**Ионообменная ОФС**

**хроматография Взамен ГФ XI**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод ионообменной хроматографии.

Ионообменная хроматография является разновидностью метода жидкостной колоночной хроматографии по механизму разделения, в котором подвижной фазой служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой (сорбентом).

**Область применения**

Данный метод предназначен для разделения и определения ионов при помощи ионообменников в результате их работы в динамическом режиме ионного обмена. Особенно широко она используется для определения неорганических ионов. Кроме того, ионообменная хроматография может использоваться для разделения сахаров, органических кислот, аминокислотного анализа с постколоночной дериватизацией и др.

**Основы метода**

В основе ионообменной хроматографии лежит обратимая сорбция ионов анализируемого раствора ионогенными группами сорбента. Обратимый обмен ионами в системе сорбент – растворитель протекает в этом случае с соблюдением стехиометрических отношений.

В зависимости от характера ионогенных групп ионообменные сорбенты (иониты) разделяются на катионообменные (катиониты) и анионообменные (аниониты).

**Классический метод ионообменной хроматографии** подразумевает разделение ионов в условиях низкого давления подачи элюента в колонку.

**Ионной хроматографией** называют высокоэффективный 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 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 подвижной фазы через подавляющее устройство электропроводность снижается за счет преобразования входящих в состав подвижной фазы компонентов в менее электропроводящие (менее диссоциированные) соединения.

Во втором варианте ионной хроматографии используется подвижная фаза с очень низкой электропроводностью. В качестве электролитов широко применяют слабые органические кислоты: бензойную, салициловую или изофталевую.

Еще одной разновидностью ионообменной хроматографии является **ионэксклюзионная хроматография**. В основе механима 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.

**Оборудование**

Для классической ионообменной хроматографии чаще всего используются системы собранные из различных узлов, тогда как для ионной хроматографии обычно пользуются уже готовым прибором – хроматографом. Однако основные компоненты хроматографической системы для обеих разновидностей ионообменной хроматографии совпадают с набором узлов для любой колоночной жидкостной хроматографии (насосная система, хроматографическая колонка, система детектирования, система сбора и обработки данных и др.)

***Неподвижная фаза***

Неподвижная фаза представляет собой сорбент состоящий, в основном, либо из полимерных ионообменных смол (обычно сополимеры стирола и дивинилбензола с привитыми ионообменными группами), либо являющихся силикагелем с привитыми ионообменными группами. Для ионной хроматографии возможно использование сорбентов на основе сферических частиц непористого стекла или высокопрочного полимера, покрытых тонким слоем пористого ионообменника.

Макромолекулы катионитов содержат кислотные группы различной силы, например, такие как сульфогруппы, карбоксильные и оксифенильные и другие группы (—SО3–, —RSО3–, –СООН, —PО3– и др.)

Макромолекулы анионитов, наоборот, имеют в своем составе основные группы, например, алифатические или ароматические аминогруппы различной степени замещенности (вплоть до четвертичных, —NH3+, —R3N+, —R2HN+, —RH2N+ и др.)

В H-форме катиониты и в OH-форме аниониты соответственно содержат в способном к обмену состоянии только ионы водорода или гидроксила. В солевых формах ионы водорода заменены катионами металлов или органических оснований, а анионы гидроксила – анионами кислот.

Применение ионитов для цели хроматографического анализа возможно как в солевых, так и в H- и OH-формах.

***Подвижная фаза***

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

В ионной хроматографии для повышения качества анализа возможно использование специфического оборудования. Например, для подачи чистого элюента в колонку возможно применение различных генераторов элюента (диффузионный генератор, электрогенератор с мембраной). Для создания градиента возможно использование различных смесителей. В высокоэффективном варианте для нанесения на колонку исследуемого вещества зачастую используется инжектор.

Для подавления собственной электропроводности подвижной фазы в ионной хроматографии возможно использование подавляющих колонок или мембранных подавителей. С помощью колоночного подавления раствор подвижной фазы с собственными ионами и высокой электропроводностью превращается при ионном обмене в малодиссоциированный и обладающий очень малой электропроводностью раствор. Определяемые ионы при этом не претерпевают никаких химических превращений и сохраняют свою электропроводность. При определении анионов подавляющую колонку заполняют катионообменником высокой емкости в Н-форме. При определении катионов подавляющую колонку заполняют анионообменником высокой емкости в ОН-форме. Эта колонка устанавливается после разделяющей перед кондуктометрическим детектором. Недостаток использования подавляющих колонок состоит в том, что после определенного времени работы (обычно не более 10 ч) емкость ионообменника падает, и его приходится регенерировать. Поэтому для уменьшения собственной электропроводности подвижной фазы также возможно использование мембранных подавителей, непрерывно регенерируемых в процессе работы.

