



АВТОРСКАЯ ШКОЛА
МЕДПЕРЕВОДА
ОЛЬГИ ГИЛЯРЕВСКОЙ



ВЕБИНАР 5

ХРОМАТОГРАФИЯ

Анна Трифонова
22 декабря 2020 г.

План

1

Принцип метода

2

Основные виды
хроматографии

3

Детектирование в
хроматографии

4

Особенности
перевода методик

Вебинар 5
Хроматография

Оригинал	Переводчик	Редактор
Identification	Подлинность	Подлинность
Mix 1-2 mg of the product to be examined with 300 mg of finely powdered and dried potassium bromide p.a. Carefully grind the mixture, spread it uniformly, and submit it to a pressure of about 800 MPa. Prepare the reference substance by the same procedure and record the spectra. Celiprolol must exhibit absorption at the wave numbers of about 1696 cm^{-1} , 1656 cm^{-1} and 1599 cm^{-1} . Compare with the spectrum obtained with Celiprolol RS.	1-2 мг испытуемого продукта смешивают с 300 мг мелкоизмельченного и высушенного калия бромида p.a. Смесь тщательно растирают до однородности и прессуют при давлении примерно 800 МПа . Аналогично приготавливают стандартное вещество и записывают спектры. Целипролол должен проявлять абсорбцию при волновых числах около 1696 cm^{-1} , 1656 cm^{-1} и 1599 cm^{-1} . Сравнивают со спектром, полученным для референтного стандарта целипролола.	1-2 мг испытуемого продукта смешивают с 300 мг тонкоизмельченного высушенного калия бромида ч.д. а. Смесь тщательно растирают до <u>однородного состояния</u> , распределяют ее равномерно и прессуют под давлением <u>около 800 МПа</u> . Подготовку <u>стандартного образца</u> проводят аналогичным образом, после чего <u>снимают спектры</u> . Целипролол должен <u>демонстрировать поглощение</u> при волновых числах около 1696 <u>см⁻¹</u> , 1656 <u>см⁻¹</u> и 1599 <u>см⁻¹</u> . Спектр испытуемого образца сравнивают со спектром <u>СО</u> целипролола.

Оригинал	Переводчик	Редактор
$^1\text{H-NMR}$ spectrum	$^1\text{H-ЯМР}$ спектр	Спектр ЯМР ^1H
The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Celiprolol in CDCl_3 shows the following characteristics:	$^1\text{H-ЯМР}$ спектр Целипролола, снятый в CDCl_3 показывает следующие характеристики:	Спектр ЯМР ^1H целипролола в CDCl_3 демонстрирует следующие характеристики:
- An enlarged signal (which disappears by adding D_2O) at about 9.8 delta (1 proton) to be attributed to the carboxylic hydroxyl;	- широкий сигнал (который исчезает при добавлении D_2O) с химическим сдвигом около 9,8 дельта (1 протон), относится к гидроксильной группе карбоновой кислоты;	- увеличенный сигнал (который исчезает при добавлении D_2O) с дельта около 9,8 (1 протон), обусловленный атомами водорода карбоксильной группы;

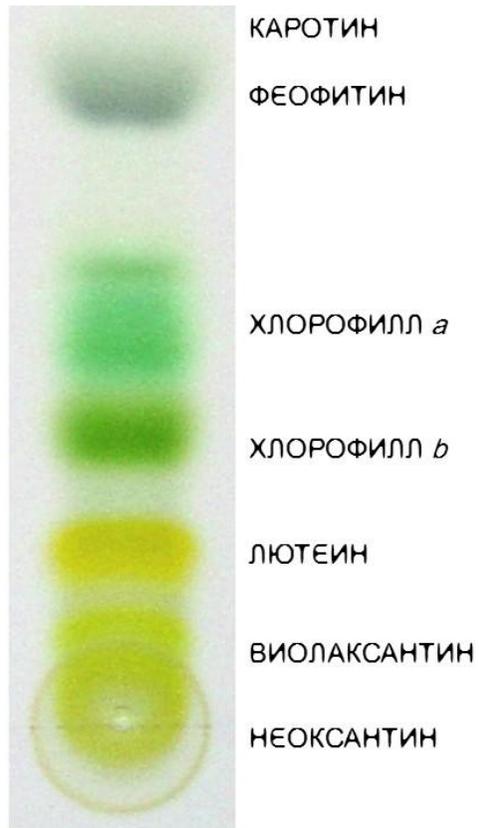
Оригинал	Переводчик	Редактор
<p>- A multiplet between 7.2 and 7.8 delta (10 protons) to be attributed to the aromatic hydrogens;</p>	<p>- мультиплет между 7,2 и 7,8 дельта (10 протонов), относится к ароматическим протонам;</p>	<p>- мультиплет в диапазоне дельта 7,2-7,8 (10 протонов), обусловленный атомами водорода ароматических циклов;</p>
<p>- A quartet centered at 3.82 delta (1 proton) to be assigned to the -CH-CH₃ of propionic acid;</p>	<p>- квартет при 3,82 дельта (1 протон) относится к протону -CH-CH₃ группы пропионовой кислоты;</p>	<p>- квартет, <u>сосредоточенный вокруг</u> дельта 3,82 (1 протон), обусловленный атомом водорода СН-группы, соседней с СН₃-группой пропионовой кислоты;</p>
<p>- A doublet centered at 1.55 delta (3 protons) to be attributed to the CH₃-CH of propionic acid, which couples with the adjacent CH.</p>	<p>- дублет при 1,55 дельта (3 протона), относится к протонам СН₃-группы, находящейся при СН-группе пропионовой кислоты.</p>	<p>- дублет, сосредоточенный вокруг дельта 1,55 (3 протона), относящийся к атомам водорода СН₃-группы, соседней с СН-группой пропионовой кислоты.</p>

Оригинал	Переводчик	Редактор
UV absorption characteristics	Характеристики спектра поглощения в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях	Характеристики поглощения в УФ-области
The UV absorbance spectrum of a Celiprolol solution exhibits, in the range of 230-350 nm, only one absorbance maximum at about 258 nm.	УФ спектр поглощения раствора Целипролола в диапазоне от 230 нм до 350 нм имеет только один максимум поглощения около 258 нм.	УФ-спектр поглощения раствора <u>целипролола</u> в диапазоне 230-350 нм демонстрирует только один максимум поглощения при <u>длине волны</u> около 258 нм.

Хроматографические методы (ГФ 14, том 1)

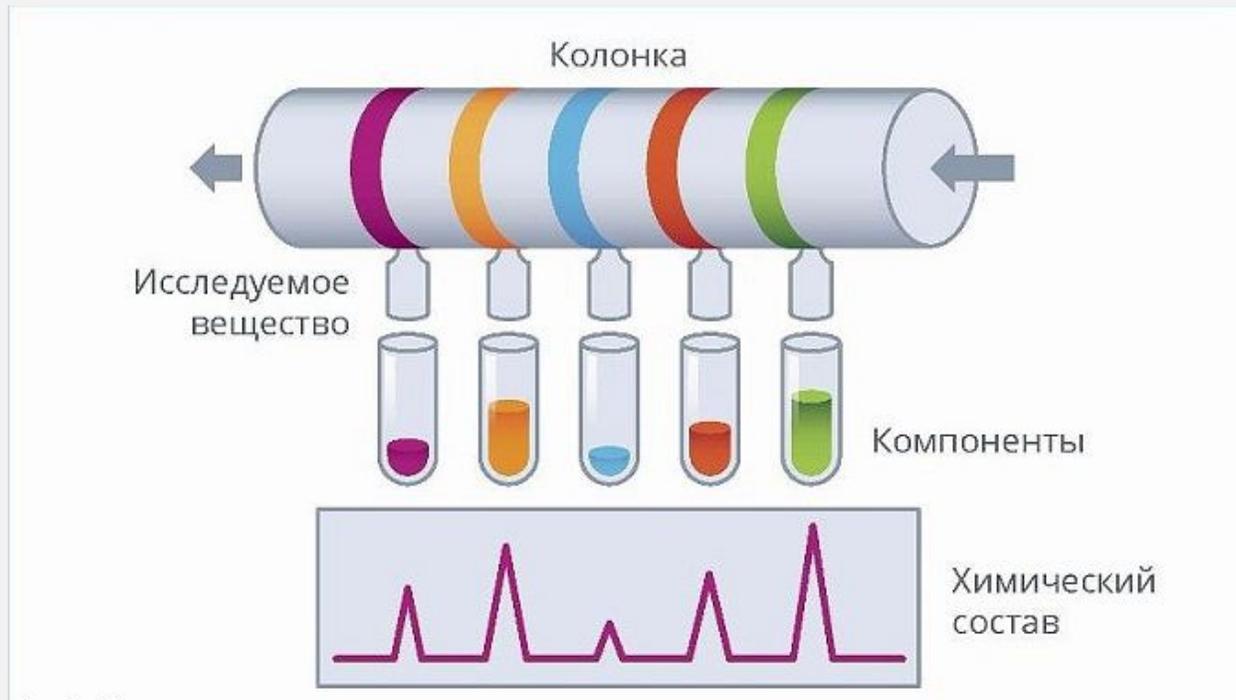
- Хроматография (ОФС. 1.2.1.2.0001.15)
- Хроматография на бумаге (ОФС. 1.2.1.2.0002.15)
- Тонкослойная хроматография (ОФС. 1.2.1.2.0003.15)
- Газовая хроматография (ОФС. 1.2.1.2.0004.15)
- Высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФС. 1.2.1.2.0005.15)
- Суперкритическая флюидная хроматография (ОФС. 1.2.1.2.0006.15)
- Эксклюзионная хроматография (ОФС. 1.2.1.2.0007.18)
- Ионообменная хроматография (ОФС. 1.2.1.2.0008.18)
- Аффинная хроматография (ОФС. 1.2.1.2.0009.18)

Что такое хроматография?



