

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Высокоэффективная
жидкостная
хроматография**

ОФС.1.2.1.2.0005.15

Взамен ст. ГФ XI

Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостная хроматография высокого давления) – это метод колоночной хроматографии, в котором подвижной фазой служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой (сорбентом). Колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии характеризуются высоким гидравлическим сопротивлением на входе.

В зависимости от механизма разделения веществ различают следующие варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии: адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, хиральную и др. в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий. В адсорбционной хроматографии разделение веществ происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться с поверхности сорбента с развитой поверхностью, например, силикагеля. В распределительной высокоэффективной жидкостной хроматографии разделение происходит за счет различия коэффициентов распределения разделяемых веществ между неподвижной (как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя) и подвижной фазами.

В зависимости от типа подвижной и неподвижной фазы различают нормально-фазовую и обращенно-фазовую хроматографию. В нормально-

фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии неподвижная фаза – полярная (чаще всего силикагель или силикагель с привитыми NH_2 - или CN -группами и др.), а подвижная фаза – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.). Удерживание веществ растёт с увеличением их полярности. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность подвижной фазы увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C_4 , C_8 , C_{18} и др.); подвижная фаза – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растёт с увеличением их гидрофобности (неполярности). Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.

В ионообменной хроматографии молекулы веществ смеси, диссоциированные в растворе на катионы и анионы, разделяются при движении через сорбент (катионит или анионит) за счет различной силы взаимодействия определяемых ионов с ионными группами сорбента.

В эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной) хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми из колонки выходят наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор неподвижной фазы, а последними выходят вещества с малыми размерами молекул.

В хиральной хроматографии происходит разделение оптически активных соединений на отдельные энантиомеры. Разделение может осуществляться на хиральных неподвижных фазах или на ахиральных неподвижных фазах с использованием хиральных подвижных фаз.

Существуют и другие варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Часто разделение протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно, в зависимости от типа подвижной и неподвижной фаз, а также природы определяемого соединения.

Область применения

Высокоэффективная жидкостная хроматография успешно применяется как для качественного, так и для количественного анализа лекарственных средств в испытаниях «Подлинность», «Посторонние примеси», «Растворение», «Однородность дозирования», «Количественное определение». Следует отметить, что хроматография позволяет совмещать в одной пробе несколько испытаний, в том числе «Подлинность» и «Количественное определение».

Оборудование

Для проведения анализа используют соответствующие приборы – жидкостные хроматографы.

В состав жидкостного хроматографа обычно входят следующие основные узлы:

- узел подготовки подвижной фазы, включая емкость с подвижной фазой (или емкости с отдельными растворителями, входящими в состав подвижной фазы) и систему дегазации подвижной фазы;
- насосная система;
- смеситель подвижной фазы (при необходимости);
- система ввода пробы (инжектор), может быть ручным или автоматическим (автосамплер);
- хроматографическая колонка (может быть установлена в термостате);
- детектор (один или несколько с разными способами детектирования);
- система управления хроматографом, сбора и обработки данных.

Помимо этого в состав хроматографа могут входить: система пробоподготовки и предколоночный реактор, система переключения

колонок, постколоночный реактор и другое оборудование.

Насосная система

Насосы обеспечивают подачу подвижной фазы в колонку с заданной скоростью. Состав подвижной фазы и скорость потока могут быть постоянными или меняющимся во время анализа. В случае постоянного состава подвижной фазы процесс называют изократическим, а во втором – градиентным. Современная насосная система жидкостного хроматографа состоит из одного или нескольких насосов, управляемых компьютером. Это позволяет менять состав подвижной фазы по определенной программе при градиентном элюировании. Насосы для аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяют поддерживать скорость подачи подвижной фазы в колонку в интервале от 0,1 до 10 мл/мин при давлении на входе в колонку до 40 МПа. Пульсации давления минимизируются специальными демпферными системами, входящими в конструкцию насосов. Рабочие детали насосов изготавливаются из коррозионностойких материалов, что позволяет использовать в составе подвижной фазы агрессивные компоненты.

