**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ионообменная хроматография** |  | **ОФС.1.2.1.2.0008** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.2.0008.18** |

|  |
| --- |
|  |

Ионообменная хроматография представляет собой физико-химический метод разделения веществ, основанный на стехиометрическом обмене ионов анализируемого раствора и сорбента (ионообменника).

**Область применения**

Данный метод предназначен для разделения и определения ионов при помощи ионообменников в результате их работы в динамическом режиме ионного обмена. Особенно широко ионообменная хроматография используют для определения неорганических анионов. Метод также используют для разделения сахаров, органических кислот, аминогликозидов, аминокислот, аминов, пептидов, белков, гликопротеинов, аминокислотного анализа с постколоночной дериватизацией и др.

В зависимости от природы анализируемого соединения ионообменную хроматографию применяют на всех стадиях производства лекарственных средств, включая характеристику действующих и вспомогательных веществ, продуктов разложения, примесей. Анализируют следующие типы образцов: исходные материалы, промежуточные продукты (включая микробиологические среды и культуральные жидкости), разбавители, лекарственные формы, растворы для чистки производственного оборудования и отходы. Данный вид хроматографии является особенно ценным для анализа ионных и ионизируемых в подвижной фазе веществ, имеющих слабое поглощение или вовсе не имеющих поглощения в УФ области. Возможность связать ионообменное разделение с множеством способов детектирования, например, с пульсирующим амперометрическим детектированием, детектированием в УФ или видимой области, масс-спектрометрическим детектированием и масс-спектрометрическим детектированием с индуктивно связанной плазмой, позволяет применять ионообменную хроматографию в тех случаях, когда детектирование, подходящее для конкретного вещества, обеспечивает требуемую степень чувствительности и специфичности. Ионэксклюзионное разделение позволяет расширить применение данного метода на некоторые неионизируемые соединения (например, многоатомные спирты, углеводы). Широкий динамический диапазон данного метода даёт возможность применять его для количественного анализа как следовых веществ, так и основных компонентов.

**Метод**

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) разделяют на катионообменные (катиониты) и анионообменные (аниониты).

Выделяют следующие варианты ионообменной хроматографии.

***Классический метод ионообменной хроматографии***

Этот вариант подразумевает разделение ионов в условиях низкого давления подачи элюента в колонку.

***Ионная хроматография***

Высокоэффективный вариант ионообменной хроматографии, в котором для детектирования определяемых соединений (ионов) используют кондуктометрический детектор и другие детекторы, в частности спектрофотометрический, амперометрический, рефрактометрический. Ионную хроматографию используют в испытаниях на подлинность и количественном определении неорганических катионов и анионов, органических кислот, углеводов, многоатомных спиртов, аминогликозидов, аминокислот, белков, гликопротеинов и других веществ. В ионной хроматографии проводят разделение с использованием ионообменного, ион-эксклюзионного или ион-парного подходов. Разделение в ионной хроматографии основано на различии в плотности заряда анализируемых образцов, что, в свою очередь, зависит от заряда и размера индивидуальных анализируемых ионов. Разделение также проводят на основе гидрофобных различий ионов.

Для высокочувствительного кондуктометрического определения фоновая электропроводность подвижной фазы, проходящей через детектор, должна быть низкой.

Существуют два основных варианта ионной хроматографии с кондуктометрическим детектированием.

Первый из них основан на подавлении электропроводности 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 счёт преобразования входящих в состав подвижной фазы компонентов в менее электропроводящие (менее диссоциированные) соединения. Например, разбавленные растворы натрия гидроксида (10–50 мМ), используемые в качестве подвижной фазы при разделении анионов, при прохождении через подавляющее устройство превращаются в воду, обладающую очень низкой проводимостью. Аналогичные реакции протекают и при разделении катионов, когда кислотные подвижные фазы превращаются в воду, а анализируемые катионы – в высокопроводящие гидроксильные формы.

Во втором варианте ионной хроматографии используют подвижную фазу с изначально низкой электропроводностью без дополнительного подавления фоновой электропроводности. В качестве электролитов широко применяют слабые органические кислоты: бензойную, салициловую, изофталевую и их соли.

При вариантах детектирования, отличных от кондуктометрического, как правило, нет необходимости добиваться снижения фоновой электропроводности подвижной фазы, что позволяет использовать при приготовлении элюентов более широкий спектр веществ.

***Ионэксклюзионная хроматография***

В основе механизма ионэксклюзионной 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 подвижной фазами внутри пор ионообменного сорбента, и подвижной фазой, мигрирующей в пространстве между частицами сорбента. Разделение основано на электростатическом отталкивании, полярных и гидрофобных взаимодействиях между растворёнными соединениями и сорбентом.