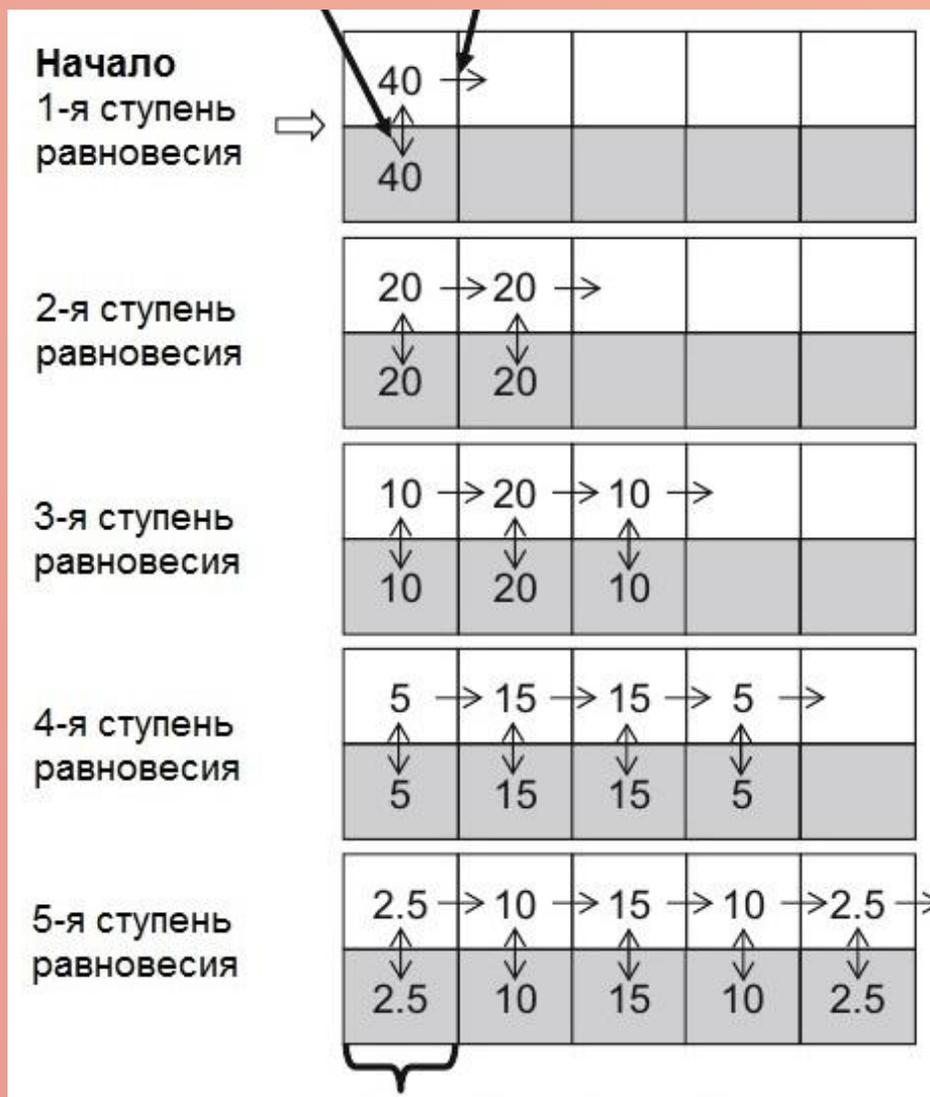
- метод разделения смесей
- процесс перераспределения веществ или частиц между несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами
- наука

Первый хроматографический опыт
(1903 г.)



Основной принцип

Многokратное перераспределение элементов смеси между двумя фазами – подвижной и неподвижной



Почему хроматография так популярна?

- Разделение смесей близких по составу веществ
- Качественный и количественный анализ
- Мягкие условия разделения
- Высокая эффективность (широкий линейный диапазон и низкие пределы обнаружения)

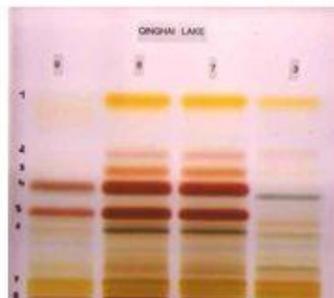
Хроматография

От древнегреческого χρώμα — «цвет»

Виды хроматографии



Бумажная хроматография
Paper Chromatography



Тонкослойная хроматография
Thin-layer Chromatography
Хроматография



Газовая хроматография
Gas Chromatography

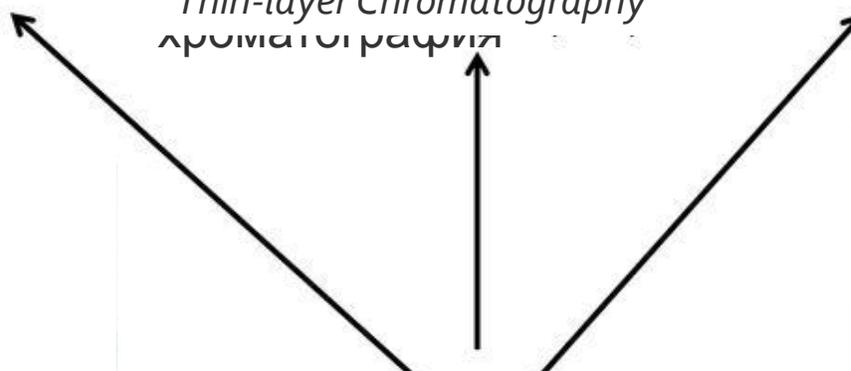


Жидкостная хроматография/
Высокоэффективная жидкостная хроматография
Liquid Chromatography/High-performance Liquid Chromatography



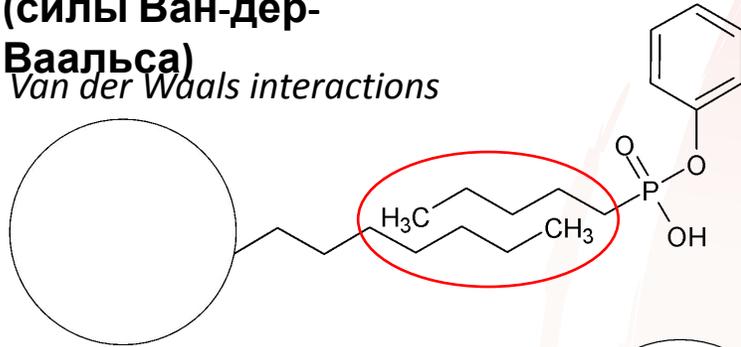
Сверхкритическая флюидная хроматография
Supercritical Fluid Chromatography

Chromatography

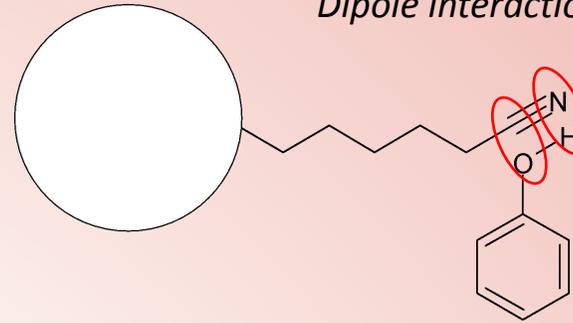


Механизмы взаимодействия

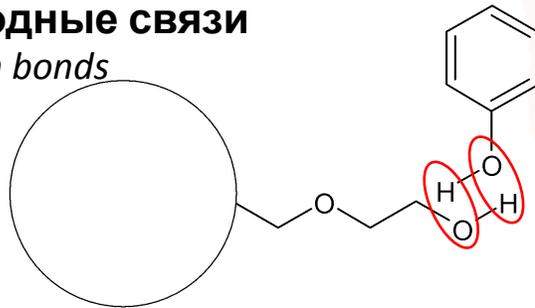
**Гидрофобные
(силы Ван-дер-Ваальса)**
Van der Waals interactions



