографическая колонка



Трубка из нержавеющей стали, стекла или пластика, заполненная сорбентом и закрытая с обеих сторон фильтрами.

Длина – 5-60 см

Внутренний диаметр – 2-10 мм



Неподвижная фаза

- силикагель, оксид алюминия (нормально-фазовая хроматография, механизм - адсорбция);
- силикагель, смолы, полимеры с привитыми кислотными и основными группами (ионообменная и ионная хроматография);
- силикагель или полимеры с заданным распределением размеров пор (эксклюзионная хроматография);
- химически модифицированные сорбенты (механизм – адсорбция или распределение между подвижной и неподвижной фазами);
- химически модифицированные хиральные сорбенты (хиральная хроматография)

Детекторы

- **Спектрофотометрические** (оптическая плотность элюата измеряется в специальной микрокювете при выбранной длине волны);
- **Флуориметрические** (для определения флуоресцирующих соединений, принцип действия основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света);
- **Рефрактометрические** (для соединений, слабопоглощающих в УФ и видимой областях спектра, низкая чувствительность, невозможность использовать в градиентном режиме);
- **Испарительные детекторы лазерного светового рассеяния** (принцип работы основан на различии давления паров растворителей, входящих в состав подвижной фазы и анализируемых веществ)

Детекторы

- **Амперометрические** (для определения электроактивных соединений, которые могут быть окислены или восстановлены на поверхности твердого электрода);
- **Кондуктометрические** (для детектирования анионов и катионов в ионной хроматографии, принцип работы основан на измерении электропроводности подвижной фазы в процессе элюирования);
- **Масс-спектрометрические** (высокая чувствительность).

Условия хроматографирования, подлежащие указанию в нормативной документации

- размеры колонки (длина и внутренний диаметр);
- типы сорбента (с указанием размера частиц);
- температура колонки;
- объем вводимой пробы;
- состав подвижной фазы и способ ее приготовления;
- скорость подачи подвижной фазы;
- тип и условия детектирования;
- описание градиентного режима;
- время хроматографирования;
- подробное описание методики;
- формулы расчета;
- описание приготовления стандартных и испытуемых растворов.

Модифицированные виды ВЭЖХ

1. Ион-парная хроматография.

Разновидность обращенно-фазовой хроматографии, позволяет определить ионизированные соединения.

В составе подвижной фазы имеются гидрофобные органические соединения с ионогенными группами (ион парные реагенты)

2. Хроматография гидрофильного взаимодействия.

Используется для разделения полярных соединений, слабо удерживаемых в обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Подвижная фаза – водно-ацетонитрильные смеси с добавлением солей, кислот или оснований.

Неподвижная фаза – силикагели, модифицированные полярными группами

Модифицированные виды ВЭЖХ

3. Ионообменная и ионная ВЭЖХ

Разделение основано на обратимом взаимодействии ионов определяемого вещества с ионогенными группами сорбента (катиониты и аниониты).

Подвижная фаза – водные растворы кислот, оснований и солей.

Ионная хроматография – вариант ионообменной хроматографии, в котором используется кондуктометрический детектор.

4. Эксклюзионная ВЭЖХ

Гель-хроматография, разделение молекул по их размерам.

5. Ионо-эксклюзионная хроматография.

Соединения в ионизированной форме не удерживаются на сорбенте-ионообменнике, соединения в молекулярной форме удерживаются внутри пор ионообменного сорбента.

