

faza gazowa przenoszona na kolumnę, zachowując przy tym niezbędne środki ostrożności w celu uniknięcia jakichkolwiek zmian równowagi.

POSTĘPOWANIE

Stosując preparaty porównawcze, sprawdzić odpowiedniość ustawień aparatu w celu uzyskania zadowalającego sygnału.

BEZPOŚREDNIA KALIBRACJA

Oddzielnie umieścić w identycznych pojemnikach preparat badany i każdy z preparatów porównawczych, jak podano w monografii, unikając bezpośredniego kontaktu pomiędzy próbkami i urządzeniem dozującym.

Zamknąć hermetycznie pojemniki i umieścić w kontrolowanej termostатовanej komorze w temperaturze i pod ciśnieniem podanym w monografii; po uzyskaniu stanu równowagi wykonać oznaczenie chromatograficzne w podanych warunkach.

DODAWANIE WZORCA

Do identycznych odpowiednich pojemników dodać jednakowe objętości preparatu badanego. Dodać do wszystkich pojemników, oprócz jednego, odpowiednią ilość preparatu porównawczego zawierającego znane stężenie substancji oznaczanej tak, aby przygotować serię preparatów, zawierających stale wzrastające stężenia substancji.

Zamknąć hermetycznie pojemniki i umieścić w kontrolowanej termostатовanej komorze w temperaturze i pod ciśnieniem podanym w monografii; po uzyskaniu stanu równowagi wykonać oznaczenie chromatograficzne w podanych warunkach.

Obliczyć równanie regresji, używając metody najmniejszych kwadratów i wyznaczyć z równania stężenie oznaczanej substancji w preparacie badanym.

Alternatywnie, sporządzić wykres średnich odczytów w zależności od ilości dodanej substancji oznaczanej. Ekstrapolować linię połączenia punktów na wykresie do przecięcia osi stężeń. Odległość pomiędzy tym punktem i skrzyżowaniem się osi wskazuje stężenie oznaczanej substancji w preparacie badanym.

01/2019:20229
zmieniona (10.0)

2.2.29. CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

PODSTAWY

Chromatografia cieczowa (*liquid chromatography*, LC) jest techniką rozdzielania chromatograficznego opartą na różnicy w dystrybucji związku pomiędzy dwie niemieszające się fazy, w których fazą ruchomą jest ciecz przepływająca przez fazę nieruchomą (stacjonarną) umieszczoną w kolumnie.

LC jest oparta przede wszystkim na mechanizmach adsorpcji, podziału mas, wymiany jonowej, wykluczania lub oddziaływaniach stereochemicznych.

Jeżeli nie podano inaczej, poniższe informacje są wiarygodne zarówno dla standardowej LC, jak i dla LC z użyciem kolumn wypełnionych ziarnami o zmniejszonej wielkości (np. poniżej 2 µm).

W drugiej technice, wymagana jest aparatura scharakteryzowana przez zdolność utrzymywania wyższych ciśnień (zwykle do 100 MPa, tj. ok. 15 000 psi), zmniejszoną objętość wolną kolumny w celu ograniczenia poszerzania pików, system usprawniający mieszanie w układzie gradientu i możliwość odbierania zwiększonej częstotliwości sygnałów przez układ detekcji.

SPRZĘT

Chromatograf cieczowy składa się zwykle z:

- sytemu pomp;
- dozownika;
- kolumny chromatograficznej (może być termostатовana);
- jednego lub kilku detektora (detektorów);
- systemu zbierającego dane.

Faza ruchoma podawana z jednego lub kilku zbiorników jest pompowana do dozownika, następnie na kolumnę, zazwyczaj przy stałym przepływie, a następnie do detektora (detektorów).

SYSTEM POMP

System pomp do chromatografii cieczowej jest niezbędny do podawania fazy ruchomej z kontrolowaną szybkością przepływu. Pulsacje ciśnienia są minimalizowane, np. przez przepuszczanie fazy ruchomej pod ciśnieniem przez urządzenie tłumiące pulsacje. Przewody i połączenia są dostosowane do pracy z ciśnieniami wytwarzanymi przez system pomp. Pompy mogą być wyposażone w urządzenia odgazowujące, które usuwają pęcherzyki powietrza.

Mikroprocesor kontrolujący system pomp jest odpowiedni do dokładnego podawania fazy ruchomej o stałym (elucja izokratyczna) lub zmiennym składzie (elucja gradientowa), zgodnie z wprowadzonym programem. W przypadku elucji gradientowej dostępne są systemy dostarczające rozpuszczalnik (rozpuszczalniki) z więcej niż jednego zbiornika, a rozpuszczalniki mogą być mieszane po nisko- lub wysokociśnieniowej stronie pompy (pomp).