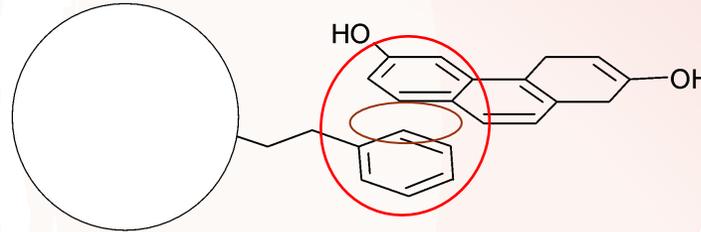
Диполь-дипольные
Dipole interactions



Водородные связи
Hydrogen bonds



**π-π
взаимодействия**
π-π interactions



**Электростатическое
взаимодействие
(ионы)**
Electrostatic interactions

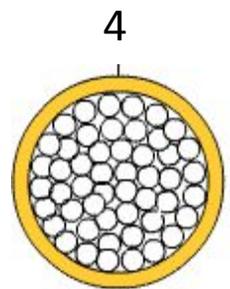
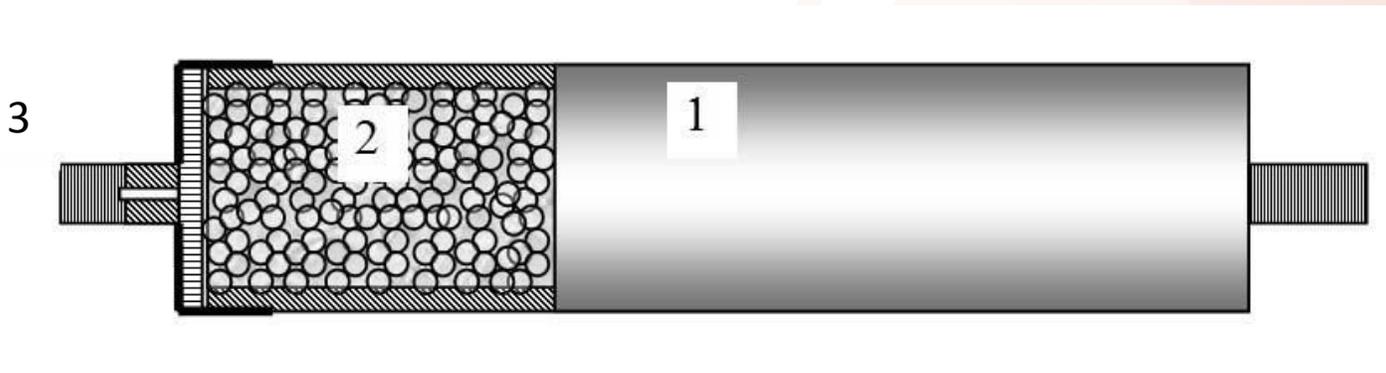


Колоночная хроматография. Элементы

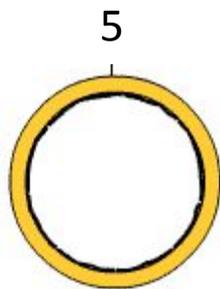
Колонка

Column

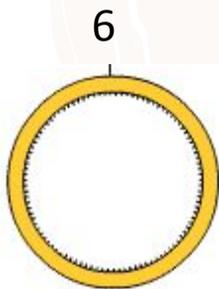
Устройство для хроматографии, выполняющее функцию разделения смеси на индивидуальные компоненты



Packed Column



Porous Layer
Open Tube



Wall Coated
Open Tube

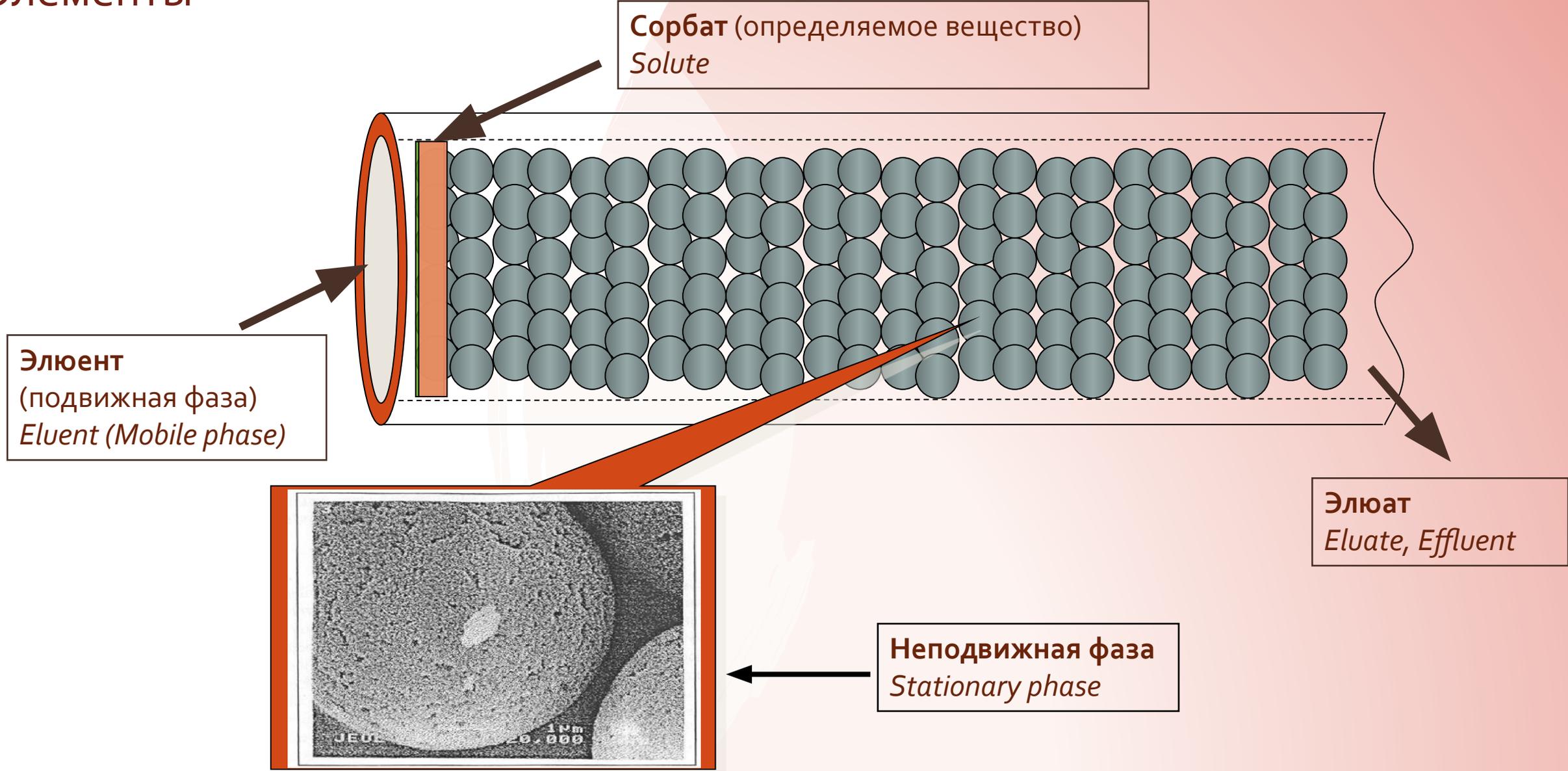
ВАЖНЫЕ ТЕРМИНЫ

1. Корпус (*Housing*)
2. Загрузка (*Bed*)
3. Вход/выход (*Inlet/Outlet*)
4. Набивная (насадочная) колонка
5. Капиллярная колонка с пористым слоем на стенках
6. Открытая капиллярная колонка со слоем неподвижной фазы на стенках