Смесители

В смесителе происходит образование единой подвижной фазы из отдельных растворителей, подаваемых насосами, если необходимая смесь не была приготовлена заранее. Смешение компонентов подвижной фазы в смесителе может происходить как при низком давлении (до насосов), так и при высоком давлении (после насосов). Смеситель можно использовать для подготовки подвижной фазы и при изократическом элюировании.

Объем смесителя может влиять на время удерживания компонентов при градиентном элюировании.

Инжекторы

Инжекторы могут быть универсальными, с возможностью изменения объема вводимой пробы, или дискретными для ввода пробы только определенного объема. Оба типа инжекторов могут быть автоматическими

(«автоинжекторы» или «автосэмплеры»). Инжектор для ввода пробы (раствора) расположен непосредственно перед хроматографической колонкой. Конструкция инжектора позволяет изменять направление потока подвижной фазы и осуществлять предварительное введение пробы в петлю-дозатор определенного объема (обычно от 10 до 100 мкл) или в специальное дозирующее устройство переменного объема. Объем петли указан на ее маркировке. Конструкция дискретного инжектора, как правило, позволяет осуществлять замену петли. Современные автоматические инжекторы могут обладать рядом дополнительных функций, например, выполнять функцию станции пробоподготовки: осуществлять смешение и разбавление образцов, проводить реакцию предколоночной дериватизации.

Хроматографическая колонка

Хроматографические колонки обычно представляют собой трубки из нержавеющей стали, стекла или пластика, заполненные сорбентом и закрытые с обеих сторон фильтрами с диаметром пор 2–5 мкм. Длина аналитической колонки может находиться в диапазоне от 5 до 60 см и более, внутренний диаметр – от 2 до 10 мм. Колонки с внутренним диаметром менее 2 мм используются в микроколоночной хроматографии. Существуют также капиллярные колонки с внутренним диаметром около 0,3–0,7 мм. Колонки для препаративной хроматографии могут иметь внутренний диаметр 50 мм и более.

Перед аналитической колонкой могут устанавливаться короткие колонки (предколонки), выполняющие различные вспомогательные функции, основная из которых - защита аналитической колонки. Обычно анализ проводят при комнатной температуре, однако для увеличения эффективности разделения и сокращения продолжительности анализа может быть использовано термостатирование колонок при температурах до 80 - 100 °С. Возможность использования повышенной температуры при разделении ограничивается стабильностью неподвижной фазы, поскольку при повышенных температурах возможна ее деструкция.

Неподвижная фаза (сорбент)

В качестве сорбентов обычно применяются:

- силикагель, оксид алюминия, используются в нормально-фазовой хроматографии. Механизм удерживания в данном случае – обычно адсорбция;
- силикагель, смолы или полимеры с привитыми кислотными или основными группами. Область применения – ионообменная и ионная хроматография;
- силикагель или полимеры с заданным распределением размеров пор (эксклюзионная хроматография);
- химически модифицированные сорбенты (сорбенты с привитыми фазами), приготовленные чаще всего на основе силикагеля. Механизм удерживания - адсорбция или распределение между подвижной и неподвижной фазами. Область применения зависит от типа привитых функциональных групп. Некоторые типы сорбентов могут использоваться как в обращенной, так и в нормально фазовой хроматографии;
- химически модифицированные хиральные сорбенты, например, производные целлюлозы и амилозы, протеины и пептиды, циклодекстрины, хитозаны, используемые для разделения энантиомеров (хиральная хроматография).

Сорбенты с привитыми фазами могут иметь различную степень химической модификации. В качестве привитых фаз наиболее часто применяются:

- октадецильные группы $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3]$ (сорбент октадецилсилан (ODS) или C_{18});
- октильные группы $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3]$ (сорбент октилсилан или C_8);
- фенильные группы $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}_6\text{H}_5)]$ (сорбент фенилсилан);
- цианопропильные группы $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}]$ (сорбент CN);
- аминопропильные группы $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2]$ (сорбент NH_2);
- диольные группы $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{OCH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}]$ (сорбент диол).

Наиболее часто анализ выполняют на неполярных привитых фазах в обращенно-фазовом режиме с применением сорбента C_{18} .