Анионогенные группы на поверхности сорбента действуют как полупроницаемая «мембрана» между стационарной и подвижной фазами. Отрицательно заряженные компоненты не достигают стационарной фазы, так как отталкиваются одноимённо заряженными функциональными группами и элюируются в «мёртвом» (свободном) объёме 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**

Основные компоненты ионохроматографической системы для всех разновидностей ионообменной хроматографии совпадают с набором узлов для любой колоночной жидкостной хроматографии. При этом в ионообменной хроматографии используют дополнительные устройства, например для подавления электропроводности подвижной фазы в случае кондуктометрического детектирования, блок генерации элюента и т.д.

***Неподвижные фазы***

Неподвижные фазы, используемые в методе ионообменной хроматографии, являются катионо- или анионообменниками. Значительно реже используют фазы, обладающие обеими функциями. Неподвижная фаза представляет собой сорбент, состоящий, в основном, либо из полимерных ионообменных смол (обычно сополимеры стирола и дивинилбензола, этилвинилбензола и дивинилбензола, поливиниловый спирт, полиметакрилат с привитыми ионообменными группами), либо являющихся силикагелем с привитыми ионообменными группами. При использовании щелочной подвижной фазы применение силикагеля ограничено, вследствие его растворимости в воде при щелочных значениях рН. В этих случаях рекомендуют использовать полимерные основы. Такие материалы обладают большей устойчивостью по отношению к крайним значениям рН и во многих случаях совместимы с органическими растворителями. Для ионной хроматографии используют сорбенты на основе сферических частиц непористого стекла или высокопрочного полимера, покрытые тонким слоем пористого ионообменника.

Обычно для разделения анионов используют анионообменные материалы на основе полимеров и разбавленные растворы оснований в качестве подвижной фазы. Однако для разделения катионов не требуется стабильность во всём диапазоне рН, что характерно для органических полимеров, поскольку в качестве подвижной фазы используют разбавленные растворы кислот. Поэтому обычно для разделения катионов применяют катионообменные материалы на основе силикагеля, который проявляет значительно более высокую хроматографическую эффективность.

Катиониты содержат кислотные группы различной силы, например, сульфогруппы (–SО3H), карбоксильные (–СООН) и фосфоновые (–PO(OH)2) группы.

Аниониты, наоборот, имеют в своем составе основные группы, например, алифатические или ароматические аминогруппы различной степени замещённости (вплоть до четвертичных,—NH3OH, —R3NOH, —R2HNOH, —RH2NOHи –NH3+, –NRH2+, –NR2H+, –NR3+).

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 гидроксид-ионы – анионами кислот.

***Подвижные фазы***

В качестве подвижной фазы в ионообменной хроматографии применяют водные растворы кислот, оснований и солей. Часто используют буферные растворы, позволяющие поддерживать определённые значения рН. Возможно также использование небольших добавок смешивающихся с водой органических растворителей – ацетонитрила, метанола, этанола, тетрагидрофурана. Часто состав подвижной фазы и используемый способ детектирования определяется природой анализируемого вещества.

При использовании кондуктометрического детектора кислоты и основания, используемые в качестве подвижной фазы, превращают в воду или слабо диссоциирующие соединения. Если анализируемым веществом являются анионы, в качестве подвижных фаз используют растворы натрия или калия гидроксида, натрия карбоната, натрия гидрокарбоната и реже натрия тетрабората. При анализе катионов подвижными фазами являются метансульфоновая кислота, серная кислота и реже хлористоводородная кислота.

При использовании спектрофотометрического детектора большое количество растворов кислот может быть использовано для приготовления подвижной фазы, включая фталевую кислоту и *п*-гидроксибензойную кислоту для определения анионов и метансульфоновую кислоту для определения катионов.

При амперометрическом детектировании в качестве подвижной фазы используют растворы сильных кислот или оснований, хотя в некоторых случаях используют растворы солей с близким к нейтральному значению рН или растворы кислот и оснований, содержащие соль. При использовании щелочных подвижных фаз контакт с углерода диоксидом и карбонатами должен быть минимизирован путём использования реагентов высокой чистоты и хранения под слоем азота или гелия.