Guard column = предколонка

Колоночная хроматография

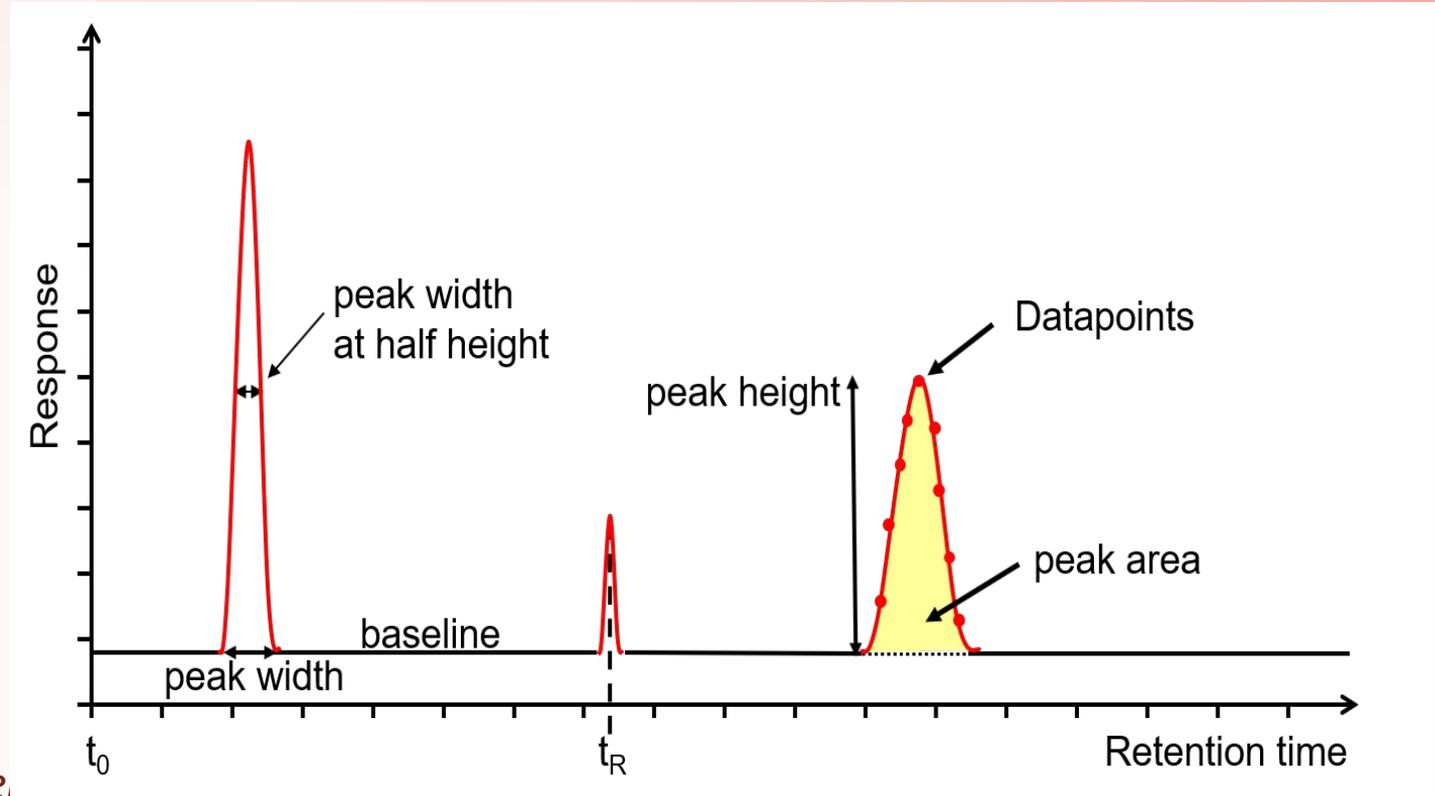
Элементы



Хроматограмма

Chromatogram

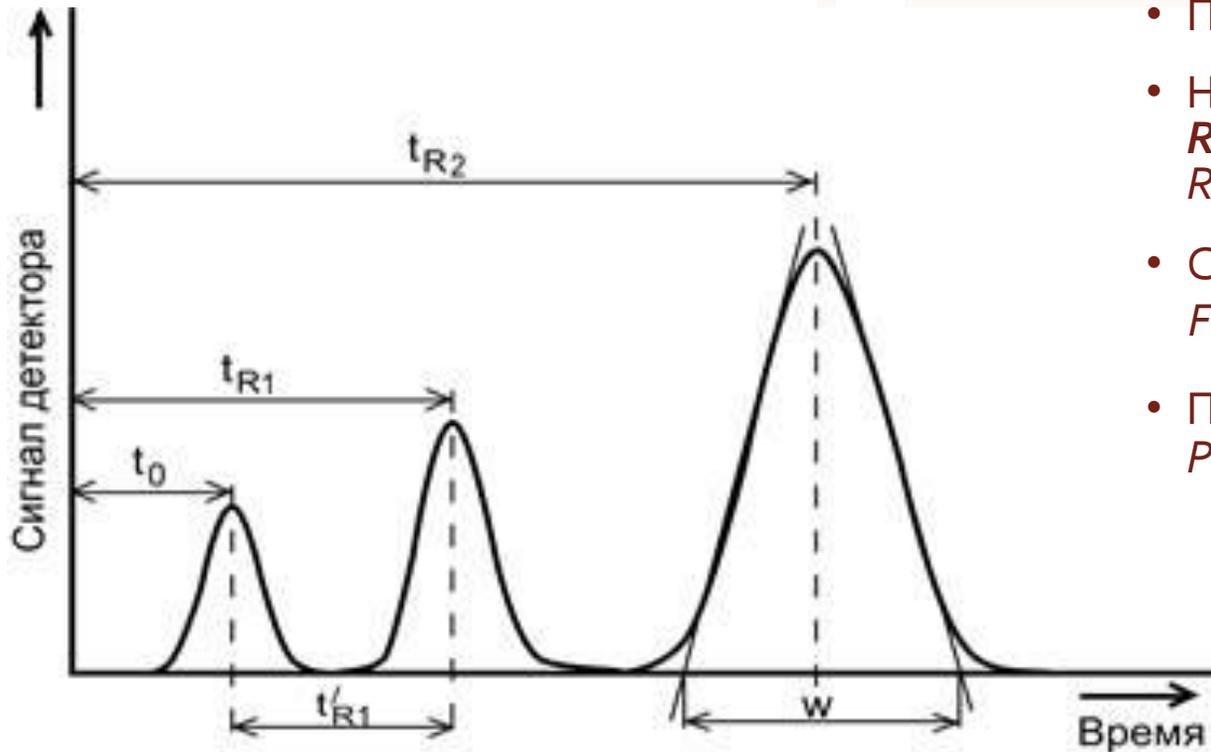
Графическое изображение зависимости сигнала прибора от времени или объема подвижной фазы



- Хроматографический пик = *Peak*
- Базовая (нулевая) линия = *Baseline*
- Высота пика H = *Peak Height*
- Ширина пика = *Peak width*
- Ширина пика у основания W = *Baseline peak width*
- Ширина пика на полувысоте $W_{0,5}$ = *Peak width at half height*
-

Хроматографические параметры. Время удерживания

$$t'_R = t_R - t_0$$

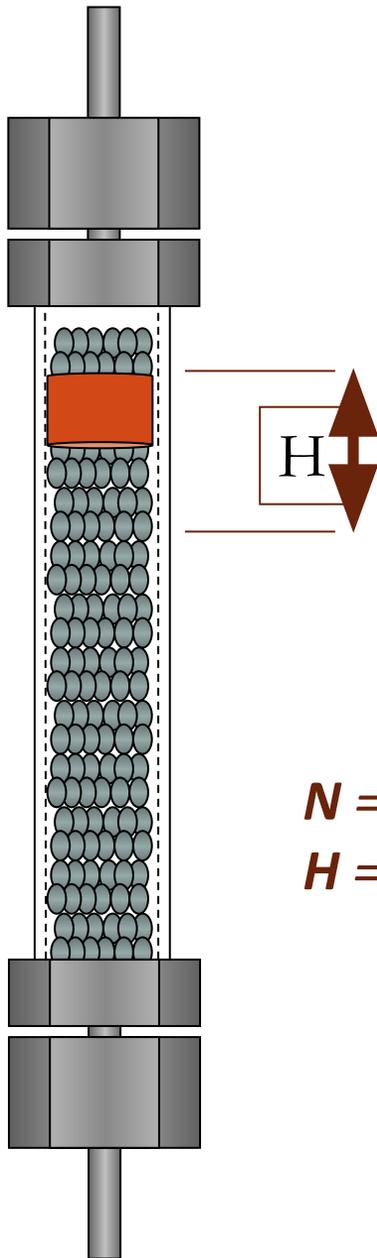


- Время удерживания вещества t_R
Retention time
- Время удерживания несорбирующегося вещества t_0
Void time
- Приведенное (исправленное) время удерживания t'_R
- Нескорректированное относительное время удерживания **RRT**
Relative retention time
- Скорость потока (F)
Flow rate
- Площадь пика **S**
Peak area

Время удерживания = качественный параметр

Площадь пика = количественный параметр

Эффективность разделения. Теория теоретических тарелок



Высота, эквивалентная теоретической тарелке H (ВЭТТ)

