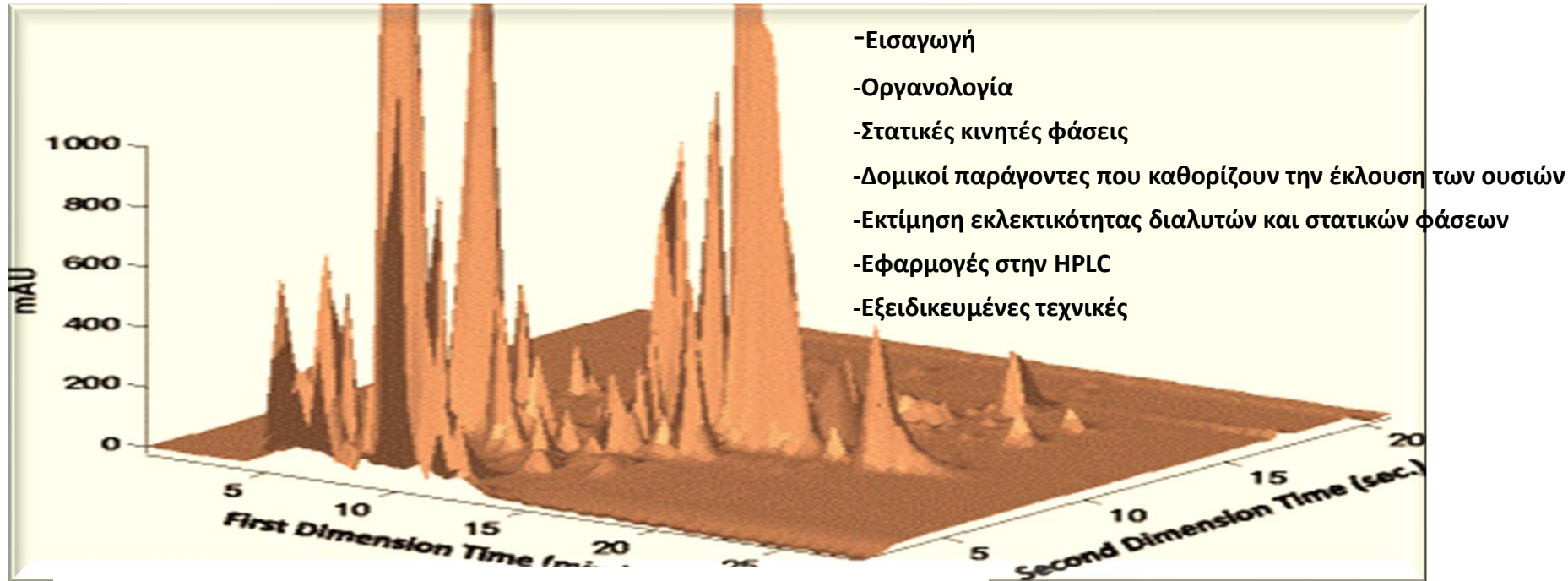


Θεωρία Χρωματογραφίας



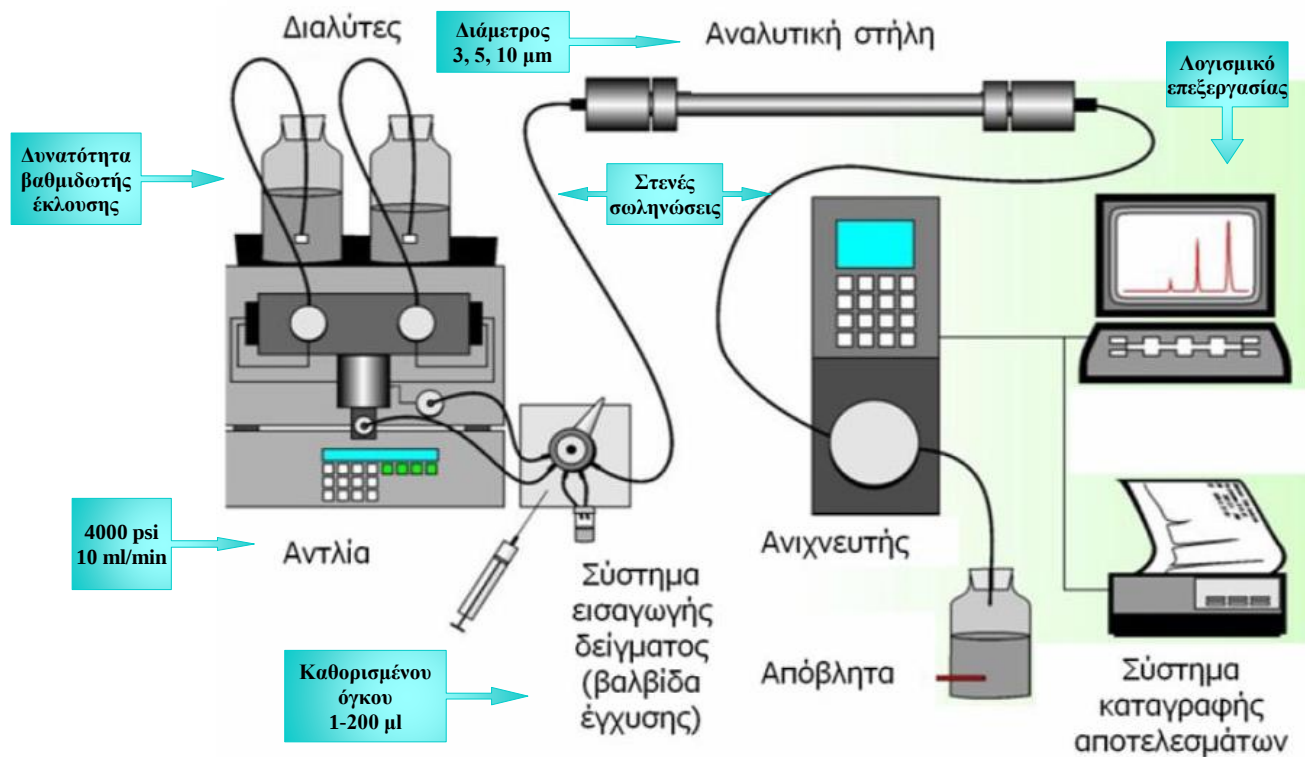
Δρ. Μαρκοπούλου Αικατερίνη

καθηγήτρια Φαρμ. Ανάλυσης, ΑΠΘ

Διευθύντρια. Εργαστηρίου Φαρμ. Ανάλυσης, Τμήμα Φαρμακευτικής

Διευθύντρια Μεταπτυχιακού «Βιομηχανική Φαρμακευτική»