Сорбенты с привитыми фазами, полученные на основе силикагеля, химически устойчивы при значениях рН от 2,0 до 7,0, если другое специально не оговаривается производителем. Частицы сорбента могут иметь сферическую или неправильную форму и разнообразную пористость. Размер частиц сорбента в аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии обычно составляет 3–10 мкм, в препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии – 50 мкм и более. Существуют также монолитные колонки, в которых сорбент представляет собой монолит со сквозными порами, заполняющий весь объем колонки.

Высокая эффективность разделения обеспечивается высокой площадью поверхности частиц сорбента (которая является следствием их микроскопических размеров и наличия пор), а также равномерностью состава сорбента и плотной и равномерной его упаковкой.

Детекторы

В высокоэффективной жидкостной хроматографии используются различные способы детектирования. В общем случае подвижная фаза с растворенными в ней компонентами после хроматографической колонки попадает в ячейку детектора, где непрерывно измеряется то или иное ее свойство (поглощение в ультрафиолетовой или видимой области спектра, флуоресценция, показатель преломления, электропроводность и др.). Полученная при этом хроматограмма представляет собой график зависимости некоторого физического или физико-химического параметра подвижной фазы от времени.

Наиболее распространенными детекторами в высокоэффективной жидкостной хроматографии являются **спектрофотометрические**. В процессе элюирования веществ в специально сконструированной микрокювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны. Широкая область линейности детектора позволяет анализировать как

примеси, так и основные компоненты смеси на одной хроматограмме. Спектрофотометрический детектор позволяет проводить детектирование при любой длине волны в его рабочем диапазоне (как правило, 190-600 нм). Применяются также мультиволновые детекторы, позволяющие проводить детектирование при нескольких длинах волн одновременно и детекторы на диодной матрице, позволяющие регистрировать оптическую плотность одновременно во всем рабочем диапазоне длин волн (как правило, 190-950 нм). Это позволяет регистрировать спектры поглощения проходящих через ячейку детектора компонентов.

Флуориметрический детектор применяется для определения флуоресцирующих соединений или не флуоресцирующих соединений в виде их флуоресцирующих производных. Принцип действия **флуориметрического** детектора основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света. Поглощение обычно проводят в ультрафиолетовой области спектра, длины волн флуоресцентного излучения превышают длины волн поглощенного света. Флуориметрические детекторы обладают очень высокой чувствительностью и селективностью. Чувствительность флуоресцентных детекторов примерно в 1000 раз выше чувствительности спектрофотометрических. Современные флуоресцентные детекторы позволяют не только получать хроматограммы, но и регистрировать спектры возбуждения и флуоресценции анализируемых соединений.

Для определения соединений, слабо поглощающих в ультрафиолетовой и видимой областях спектра (например углеводов), используют **рефрактометрические** детекторы (рефрактометры). Недостатки этих детекторов – их низкая (по сравнению со спектрофотометрическими детекторами) чувствительность и значительная температурная зависимость интенсивности сигнала (детектор необходимо термостатировать), а также невозможность их использование в режиме градиентного элюирования.

Принцип работы **испарительных детекторов лазерного светового рассеяния** основан на различии давлений паров хроматографических растворителей, входящих в состав подвижной фазы, и анализируемых веществ. Подвижная фаза на выходе из колонки вводится в распылитель, смешивается с азотом или CO_2 и в виде мелкодисперсного аэрозоля попадает в обогреваемую испарительную трубку с температурой 30 – 160 °С, в которой подвижная фаза испаряется. Аэрозоль из нелетучих частиц анализируемых веществ рассеивает световой поток в камере рассеивания. По степени рассеивания светового потока можно судить о количестве определяемого соединения. Детектор более чувствителен, чем рефрактометрический, его сигнал не зависит от оптических свойств пробы, от типа функциональных групп в определяемых веществах, от состава подвижной фазы и может быть использован в режиме градиентного элюирования.