Соответствует высоте слоя сорбента, при прохождении которой акт сорбции—десорбции успевает совершиться в среднем один раз

$$N = L / H$$

Число теоретических тарелок N

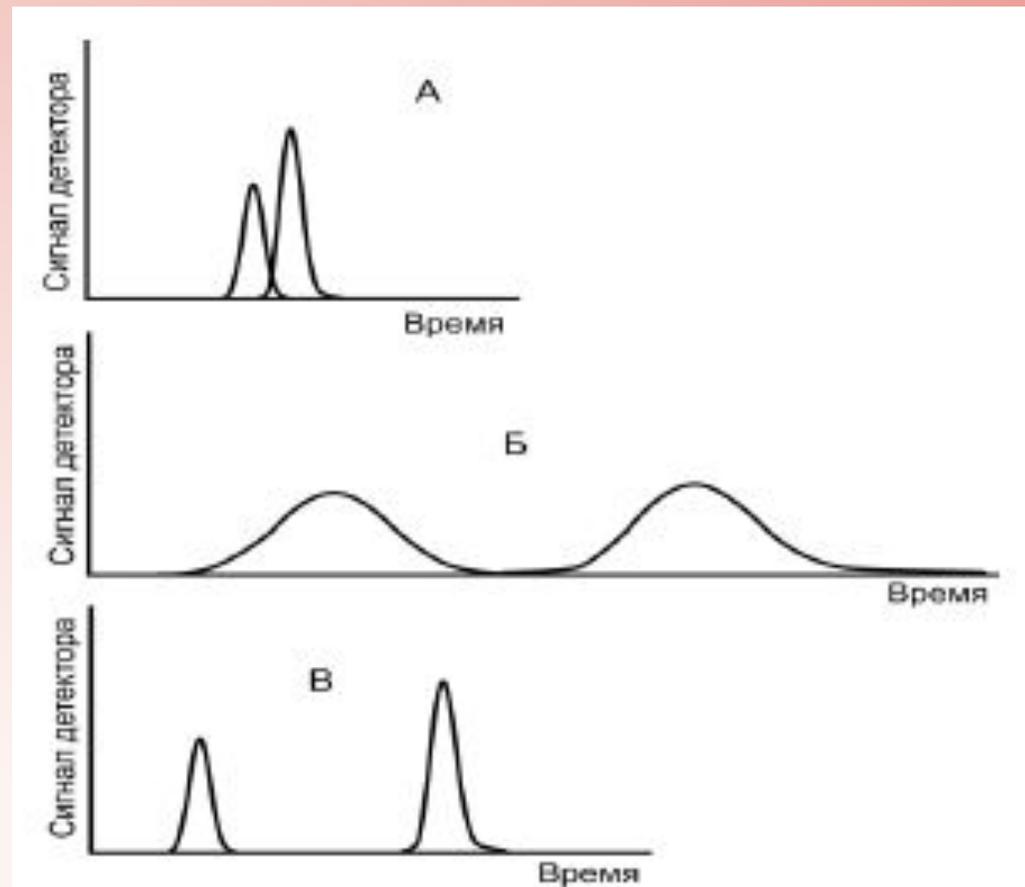
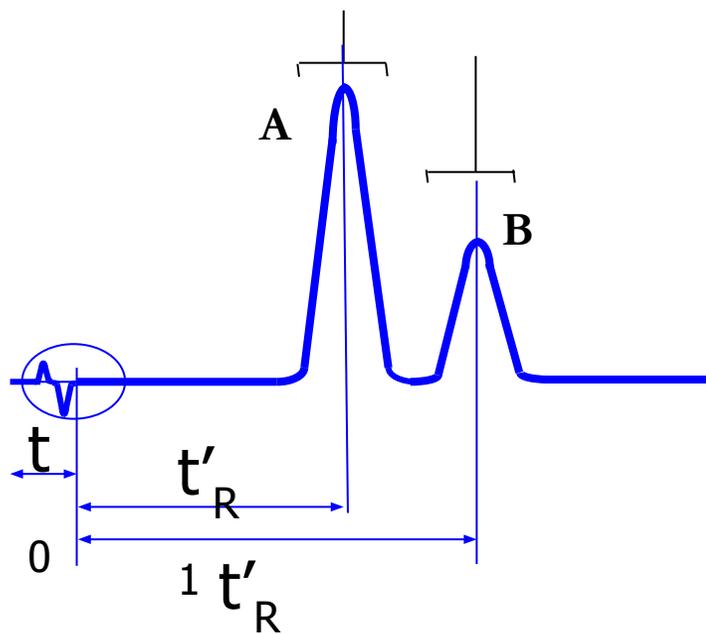
отражает качество использованного сорбента и заполнения колонки

N = number of theoretical plates, plate number, theoretical plates

H = height equivalent to a theoretical plate (HETP)

Селективность и эффективность разделения

Определяется шириной и расположением пиков



Коэффициент селективности, относительное удерживание (α) *Selectivity factor*

Разрешение R_s

Resolution

Отношение максимум/минимум

Отношение «пик-долина», peak-to-valley, p/v

Фактор асимметрии A_s

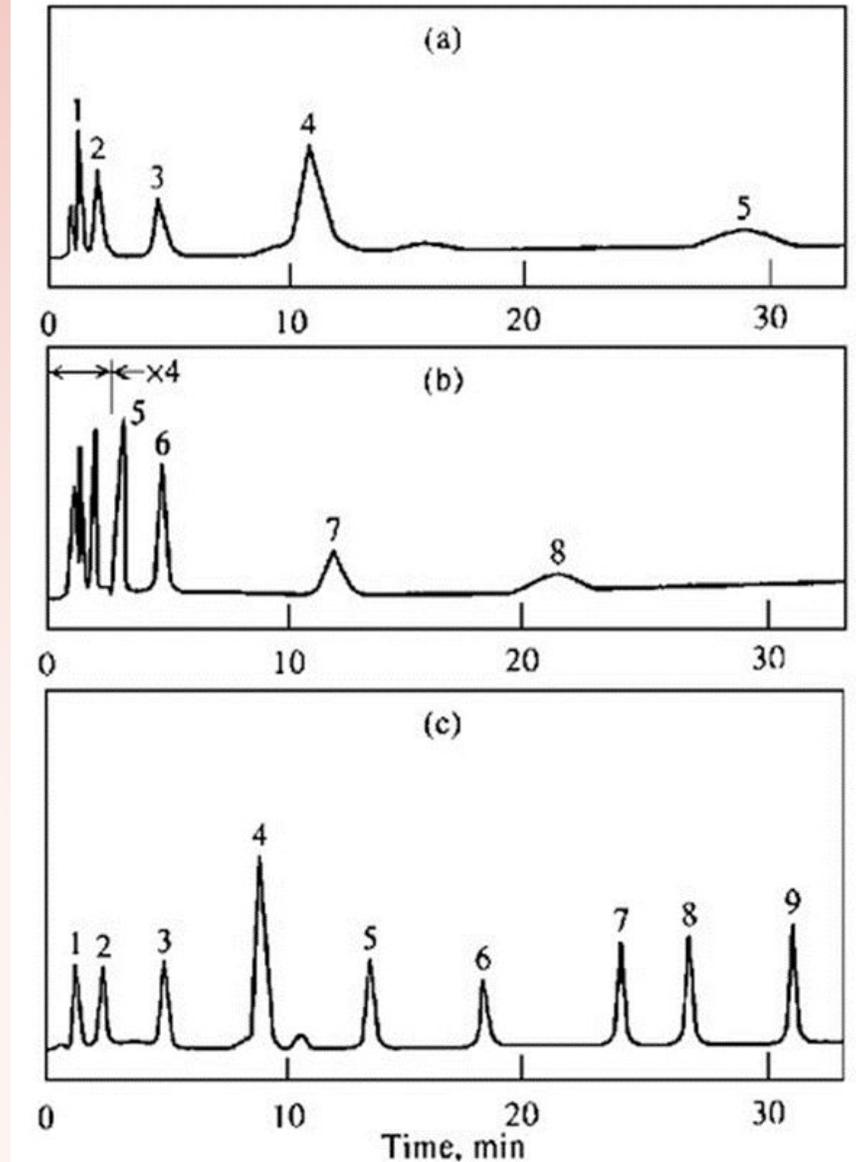
Tailing factor

Пригодность системы *System Suitability*

Часть хроматографической методики

Установление требований к:

- параметрам, характеризующим форму пика (N и A_s)
- разделительной способности (R_s или p/v)
- воспроизводимости значений площади или высоты пиков
- времени удерживания (испытание «Подлинность»)
- чувствительность (испытание «Примеси»)



Перевод аналитических методик. Пригодность системы

Acceptance criteria for SST solution:

- 1) The **resolution** between any two known impurities (or) known impurity and amoxicillin peak should not be less than 2.0.
- 2) **Theoretical plate number** for amoxicillin peak should not be less than 4000.
- 3) **Tailing factor** for the amoxicillin peak should not be more than 2.0