В ионной хроматографии для повышения качества анализа возможно использование специфического оборудования. Например, для подачи чистого элюента в колонку возможно применение различных насосных систем и генераторов элюента (диффузионный генератор, электрогенератор с мембраной). Скорость подачи регулируют. Для создания градиента возможно использование различных смесителей. Объём смесителя может влиять на время удерживания компонентов при градиентном элюировании. В высокоэффективном варианте для нанесения на колонку исследуемого вещества зачастую используют 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 малой электропроводностью раствор. Определяемые ионы при этом не претерпевают никаких химических превращений и сохраняют свою электропроводность. При определении анионов подавляющую колонку заполняют катионообменником высокой ёмкости в Н-форме. При определении катионов подавляющую колонку заполняют анионообменником высокой ёмкости в ОН-форме. Эту колонку устанавливают после разделяющей перед кондуктометрическим детектором. Недостаток использования подавляющих колонок состоит в том, что после определённого времени работы (обычно не более 10 ч) ёмкость ионообменника падает, и его приходится регенерировать с помощью NaOH или HCl в зависимости от природы ионообменника (NaOH для анионообменника, HCl для катионообменника). Поэтому для уменьшения собственной электропроводности подвижной фазы используют мембранные подавители, непрерывно регенерируемые в процессе работы.

Обычно используемые химические подавители делят на две категории. В подавителях первого типа реакции протекают на ионообменной мембране с ионами, регенерируемыми химически или за счёт продуктов электролиза воды. В подавителях второго типа подавляющие реакции протекают в слое смолы с высокой ионообменной ёмкостью, регенерируемой химически или за счёт продуктов электролиза воды.



Рисунок 1 – Мембранный подавитель

**Методика разделения**

Процесс разделения проводят как при комнатной температуре, так и в термостатируемых колонках при заданной температуре, с указанием температуры и при уверенности в термостабильности неподвижной фазы, элюента и определяемых соединений. Эффективность разделения зависит от размера частиц и пор сорбента, которые формируют площадь поверхности соприкосновения неподвижной фазы с разделяемым веществом и элюентом, плотности прививки функциональных групп и их природы.

**Методы детектирования**

Для детектирования возможно использование различных методов. Самым распространённым является спектрофотометрический метод. Для этого используют специальные проточные кюветы, в которых измеряется оптическая плотность проходящего сквозь неё элюента при выбранной длине волны. Спектрофотометрический детектор используют, как правило, для определения неорганических и органических ионов, которые поглощают УФ излучение в диапазоне длин волн 190–600 нм. К ним относят органические кислоты, бромиды, йодиды, нитраты, нитриты, тиосульфаты и металлоцианатные комплексы. Для детектирования ионов, не обладающих собственным светопоглощением, применяют косвенное фотометрическое детектирование. В этом случае в качестве элюента используют раствор вещества, поглощающего в УФ области, например фталевой кислоты. При выходе из колонки разделяемых ионов поглощение излучения уменьшается. Для прямого фотометрического детектирования не обладающих собственным светопоглощением ионов используют их химическое превращение в другие вещества, напротив, светопоглощающие. Для этих целей используют мембранное устройство, через которое пропускают раствор реагента, образующего с определяемыми ионами поглощающие комплексы.

В случае ионной хроматографии в качестве метода детектирования используют 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 путём простого измерения электропроводности зачастую затруднено. Поэтому в ионной хроматографии для решения проблем детектирования при высокой собственной электропроводности подвижной фазы используют дополнительную подавляющую колонку. Если собственная электропроводность подвижной фазы достаточно мала, то системы подавления не используют. В этом случае используют разделяющие колонки с ионообменником малой ёмкости. В качестве элюентов, обладающих малой электропроводностью, используют растворы слабых органических кислот (бензойной, фталевой, салициловой и др.). В этом случае очень точно поддерживают значение pH раствора.

Возможны и другие методы детектирования, например, масс-спектрометрическое или импульсное электрохимическое детектирование. Амперометрическое детектирование применяют для анализа электрохимически активных соединений, таких как углеводы, аминокислоты, амины и органические соединения серы, которые легко окисляются.

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.

**Оценка пригодности хроматографической системы**

Критерии оценки пригодности хроматографической системы, а также допустимая степень изменения её параметров указаны в ОФС «Хроматография». Если при проведении анализа требуются дополнительные критерии, они должны быть указаны в методике.

**Перечень условий хроматографирования,**

**подлежащих указанию в методике**

В методике должны быть приведены: параметры колонки (длина и внутренний диаметр), тип сорбента с указанием размера частиц, размера пор, температура колонки (если необходимо термостатирование), объём вводимой пробы, состав подвижной фазы и способ её 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. В случае необходимости должно быть указание об использовании систем подавления фоновой электропроводности и их рабочие параметры.