Рис.1 Мембранный подавитель



**Методика разделения**

Для проведения ионообменной хроматографии хроматографическую колонку заполняют сорбентом. Хроматографические колонки обычно представляют собой трубки из материала, не вступающего в реакцию ни с сорбентом, ни с разделяемым веществом, ни с элюентом (например, из стекла или пластика). Процесс разделения можно проводить как при комнатной температуре, так и в термостатируемых колонках с указанием температуры и при уверенности в термостабильности неподвижной фазы. Предварительно ионообменник выдерживают в разбавленной хлористоводородной кислоте несколько часов, а затем промывают водой очищенной до отрицательной реакции на хлориды. В качестве неподвижной фазы (сорбента), как уже было указано ранее, чаще всего используют силикагель, смолы или полимеры с привитыми кислотными или основными группами. Сорбент в хроматографической колонке должен быть упакован равномерно и плотно. В ионной хроматографии обычно используются готовые колонки промышленного производства, поэтому их набивание сорбентом не требуется. Эффективность разделения также зависит от размера частиц и пор сорбента, которые формируют площадь поверхности соприкосновения неподвижной фазы с разделяемым веществом и элюентом, а также определяют количество привитых ионообменных групп. Для подачи подвижной фазы в колонку с заданной скоростью используются различные насосные системы. Скорость подачи может регулироваться. Возможно использование различных смесителей для создания градиента. Объем смесителя может влиять на время удерживания компонентов при градиентном элюировании. Также возможно использование различных инжекторов для ввода пробы в колонку.

Хроматографирование проводят, пропуская анализируемый раствор через колонку. Количество продуктов ионного обмена, содержащегося в смеси прошедшего через колонку анализируемого раствора и промывочной жидкости, эквивалентно количеству адсорбированных на колонке катионов или анионов анализируемого раствора. Регенерацию колонки после проведения анализа проводят с помощью растворов разбавленной хлористоводородной кислоты в случае катионита и разбавленного раствора карбоната натрия в случае анионита. После этого колонку промывают водой до нейтральной реакции.

Для детектирования возможно использование различных методов. Самым распространенным является спектрофотометрический метод. Для этого используют специальные проточные кюветы, в которых измеряется оптическая плотность проходящего сквозь нее элюата при выбранной длине волны. Спектрофотометрический детектор используется, как правило, для диапазона длин волн 190-600 нм. Для детектирования ионов, не обладающих собственным светопоглощением, возможно применение косвенного фотометрического детектирования. В этом случае в качестве элюента используется раствор вещества, поглощающего в УФ-области, например фталиевой кислоты. При выходе из колонки пиков разделяемых ионов интенсивность фонового поглощения уменьшается. Для прямого фотометрического детектирования не обладающих собственным светопоглощением ионов, можно использовать их химическое превращение в другие вещества, напротив, светопоглощающие. Для этих целей возможно использование мембранного устройства, через которое пропускают раствор реагента, образующего с определяемыми ионами поглощающие комплексы.

В случае ионной хроматографии в качестве метода детектирования используются кондуктометрическое детектирование. Для водных растворов электролитов электропроводность прямо пропорциональна их концентрации. Однако ввиду того, что в ионной хроматографии элюент сам представляет собой раствор электролита достаточно высокой концентрации и поэтому обладает собственной электропроводностью, детектирование путем простого измерения электропроводности зачастую затруднено. Поэтому, в ионной хроматографии для решения проблем детектирования при высокой собственной электропроводности подвижной фазы, может использоваться дополнительная подавляющая колонка. Если собственная электропроводность подвижной фазы достаточно мала, то возможно использование и одноколоночной ионной хроматографии. В этом случае необходимо использование разделяющей колонки с ионообменником малой емкости. В качестве элюентов, обладающих малой электропроводностью, возможно использование растворов слабых органических кислот (бензойной, фталиевой, салициловой и др.) В этом случае, однако, следует очень точно поддерживать значение pH раствора.

Основные этапы методики разделения для классической ионообменной хроматографии и высокоэффективной ионной хроматографии одинаковы. Основная разница заключается в способе подачи элюента, давлении в системе и способе детектирования.

Перечень условий хроматографирования, подлежащих указанию

В фармакопейной статье должны быть приведены: параметры колонки (длина и внутренний диаметр), тип 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, описания приготовления стандартных и испытуемых растворов.