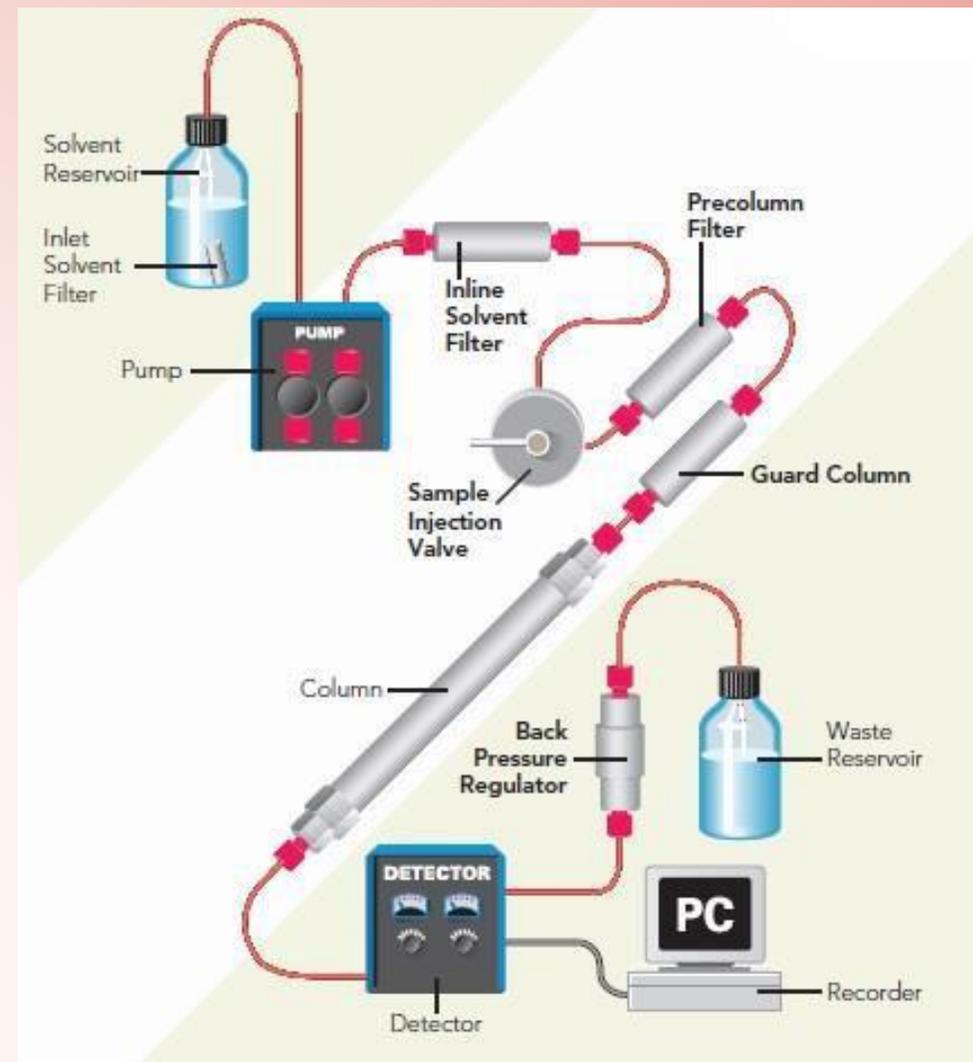
Раствор для проверки пригодности системы = *System suitability solution (SST)*

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

High-performance Liquid Chromatography (HPLC)

ВАЖНЫЕ ТЕРМИНЫ

<i>Pump</i>	= насос
<i>Guard column</i>	= предколонка
<i>Precolumn filter</i>	= предколоночный фильтр
<i>Injector</i>	= устройство ввода пробы
<i>Injection valve</i>	= дозатор для ввода проб
<i>Column</i>	= колонка
<i>Detector</i>	= детектор
<i>Recorder</i>	= регистратор данных (самописец)
<i>Data acquisition system</i>	= система сбора и обработки данных



Детекторы. ВЭЖХ

HPLC Detectors

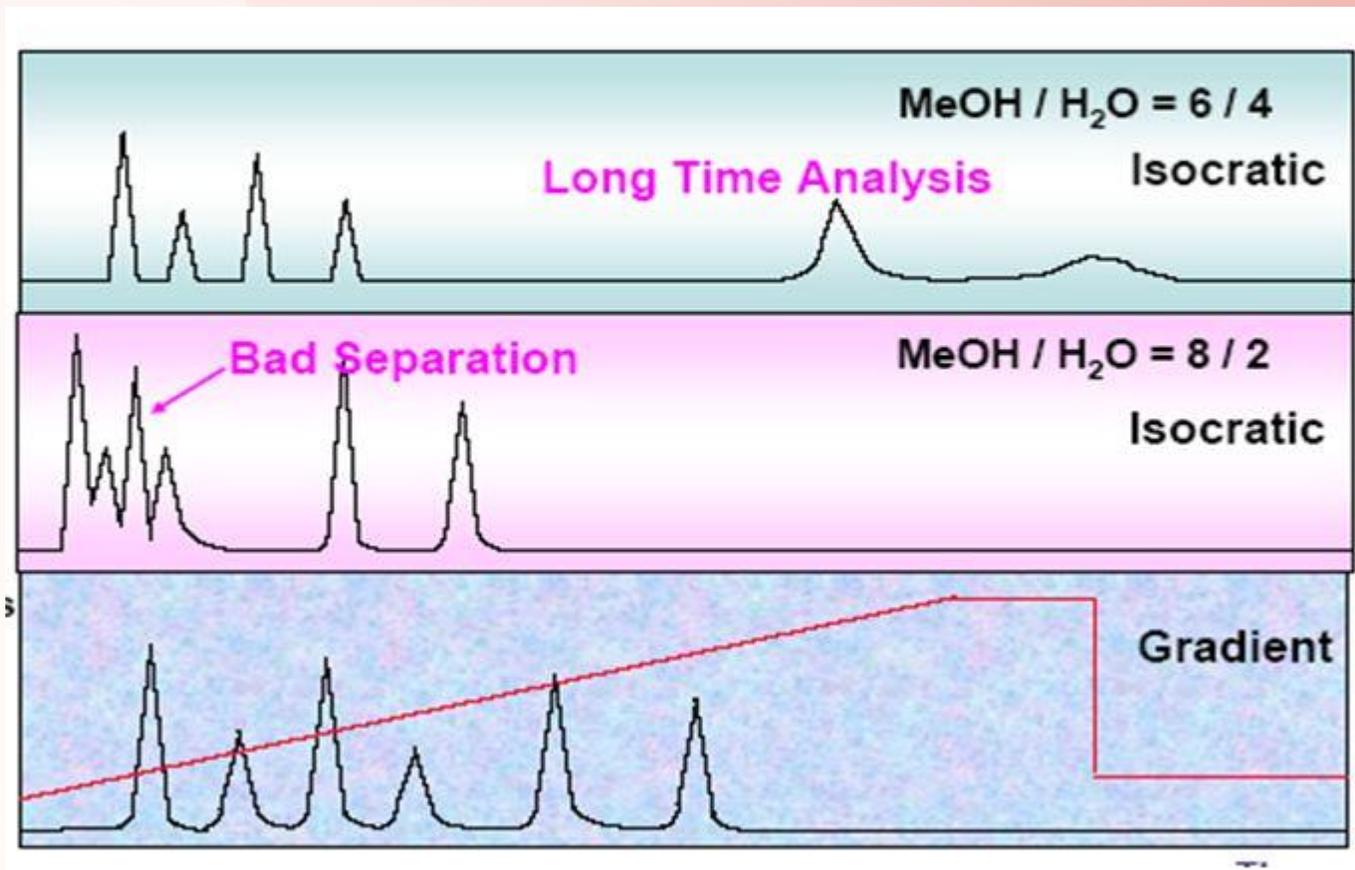
- Матричный фотодиодный детектор (диодно-матричный)
Photo-diode array detector (PDA)/Diode array detector (DAD)
- Ультрафиолетовый детектор
UV-detector
- Флуориметрический детектор
Fluorescence detector
- Рефрактометрический детектор
Refractive index detector (RID)
- Кондуктометрический детектор
Conductivity detector

Важные параметры детектора:

- предел обнаружения = *Limit of Detection*
- линейный диапазон = *Linear range*

ВЭЖХ. Типы элюирования

- Изократическое элюирование
Isocratic elution
- Градиентное элюирование
Gradient elution



Нормально-фазовая/обращенно-фазовая ВЭЖХ

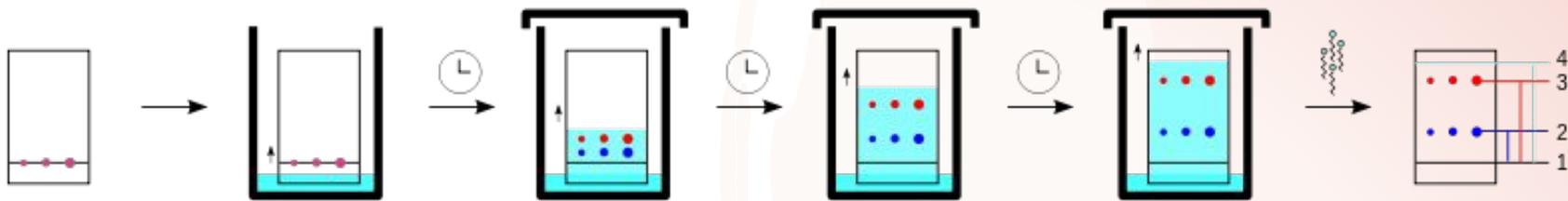
Normal Phase/Reverse Phase HPLC



Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Thin-layer Chromatography

1. Подготовка пластинки
2. Нанесение
3. Хроматографирование
4. Анализ



Фактор удерживания R_f
(коэффициент замедления)

Подложка

Пластинка

Диоксид кремния, силикагель

Сорбент

= *Retention factor*

= *Support*

= *Plate*

= *Silica (Silica gel)*

= *Coating substance*

1



2



4



Перевод аналитических методик. ТСХ

Related substances.