Электрохимические детекторы (кондуктометрические, амперометрические, кулонометрические и др.). **Амперометрический** детектор применяют для определения электроактивных соединений, которые могут быть окислены или восстановлены на поверхности твердого электрода. Аналитическим сигналом является величина тока окисления или восстановления. В ячейке детектора имеется по крайней мере два электрода – рабочий и электрод сравнения (хлоридсеребряный или стальной). К электродам прикладывается рабочий потенциал, величина которого зависит от природы определяемых соединений. Измерения могут проводиться как при постоянном потенциале, так и в импульсном режиме, когда задается профиль изменения потенциала рабочего электрода в течении одного цикла регистрации сигнала. В амперометрическом детекторе используют рабочие электроды из углеродных материалов (наиболее часто стеклоуглеродный или графитовый), и металлические: платиновый, золотой, медный, никелевый.

Кондуктометрический детектор используют для детектирования анионов и катионов в ионной хроматографии. Принцип его работы основан

на измерении электропроводности подвижной фазы в процессе элюирования вещества.

Исключительно информативным является **масс-спектрометрический** детектор, который обладает высокой чувствительностью и селективностью. Последние модели масс-спектрометров для жидкостной хроматографии работают в диапазоне масс m/z от 20 до 4000 а.е.м.

В высокоэффективной жидкостной хроматографии используются также, Фурье-ИК-детекторы, радиоактивности и некоторые другие.

Система сбора и обработки данных

Современная система обработки данных представляет собой сопряженный с хроматографом персональный компьютер с установленным программным обеспечением, позволяющим регистрировать и обрабатывать хроматограмму, а также управлять работой хроматографа и следить за основными параметрами хроматографической системы.

Подвижная фаза

Подвижная фаза в высокоэффективной жидкостной хроматографии выполняет двоякую функцию: обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке и регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. Таким образом, изменяя состав подвижной фазы в высокоэффективной жидкостной хроматографии можно влиять на времена удерживания соединений, селективность и эффективность их разделения.

Подвижная фаза может состоять из одного растворителя, часто из двух, при необходимости – из трех и более. Состав подвижной фазы указывают как объемное соотношение входящих в нее растворителей. В отдельных случаях может указываться массовое соотношение, что должно быть специально оговорено. В качестве компонентов подвижной фазы могут быть использованы буферные растворы с определенным значением pH, различные соли, кислоты и основания и другие модификаторы.

В нормально-фазовой хроматографии обычно применяются жидкие углеводороды (гексан, циклогексан, гептан) и другие относительно неполярные растворители с небольшими добавками полярных органических соединений, которые регулируют элюирующую силу подвижной фазы.

В обращено-фазовой хроматографии в качестве подвижной фазы используется вода или водно-органические смеси. Органическими добавками обычно служат полярные органические растворители (ацетонитрил и метанол). Для оптимизации разделения могут использоваться водные растворы с определенным значением pH, в частности буферные раствор, а также различные добавки в подвижную фазу: фосфорная и уксусная кислоты при разделении соединений кислотного характера; аммиак и алифатические амины при разделении соединений основного характера, и другие модификаторы.

На хроматографический анализ большое влияние оказывает степень чистоты подвижной фазы, поэтому предпочтительно применять растворители, выпущенные специально для жидкостной хроматографии (включая воду).

При использовании УФ-спектрофотометрического детектора подвижная фаза не должна иметь выраженного поглощения при выбранной для детектирования длине волны. Предел прозрачности или оптическая плотность при определенной длине волны растворителя конкретного изготовителя часто указывается на упаковке.

Подвижная фаза и анализируемые растворы не должны содержать нерастворившиеся частиц и пузырьки газа. Воду, полученную в лабораторных условиях, водные растворы, предварительно смешанные с водой органические растворители, а также анализируемые растворы необходимо подвергать тонкой фильтрации и дегазации. Для этих целей обычно применяют фильтрование под вакуумом через инертный по отношению к данному растворителю или раствору мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм

Перечень условий хроматографирования, подлежащих указанию

В фармакопейной статье должны быть приведены: полное коммерческое наименование колонки с указанием производителя и каталожного номера, размеры колонки (длина и внутренний диаметр), типа сорбента с указанием размера частиц, размера пор, температура колонки (если необходимо термостатирование), объем вводимой пробы (объем петли), состав подвижной фазы и способ ее приготовления, скорость подачи подвижной фазы, тип детектора и условия детектирования (при необходимости параметры используемой ячейки детектора), описание градиентного режима (если используется), включающее в себя стадию переуравновешивания к исходным условиям, время хроматографирования, подробное описание методики и формулы расчета, описания приготовления стандартных и испытуемых растворов.