Модифицированные виды ВЭЖХ

6. Хиральная хроматография

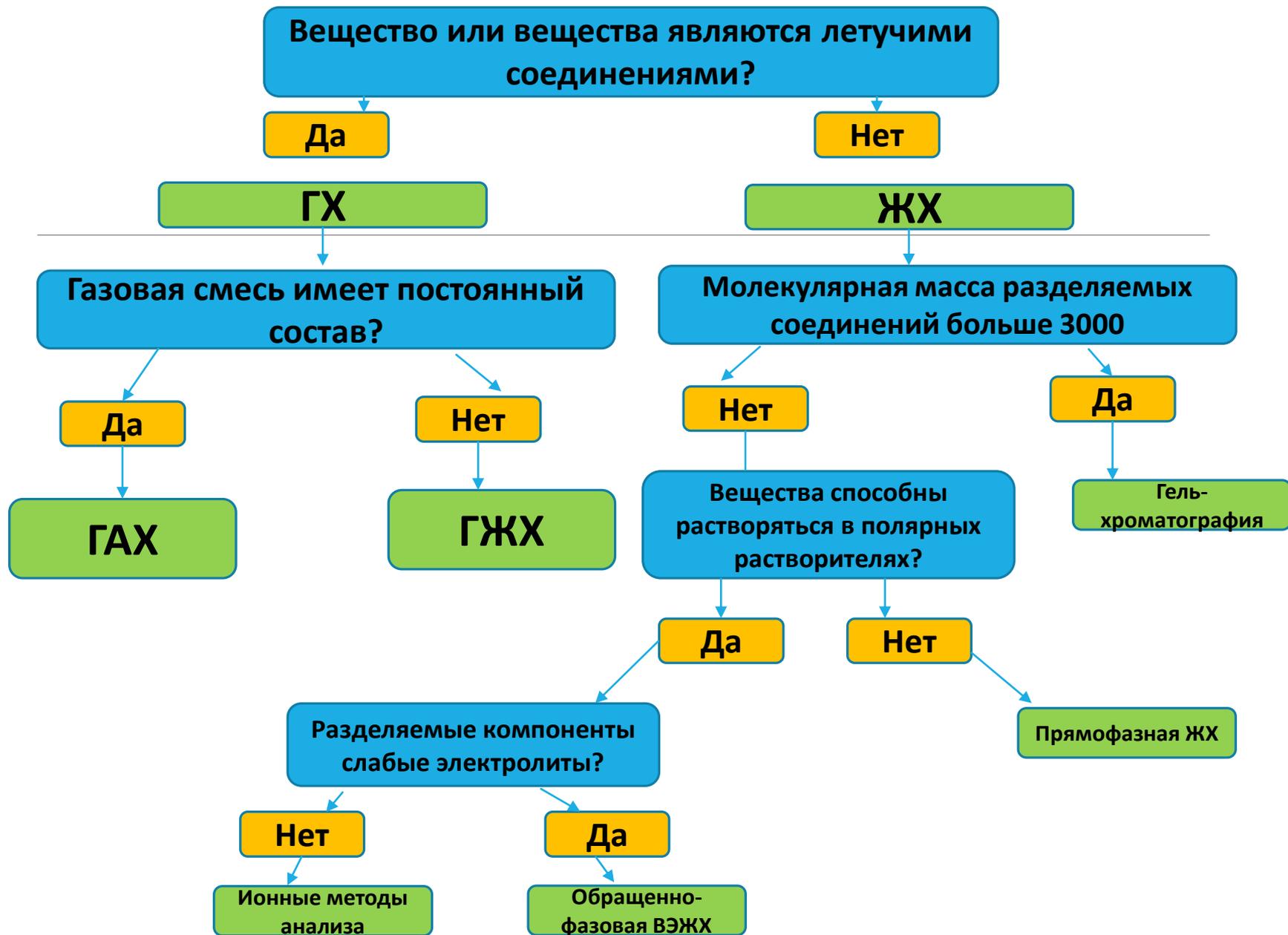
Разделение оптических изомеров. Неподвижная фаза – сорбенты с поверхностью, модифицированной веществами, имеющими хиральные центры (хитозаны, циклодекстрины, полисахариды)

7. Ультраэффективная жидкостная хроматография.

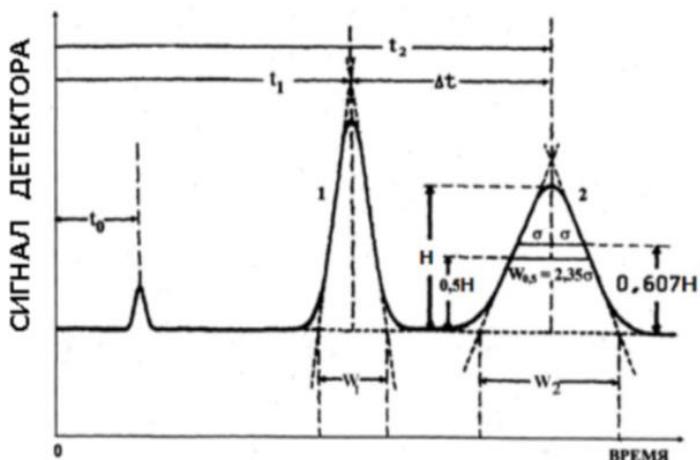
Размер частиц сорбента – 1,5 – 2 мкм, размер колонки - 50-150 мм длина, 1-4 мм внутренний диаметр

Применение ВЭЖХ

- Подлинность
- Посторонние примеси
- Растворение
- Однородность дозирования
- Количественное определение



Параметры удерживания в колоночной хроматографии



- Время удерживания вещества (t , мин, с) – время пребывания вещества в хроматографе.
- Время удерживания несорбируемого вещества – время пребывания несорбируемого вещества в хроматографе.
- Удерживаемый объем или объем удерживания компонента – объем элюента или газа-носителя, который проходит через хроматографическую колонку от момента ввода пробы до момента выхода максимальной концентрации компонента.
- Объем удерживания несорбируемого компонента – объем подвижной фазы, необходимый для элюирования несорбируемого компонента.

Относительные параметры удерживания

- **относительное время удерживания** – отношение времени удерживания определяемого компонента ко времени удерживания вещества, принятого за стандарт:

$$t'_r = \frac{t}{t_s}$$

- **относительный объем удерживания** – отношение объема удерживания определяемого компонента к объему удерживания вещества, принятого за стандарт:

$$V'_r = \frac{V}{V_s}$$

Относительные величины удерживания не зависят от количества сорбента в колонке, от ее объема, занятого подвижной фазой, перепада давления, от скорости подачи подвижной фазы и др. Они зависят от природы анализируемого вещества, от природы вещества-стандарта, сорбента и температуры колонки

Относительные параметры удерживания

При установлении относительных параметров удерживания в качестве стандартных могут быть использованы различные вещества. Как правило, это соединения, относящиеся к этому же классу соединений, что и определяемое вещество, с известными значениями параметров удерживания.

Целесообразным является определение параметров удерживания относительно 2 стандартных веществ. Первый стандарт должен иметь меньшее, а второй – большее значение времени удерживания, чем анализируемое вещество.