Analyze by thin-layer chromatography, using silica gel as the coating substance.

Test solution.

Dissolve 1.0 g of the substance to be examined in ethyl alcohol and dilute to 100 ml with the same solvent.

Reference solution.

Dilute 0.5 ml of the test solution to 100 ml with ethyl alcohol. **Apply** to the **plate** 20 μ l of each solution. Develop over a path of 15 cm using a mixture of 20 volumes of ethyl alcohol and 80 volumes of chloroform.

Spray with visualisation reagent. Heat at 100 °C to 105 °C for 5 min and examine immediately in ultraviolet light at 254 nm. When examine in ultraviolet light and after spraying, any spot in the chromatogram obtained with the test solution, apart from the **principal spot**, is not more intense than the spot in the chromatogram obtained with the reference solution.

Газовая хроматография (ГХ)

Gas Chromatography

Метод для разделения и определения летучих соединений

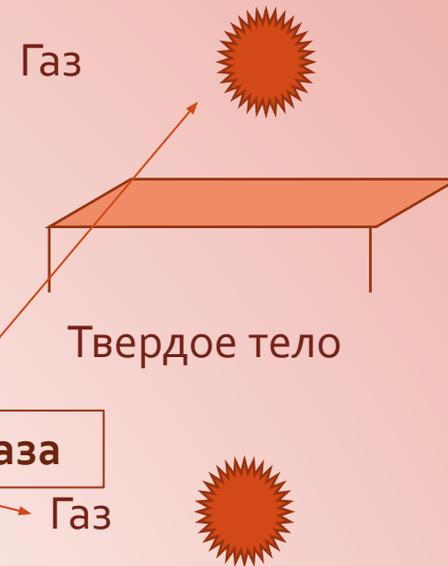


- экспрессность
- определение многокомпонентных смесей
- разделение смесей

Неподвижная фаза

Подвижная фаза

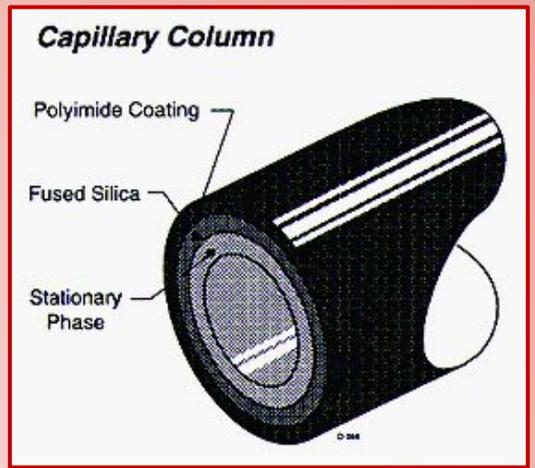
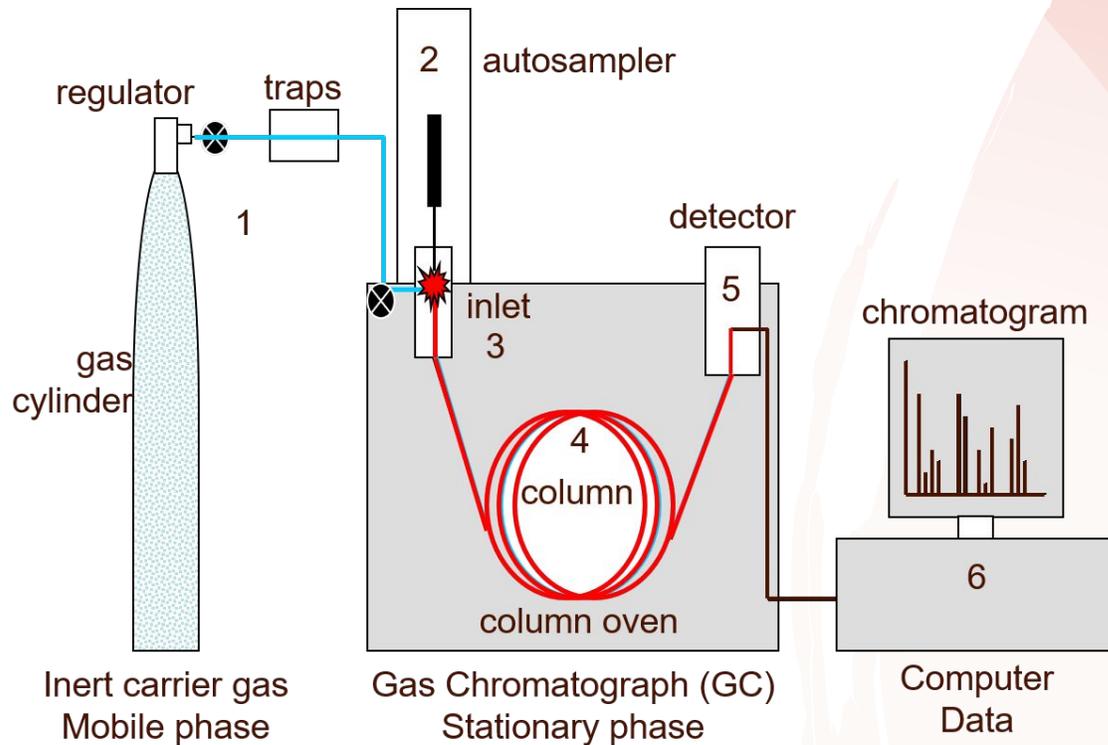
- Газоадсорбционная хроматография



- Газожидкостная хроматография

Газовая хроматография (ГХ)

Gas Chromatography (GC)



Важные термины

- Carrier gas* = газ-носитель
- Gas regulator* = регулятор тока газа
- Trap* = ловушка
- Autosampler* = автоматический пробоотборник
- Column* = колонка
- Column oven* = термостат колонок
- Detector* = детектор
- Column inlet* = вход в колонку
- Fused silica column* = кварцевая капиллярная колонка
- Head-space* = парофазный анализ
- Fused silica* = плавленный кварц

Газовая хроматография/масс-спектрометрия *Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)*

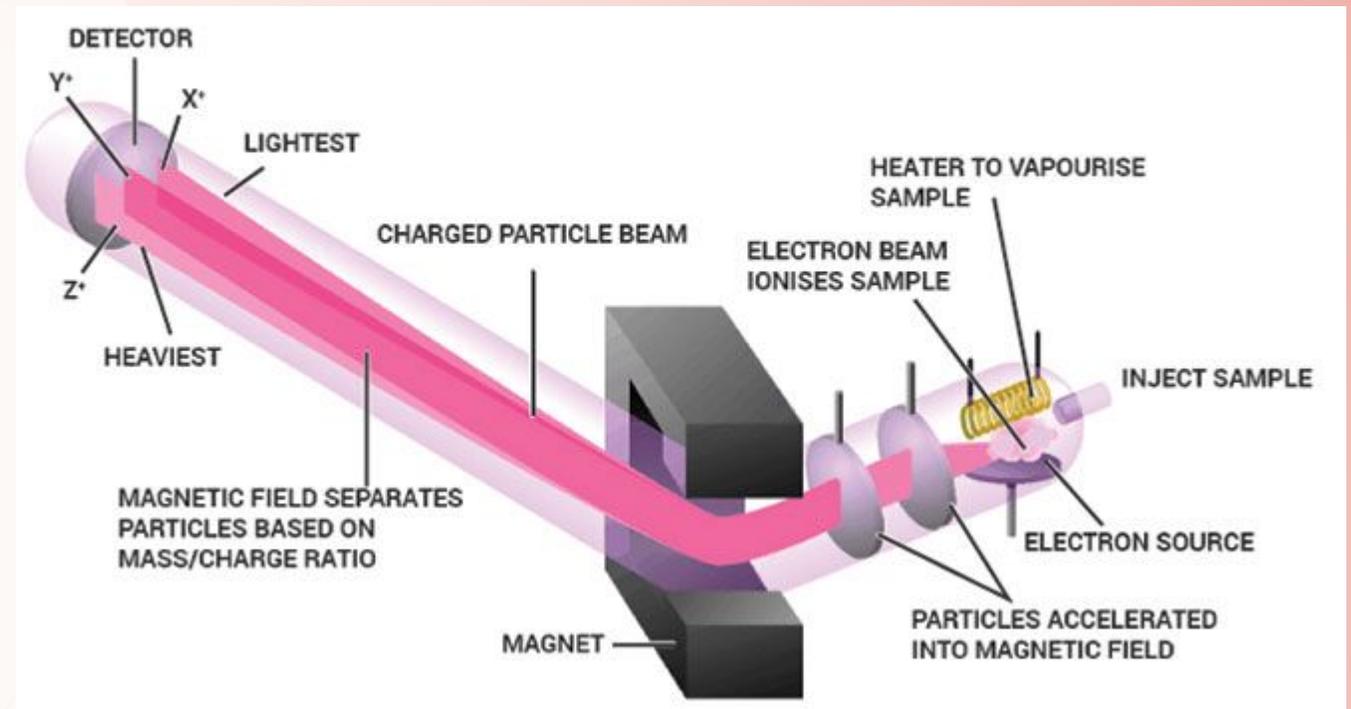
Высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (ВЭЖХ/МС) *High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (HPLC/MS)*