DOZOWNIKI

Roztwór próbki jest wprowadzany do przepływającej fazy ruchomej na czoło kolumny lub blisko czoła używając urządzenia dozującego dostosowanego do pracy z wysokim ciśnieniem. Stosowane są pętle o objętości stałej lub zmiennej, przy dozownikach ręcznych lub automatycznych. Częściowe napełnianie pętli podczas wprowadzania ręcznego może niekorzystnie wpływać na precyzję podawanej objętości.

FAZY NIERUCHOME

Stosuje się wiele rodzajów faz nieruchomych, takich jak:

- krzemionka lub tlenek glinu powszechnie używane do chromatografii LC w normalnym układzie faz (polarna faza nieruchoma i niepolarna faza ruchoma), gdzie rozdzielanie jest oparte na różnicach w adsorpcji w fazie nieruchomej i/lub podziale mas pomiędzy fazą ruchomą i fazą nieruchomą (chromatografia podziałowa);
- różne chemicznie modyfikowane nośniki przygotowane z polimerów, krzemionki i porowatego grafitu używane w normalnym układzie faz oraz w chromatografii w układzie faz odwróconych (niepolarna faza nieruchoma i polarna faza ruchoma), gdzie rozdzielanie jest oparte głównie na podziale cząsteczek;
- żywice lub polimery z grupami kwasowymi lub zasadowymi używane do chromatografii jonowymiennej, gdzie rozdzielanie jest oparte na konkurencji między rozdzielanymi jonami i jonami fazy ruchomej;
- porowata krzemionka lub polimery używane do chromatografii wykluczania (2.2.30), gdzie rozdzielanie jest oparte na różnicach pomiędzy objętościami cząsteczek, co odpowiada sterycznemu wykluczaniu;
- specjalne modyfikowane fazy nieruchome, np. pochodne celulozy lub amylozy, białka lub peptydy, cyklodekstryny itd. używane do rozdzielania enancjomerów (chromatografia chiralna).

Większość rozdzieleń jest oparta w chromatografii LC w odwróconym układzie faz na zastosowaniu chemicznie modyfikowanej krzemionki jako fazy nieruchomej. Powierzchnia nośnika, tj. grupy silanolowe krzemionki poddawane są reakcji z różny-

mi odczynnikami silanowymi, w celu utworzenia kowalencyjnie związanych pochodnych sililowych, które pokrywają różną liczbę miejsc aktywnych na powierzchni nośnika. Rodzaj fazy związanej jest istotnym parametrem wpływającym na właściwości rozdzielania układu chromatograficznego.

Jeżeli nie jest inaczej podane przez producenta, kolumny do chromatografii w odwróconym układzie faz produkowane na bazie krzemionki uważa się za trwałe przy zastosowaniu faz ruchomych o rzeczywistej wartości pH od 2,0 do 8,0. Kolumny zawierające porowaty grafit lub cząstki materiałów polimerowych takich jak kopolimer styren-diwinilobenzen są trwałe w szerszym zakresie pH.

W szczególnych przypadkach wykonuje się analizy w chromatografii LC w normalnym układzie faz z użyciem jako fazy nieruchomej niemodyfikowanej krzemionki lub polarnej chemicznie modyfikowanej krzemionki (np. cyjanopropyl- lub diolo-) z niepolarną fazą ruchomą.

Do analitycznego rozdzielania stosuje się zazwyczaj wielkość ziaren w zakresie pomiędzy 2 µm a 10 µm. Ziarna mogą mieć kształt kulisty lub nieregularny o różnej porowatości i specyficznej powierzchni. Te właściwości mają wpływ na zachowanie chromatograficzne poszczególnych faz nieruchomych. W przypadku chromatografii w odwróconym układzie faz dodatkowymi czynnikami mającymi wpływ na właściwości kolumny są rodzaj fazy nieruchomej, stopień związania, np. wyrażony jako udział węgla, oraz czy faza nieruchoma jest związana na końcu (tj. część resztkowych grup silanolowych jest sililowana). Skutkiem obecności resztkowych grup silanolowych może być wystąpienie asymetrii pików, szczególnie w przypadku substancji zasadowych.

Dodatkowo do ziaren porowatych, mogą być użyte materiały powierzchniowo porowate lub monolityczne.

Jeżeli w monografii nie podano inaczej, jako kolumny analityczne używane są kolumny wykonane ze stali nierdzewnej o różnej długości i średnicy wewnętrznej (Ø). Kolumny o średnicy wewnętrznej poniżej 2 mm są często opisywane jako kolumny o zmniejszonej średnicy.

Temperatura fazy ruchomej i kolumny musi być stała w czasie trwania całej analizy. Większość rozdzieleń jest wykonywana w temperaturze pokojowej, ale niektóre wymagają innej temperatury w celu optymalizacji procesu.

FAZY RUCHOME

Do chromatografii LC w normalnym układzie faz używa się zwykle rozpuszczalników organicznych o niskiej polarności. W celu uzyskania powtarzalnych wyników, zawartość pozostałości wody w rozpuszczalnikach stosowanych w fazie ruchomej musi być ściśle kontrolowana.