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ



ОРГАНОЛОГІА



Στατική Φάση

Προσδιοριζόμενη
Ουσία

Κινητή Φάση

“Καρδιά” της HPLC



✓ Ανοξείδωτο χάλυβα

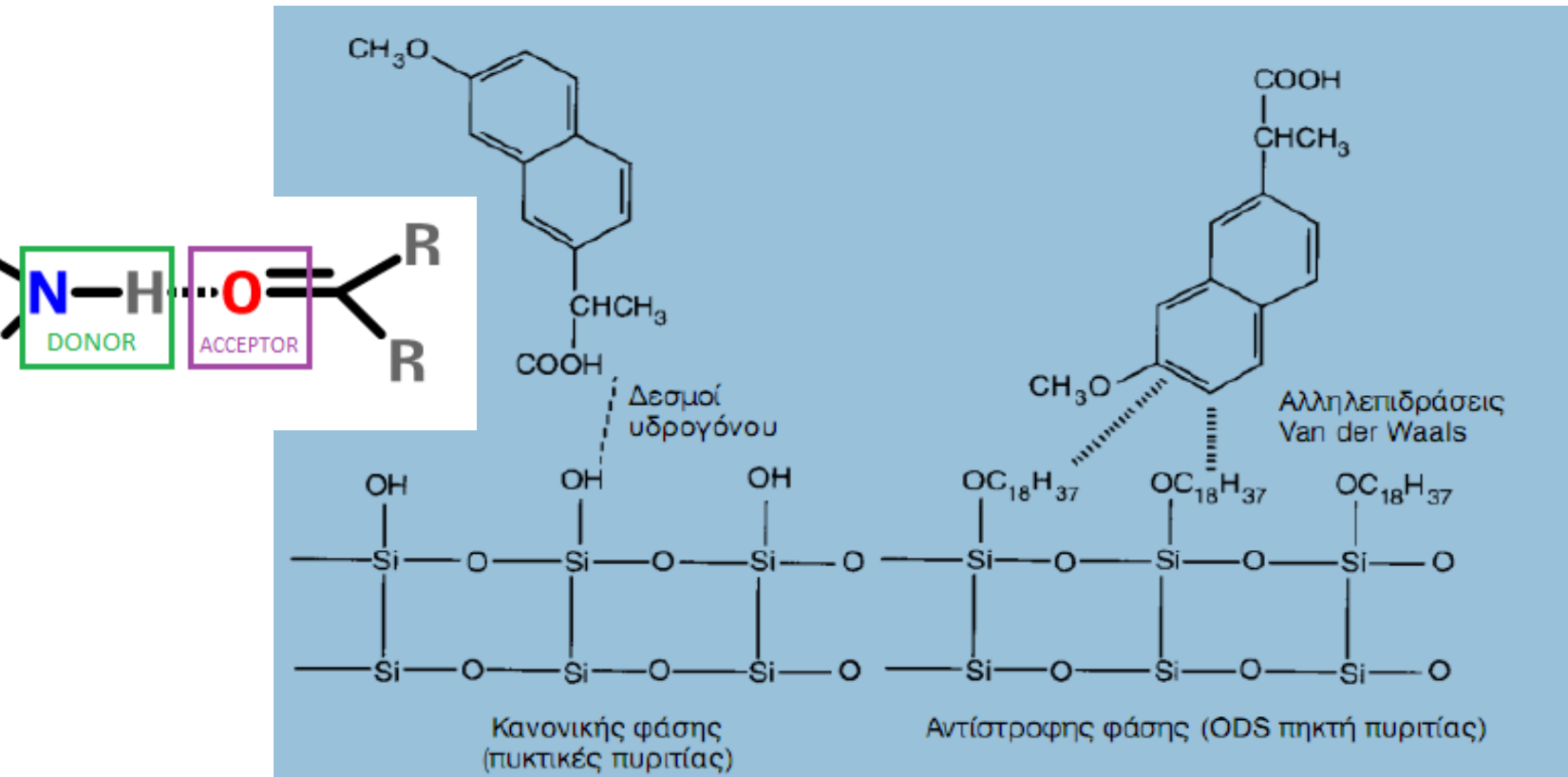
✓ Ποικιλία υλικών πλήρωσης

✓ Μήκος 10 έως 30 cm

✓ Εσωτερική διάμετρος
4 έως 10 mm

✓ Διάμετρος σωματιδίων
πλήρωσης 1 έως 10 μm

Αλληλεπίδραση προσδιοριζόμενων ουσιών με τις επιφάνειες των υλικών πλήρωσης



Μορφή υλικών πλήρωσης

Random sphere packing



Nonporous particle



Porous layer



Completely porous

Monolithic structure



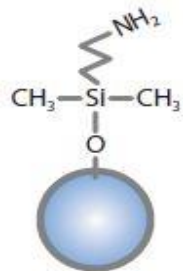
Nonporous skeleton



Porous skeleton

πορώδεις δομές ράβδων υψηλής διαπερατότητας

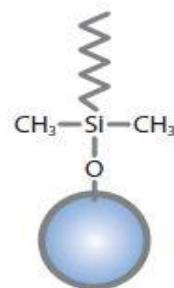
Χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις



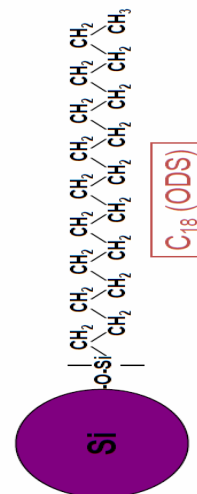
Amino



Silica



C8



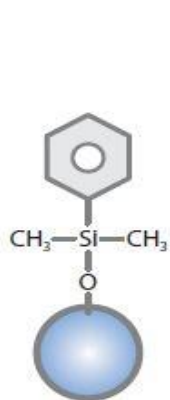
Si



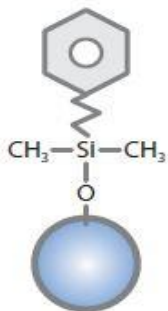
X3

Κανονικής φάσης

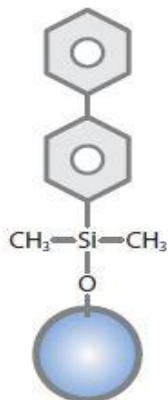
Αντίστροφης φάσης



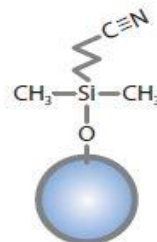
Phenyl



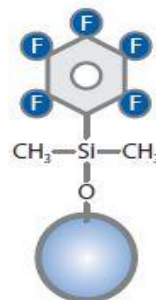
Phenyl Propyl



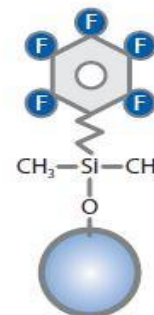
Biphenyl



Cyano



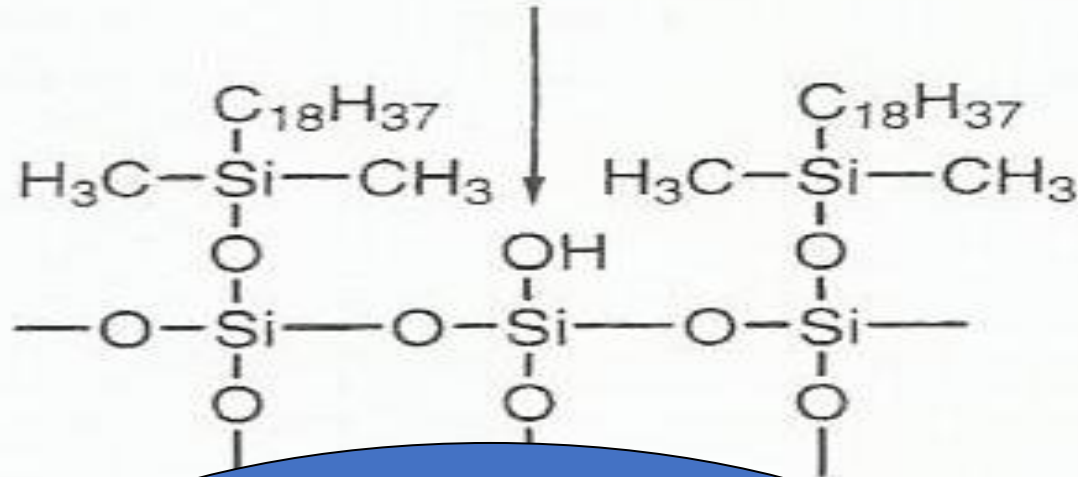
PFP



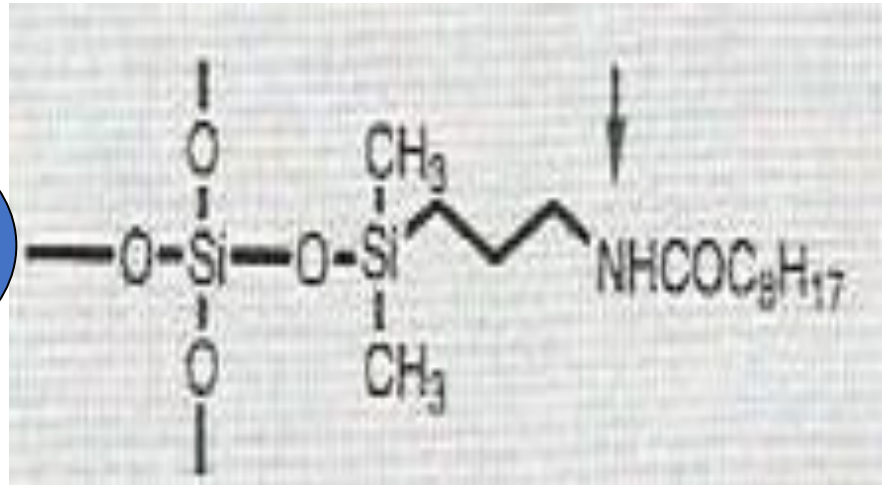
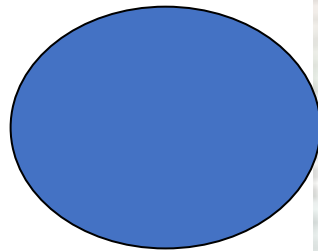
PFP Propyl

Χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις

Μη επικαλυμμένη σιλανόλη



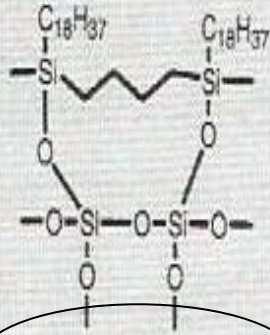
Χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις



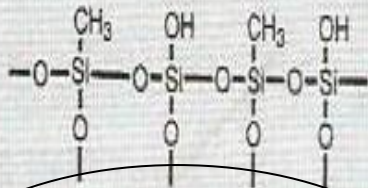
Ενσωματωμένες πολικές ενώσεις αυξάνουν τη διείσδυση του ύδατος στη στατική φάση, μέσω της ικανότητάς του να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με ομάδες, όπως τα αμίδια. Αυτές οι στατικές φάσεις παρέχουν ισχυρότερη κατακράτηση πολικών αναλυτών.