Один из важнейших методов качественного анализа

ПРИНЦИП

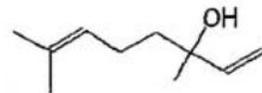
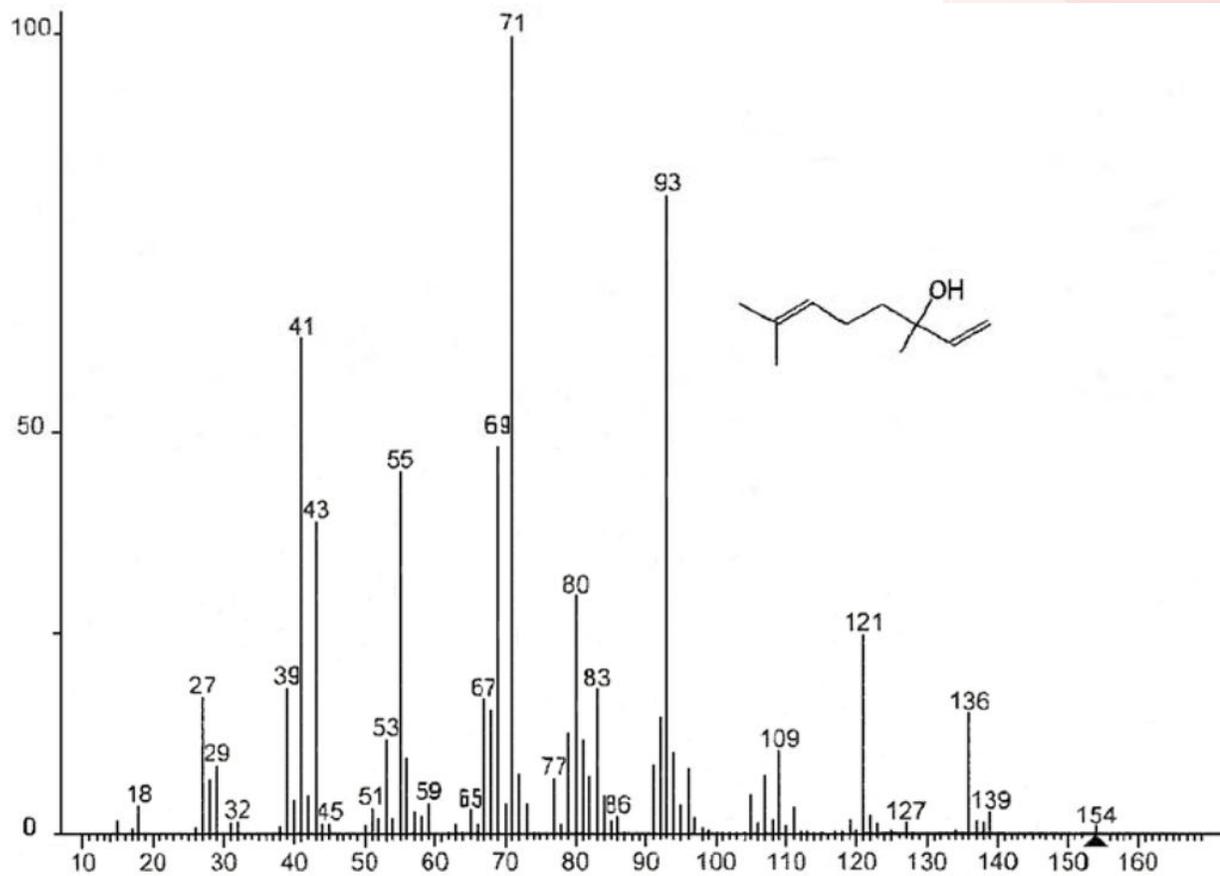
Детектирование по отношению
массы иона к заряду m/z

Ионизация вещества и
взвешивание полученных частиц
при помощи специального детектора



Масс-спектр

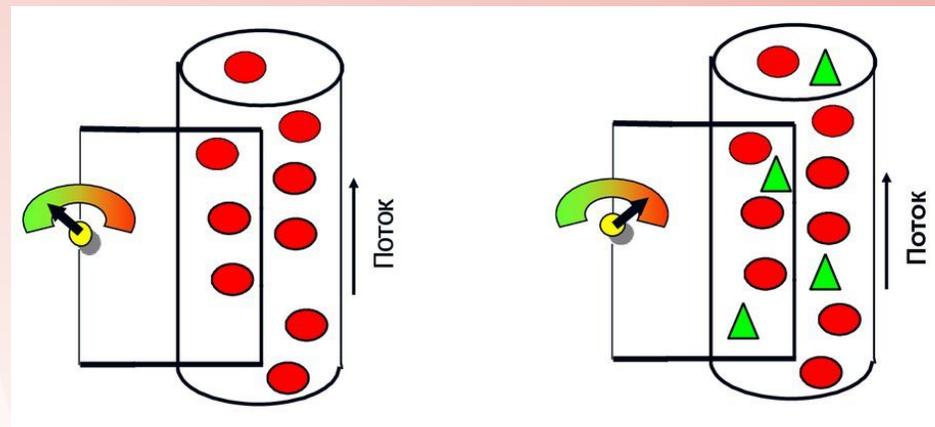
Mass-spectrum



Детекторы. Газовая хроматография

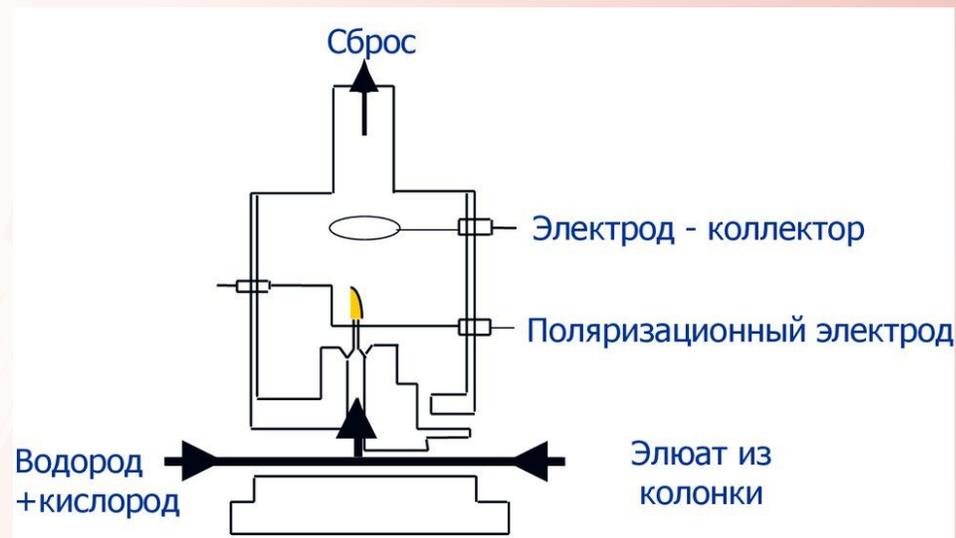
Катарометр (по теплопроводности) *Thermal conductivity detector (TCD)*

Изменение теплопроводности при прохождении элюирующей зоны вещества



Пламенно-ионизационный (ПИД) *Flame Ionization Detector (FID)*

Высокотемпературное пламя ионизует компоненты образца, элюирующегося из колонки.
Ионы поступают на электрод, увеличивая ток.
Ток регистрируется



Перевод хроматографических методик. Название колонки



Eclipse Plus C18, 2.1 × 5 mm, 1.8 μm



Колонка Eclipse Plus C18, размеры 2,1 × 5 мм, размер частиц 1,8 мкм

PROCEDURE:

1 1.0 TYPICAL CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS FOR RELATED SUBSTANCES BY HPLC METHOD

Apparatus	A liquid chromatograph is equipped with variable wavelength PDA- Detector
Column	Symmetry Shield RP18, 250 x 4.6 mm, 5 µm or equivalent. 2 [Make/Part No: Waters /12345]
Flow Rate	1.0 ml/minute 3
Wavelength	210 nm
Temperature	25°C
4 Load	5 µl
5 Run time	48 minutes
Diluent	Acetonitrile
6 Elution	Gradient
7 Needle wash	Diluent
Buffer	First filter 1000 ml of Milli-Q-water through 0.45 µm nylon filter paper and add 1.0 ml of hydrochloric acid (33%). Mix well and sonicate to degas.
Mobile phase A	Buffer (100%)
Mobile phase A	Acetonitrile : water (95 : 05, v/v)



Контакты преподавателя:

Анна Трифонова

+ 375 44 729 46 84

a.trifonova@pharmconsult.org

www.pharmconsult.org

СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!