В случае использования предколоночной дериватизации в автосамплере приводится информация о программе работы автосамплера. В случае использования постколоночной дериватизации указывается скорость подачи дериватизирующего реагента, объем петли смешения и ее температура.

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВИДЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ион-парная хроматография

Одной из разновидностей обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии является ион парная хроматография – позволяющая определять ионизированные соединения. Для этого в состав традиционной обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии подвижной фазы добавляют гидрофобные органические соединения с ионогенными группами (ион парные реагенты). Для разделения оснований обычно используют алкилсульфаты натрия, для разделения кислот применяют соли тетраалкиламмония (тетрабутиламмония фосфат, цетилтриметиламмония бромид и др.). В ион-парном режиме селективность

разделения неионогенных компонентов будет лимитироваться обращено-фазовым механизмом удерживания, а удерживание оснований и кислот заметно возрастает, при этом улучшается форма хроматографических пиков.

Удерживание в ион-парном режиме обусловлено достаточно сложными равновесными процессами, конкурирующими между собой. С одной стороны, за счет гидрофобных взаимодействий и эффекта вытеснения полярной среды подвижной фазы возможна сорбция гидрофобных ионов на поверхности алкилсиликагеля таким образом, что заряженные группы обращены к подвижной фазе. В этом случае поверхность приобретает ионообменные свойства, и удерживание подчиняется закономерностям ионообменной хроматографии. С другой стороны, возможно образование ионной пары непосредственно в объеме элюента, с последующей ее сорбцией на сорбенте по обращено-фазовому механизму.

Хроматография гидрофильного взаимодействия (HILIC хроматография)

Хроматография гидрофильного взаимодействия используется для разделения полярных соединений, слабо удерживаемых в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве подвижной фазы в этом варианте хроматографии используются водно-ацетонитрильные смеси с добавлением солей, кислот или оснований. Неподвижными фазами, как правило, являются силикагели, модифицированные полярными группами (амино-, диольные, цианопропильные группы и т.д.). Более полярные соединения удерживаются сильнее. Элюирующая способность подвижной фазы возрастает с увеличением полярности.

Ионообменная и ионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Ионообменная хроматография используется для анализа как органических (гетероциклические основания, аминокислоты, белки и др.), так и неорганических (различные катионы и анионы) соединений. Разделение

компонентов анализируемой смеси в ионообменной хроматографии основано на обратимом взаимодействии ионов анализируемых веществ с ионообменными группами сорбента. Эти сорбенты представляют собой, в основном, либо полимерные ионообменные смолы (обычно сополимеры стирола и дивинилбензола с привитыми ионообменными группами), либо силикагели с привитыми ионообменными группами. Сорбенты с группами: $-\text{NH}_3^+$, $-\text{R}_3\text{N}^+$, $-\text{R}_2\text{HN}^+$, $-\text{RH}_2\text{N}^+$ и др. используются для разделения анионов (аниониты), а сорбенты с группами: $-\text{SO}_3^-$, $-\text{RSO}_3^-$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3^-$ и др. для разделения катионов (катиониты).

В качестве подвижной фазы в ионообменной хроматографии применяют водные растворы кислот, оснований и солей. Обычно используют буферные растворы, позволяющие поддерживать определенные значения pH. Возможно также использование небольших добавок смешивающихся с водой органических растворителей – ацетонитрила, метанола, этанола, тетрагидрофурана.

Ионная хроматография – вариант ионообменной хроматографии, в котором для детектирования определяемых соединений (ионов) используется кондуктометрический детектор. Для высокочувствительного определения изменений электропроводности проходящей через детектор подвижной фазы фоновая электропроводность подвижной фазы должна быть низкой.

Существуют два основных варианта ионной хроматографии.

Первый из них - двухколоночная ионная хроматография, основан на подавлении электропроводности электролита подвижной фазы с помощью второй ионообменной колонки или специальной мембранной системы подавления, находящейся между аналитической колонкой и детектором. При прохождении через систему электропроводность подвижной фазы снижается.