Προηγμένη εκτίμηση στατικών φάσεων αντίστροφης φάσης ΟΧΙ

Χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις

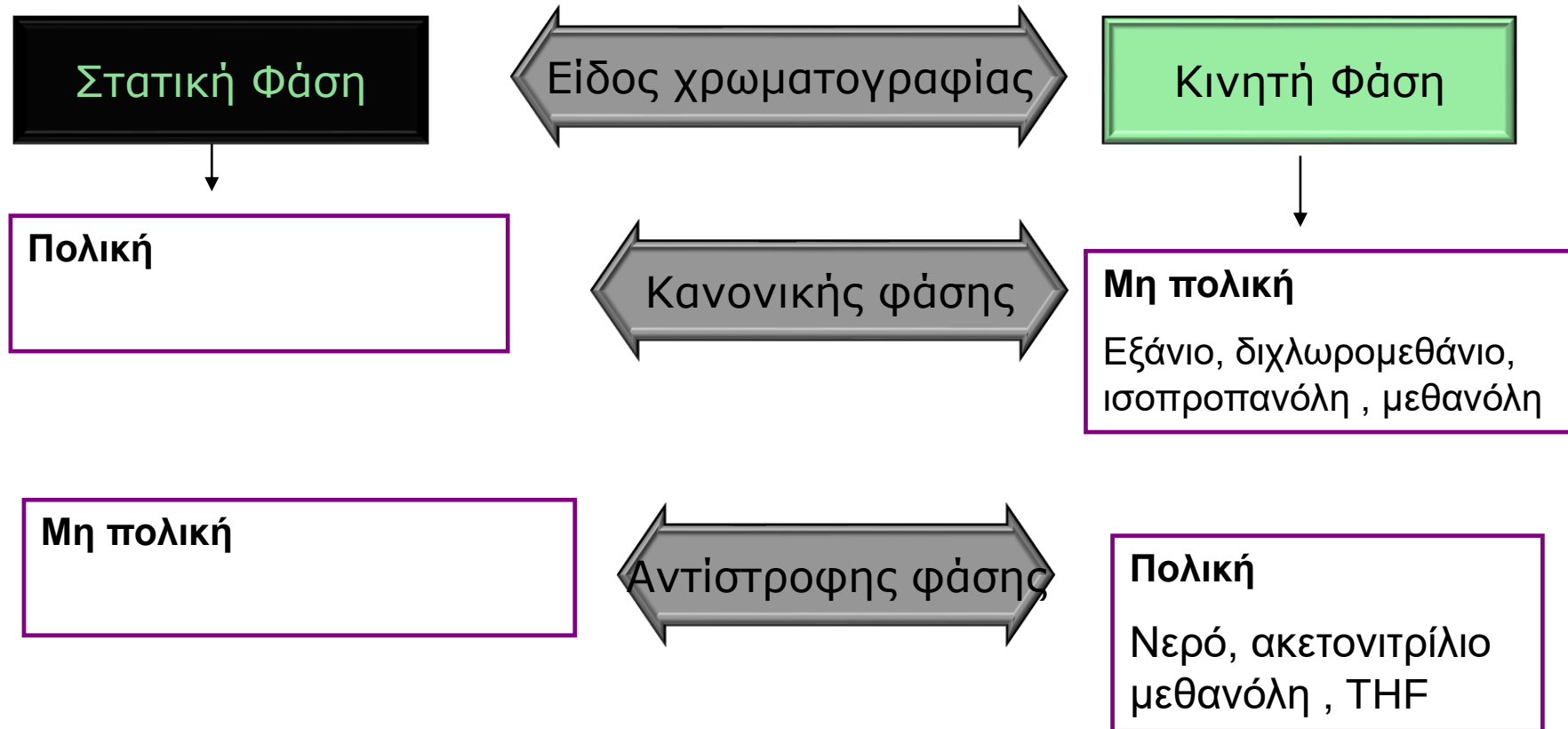


Αλλαγμένη σύνδεση, όπως δισχιδής υποκαταστάτης προκαλεί μεγαλύτερη απενεργοποίηση και σταθερότητα έτσι, ώστε η στατική φάση να μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι pH 11,0



Σωματίδια της βάσεως πηκτής πυριτίας μπορούν να κατασκευαστούν να περιέχουν αλκυλομάδες που κάνουν μια πιο αδρανή και σταθερή πηκτή.

Είδη χρωματογραφίας Βάση πολικότητας κινητής στατικής φάσης φάσης



Εκλουστική ισχύ διαλυτών κινητής φάσης

**ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ
ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ**

ασθενής



ισχυρός

ΔΙΑΛΥΤΗΣ

εξάνιο
τολουόλιο
τριχλωρομεθάνιο
διχλωρομεθάνιο
αιθέρας
οξικός αιθυλεστέρας
ακετονιτρίλιο
μεθανόλη
νερό

**ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ
ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ**

ισχυρός



ασθενής

Ουσίες που προσδιορίζονται με HPLC αντιστρόφου φάσης

Μελετώμενες ουσίες

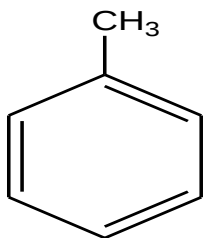
Ουδέτερες

Όξινες ομάδες

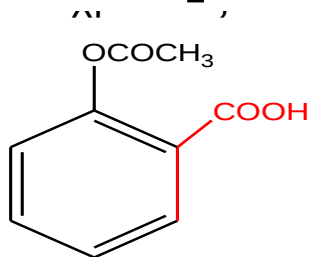
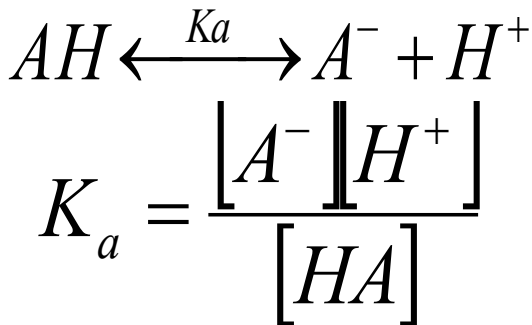
Βασικές ομάδες