W chromatografii LC w odwróconym układzie faz używa się wodnych faz ruchomych zwykle z dodatkiem organicznych rozpuszczalników i/lub modyfikatorów.

Składniki fazy ruchomej są zwykle filtrowane w celu usunięcia cząstek większych niż 0,45 µm (lub większych niż 0,2 µm jeżeli faza nieruchoma składa się z ziaren poniżej 2 µm i jeżeli użyte są specjalne detektory, np. detektory światła rozproszonego). Wieloskładnikowe fazy ruchome są przygotowywane przez odmierzenie określonych objętości (chyba, że specyfikuje się masy) poszczególnych składników, a następnie ich wymieszanie. Alternatywnie można podawać rozpuszczalniki z oddzielnych pomp, ich objętości są wtedy kontrolowane przez zawory dozujące pompy i mieszane w określonych proporcjach. Rozpuszczalniki są zwykle odgazowywane przed podłączeniem do układu przez gazowanie helem, umieszczenie w łaźni ultradźwiękowej i/lub używając w linii produkcyjnej (*in-line*) włączonego w układ chromatograficzny systemu odgazowywania membrana/próżnia. Odgazowanie jest konieczne

w celu uniknięcia powstawania pęcherzyków powietrza w naczynku przepływowym detektora.

Rozpuszczalniki do sporządzania fazy ruchomej są zazwyczaj wolne od stabilizatorów, a w przypadku zastosowania detektora spektrofotometrycznego w nadfiolecie, są przepuszczalne dla światła o długości fali detekcji. Rozpuszczalniki oraz inne używane składniki muszą być odpowiedniej jakości. W szczególności, woda do chromatografii OD jest używana do przygotowania faz ruchomych jeżeli woda, lub roztwór wodny, jest jednym ze składników. Każde konieczne ustalanie pH, jest wykonywane dla wodnych składników fazy ruchomej, a nie mieszaniny. Jeżeli się używane roztwory buforowe lub roztwory soli prowadzi się odpowiednie płukanie układu chromatograficznego mieszaniną wody i małymi proporcjami organicznej części fazy ruchomej (5% V/V), aby zapobiec krystalizacji soli po zakończeniu analizy.

Fazy ruchome mogą zawierać inne składniki, np. przeciwjon stosowany w chromatografii par jonowych lub selektor chiralny do chromatografii chiralnej z użyciem niechiralnych faz nieruchomych.

DETEKTORY

Najczęściej stosowane są detektory spektrofotometryczne w zakresie nadfioletu i światła widzialnego (UV/Vis) (w tym detektory z matrycą diodową) (2.2.25). Mogą być również używane spektrofotometry fluorescencyjne, refraktometry różnicowe (*differential refractometers*, RI), detektory elektrochemiczne (*electrochemical detectors*, ECD), detektory światła rozproszonego, detektory aerozolowe (*charged aerosol detectors*, CAD), spektrometrii mas (*mass spectrometers*, MS) (2.2.43), detektory radioaktywności i detektory laserowe światła rozproszonego (*multi-angle light scattering*, MALS) oraz inne detektory.

POSTĘPOWANIE

Stabilizować kolumnę z użyciem podanej fazy ruchomej i szybkości przepływu, w temperaturze pokojowej lub określonej w monografii, do osiągnięcia stabilnej linii podstawowej. Przygotować roztwór (roztwory) substancji badanej i wymagany roztwór (roztwory) porównawczy. Roztwory muszą być pozbawione cząstek stałych.

Kryteria oceny przydatności układu są opisane w rozdziale 2.2.46. *Chromatograficzne techniki rozdzielania*. W rozdziale tym podano również zakres, w jakim można dostosowywać parametry układu chromatograficznego, aby spełnić kryteria przydatności układu.

01/2019:20230

2.2.30. CHROMATOGRAFIA WYKLUCZANIA

PODSTAWY

Chromatografia wykluczania jest techniką chromatografii cieczowej (2.2.29), w wyniku której rozdzielane są cząsteczki w roztworze zgodnie z ich wielkością. W połączeniu z organicznymi fazami ruchomymi technika ta znana jest jako chromatografia przenikania żelowego (żelowa), a w połączeniu z wodnymi fazami ruchomymi zwana jest chromatografią filtracji żelowej. Próbkę jest wprowadzana na kolumnę, która jest wypełniona żelem lub cząstkami materiału porowatego i jest rozwijana przy użyciu fazy ruchomej. Rozdzielanie następuje przez powtarzające się wymiany rozdzielanych cząsteczek pomiędzy roztworem fazy ruchomej a nieruchomą ciekłą fazą stacjonarną w porach materiału wypełnienia kolumny. Zakres wielkości porów materiału wypełnienia kolumny decyduje o zakresie wielkości cząsteczek, w jakim może zachodzić rozdzielanie analizowanych substancji.