Второй вариант ионной хроматографии – одноколоночная ионная хроматография. В этом варианте используется подвижная фаза с очень низкой электропроводностью. В качестве электролитов широко применяют слабые органические кислоты: бензойную, салициловую или изофталевую.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Эксклюзионная хроматография (гель-хроматография) – особый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии, основанный на разделении молекул по их размерам. Распределение молекул между неподвижной и подвижной фазами основано на размерах молекул и частично на их форме и полярности.

Возможны два предельных типа взаимодействия молекул с пористой неподвижной фазой. Молекулы с размерами, превышающими максимальный диаметр пор, вообще не удерживаются и элюируются первыми, перемещаясь одновременно с подвижной фазой. Молекулы с размерами, меньшими чем минимальный диаметр пор сорбента, свободно проникают в поры и элюируются из колонки последними. Остальные молекулы, имеющие промежуточные размеры, удерживаются в порах частично и в ходе элюирования разделяются на фракции в соответствии со своими размерами и, частично, формой проникают в поры сорбента в зависимости от размера и частично в зависимости от своей формы. В результате вещества элюируются с различными временами удерживания.

Ионоэксклюзионная хроматография

В основе механизма ионоэксклюзионной хроматографии лежит эффект, в результате которого соединения в ионизированной форме не удерживаются на сорбенте-ионообменнике, тогда как соединения в молекулярной форме распределяются между неподвижной и водной фазами внутри пор ионообменного сорбента и подвижной фазой мигрирующее в пространстве между частицами сорбента. Разделение основано на электростатическом отталкивании, полярных и гидрофобных взаимодействиях между растворенными соединениями и сорбентом.

Анионогенные группы на поверхности сорбента действуют как полупроницаемая «мембрана» между стационарной и подвижной фазами. Отрицательно заряженные компоненты не достигают стационарной подвижной фазы, так как отталкиваются одноименно заряженными

функциональными группами и элюируются в «мертвом» (свободном) объеме колонки. Компоненты в молекулярном виде не «отторгаются» катионообменным сорбентом и распределяются между стационарной и подвижной фазами. Различие в степени удерживания неионных компонентов смеси продиктовано совокупностью полярных взаимодействий неионных компонентов с функциональными группами катионообменного сорбента и гидрофобных взаимодействий неионных компонентов с неполярной матрицей сорбента.

Хиральная хроматография

Целью хиральной хроматографии является разделение оптических изомеров. Разделение осуществляется на хиральных неподвижных фазах или на обычных ахиральных неподвижных фазах с использованием хиральных подвижных фаз. В качестве хиральных неподвижных фаз используются сорбенты с поверхностью модифицированной, группами или веществами, имеющими хиральные центры (хитозаны, циклодекстрины, полисахариды, белки и др. (хиральные селекторы). В качестве подвижных фаз в этом случае могут использоваться те же фазы, что и в нормально-фазовой или обращенно-фазовой хроматографии. При использовании ахиральных неподвижных фаз для обеспечения разделения энантиомеров в подвижные фазы добавляются хиральные модификаторы: хиральные комплексы металлов, нейтральные хиральные лиганды, хиральные ион-парные реагенты и др.

Ультразффективная жидкостная хроматография

Ультразффективная жидкостная хроматография представляет собой вариант жидкостной хроматографии, отличающийся большей эффективностью по сравнению с классической высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Особенностью ультразвуффективной жидкостной хроматографии является использование сорбентов с размером частиц от 1,5 до 2 мкм. Размеры хроматографических колонок обычно составляют от 50 до 150 мм в длину и от 1 до 4 мм в диаметре. Объем вводимой пробы может составлять

от 1 до 50 мкл. Использование таких хроматографических колонок позволяет значительно уменьшить время анализа и повысить эффективность хроматографического разделения. Однако, при этом давление на колонке может достигать 80 – 120 МПа, требуемая частота сбора данных детектора может возрасти до 40-100 герц, внеколоночный объем хроматографической системы должен быть минимизирован. Хроматографическое оборудование и колонки, используемые в ультраэффективной жидкостной хроматографии специально адаптированы для выполнения требований этого вида хроматографии.

Оборудование, предназначенное для ультраэффективной жидкостной хроматографии, может использоваться и в классическом варианте высокоэффективной жидкостной хроматографии.