Όξινες + Βασικές ομάδες

0% ιονισμός, άρα δεν παρατηρούνται μεταβολές στους χρόνους κατακράτησης με την μεταβολή του pH

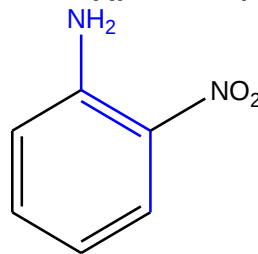


toluene



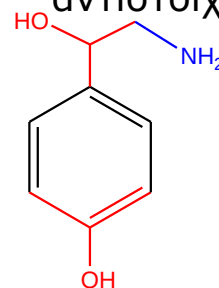
acetylsalicylic acid

Ιονίζονται σε όξινο περιβάλλον, σε ποσοστό ανάλογο της τιμής pKa και εκκλύονται σε μικρότερους χρόνους



o-nitroaniline

Ανάλογα με το περιβάλλον (όξινο ή αλκαλικό) και με τις pKa τιμές ιονίζονται είτε οι όξινες είτε οι βασικές ομάδες αντίστοιχα



D,L-octopamine

Εξίσωση Henderson -Hasselbach

$$\text{Οξύ: \%ιοντισμός} = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}_a}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}_a}} \times 100 \quad (1)$$

Τα οξέα ιονίζονται σε βασικό περιβάλλον σε τιμές $\text{pH} \geq \text{pK}_a$ ($\text{pH} = \text{pK}_a$ 50%ionization)

Όσο μικρότερη η τιμή pK_a ενός οξέος τόσο ισχυρότερο είναι

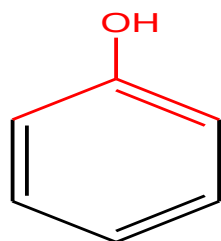
$$\text{Βάση: \%ιοντισμός} = \frac{10^{\text{pK}_a-\text{pH}}}{1 + 10^{\text{pK}_a-\text{pH}}} \times 100 \quad (2)$$

Οι βάσεις ιονίζονται σε όξινο περιβάλλον σε τιμές $\text{pH} \leq \text{pK}_a$ ($\text{pH} = \text{pK}_a$ 50%ionization)

Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή pK_a μίας βάσεως τόσο ισχυρότερη είναι

Acidic compounds with 0% ionization							
Substance	pKa	0% ionization		tr phenyl 40%MeOH		tr C4 40%MeOH	
		pH 2.3	pH 6.2	(HCl)	(NH ₃)	(HCl)	(NH ₃)
phenol	9.92	0.00	0.00	4.191	4.235	3.946	3.912
ethanophenone	18.41	0.00	0.00	7.269	7.265	5.400	5.320
benzaldehyde	14.92	0.00	0.00	5.996	5.997	4.643	4.581
1 naphthol	9.92	0.00	0.00	12.865	12.746	9.675	9.268
2 naphthol	9.92	0.00	0.00	11.842	11.766	8.579	8.420
prednisolone acetate 1	14.29	0.00	0.00	49.211	48.595	24.328	23.944
prednisolone 1	14.27	0.00	0.00	24.328	23.785	13.553	13.220
testosterone	16.18	0.00	0.00	>300	>300	230.660	222.010
progesterone	19.28	0.00	0.00	276.990	274.210	98.910	96.262
methyl testosterone	15.55	0.00	0.00	129.211	128.232	57.013	56.029
estrone	10.61	0.00	0.00	63.200	63.290	27.676	27.609
nicotinamide	17.8	0.00	0.00	2.266	2.327	2.154	2.278
isoniazid	11.88	0.00	0.00	2.235	2.236	2.101	2.214
paracetamol	9.65	0.00	0.00	2.470	2.491	2.352	2.353
phenacetine	18.83	0.00	0.00	6.246	6.298	4.818	4.787
metronidazole	14.84	0.00	0.00	3.218	3.335	2.474	2.543
salicin	14.61	0.00	0.00	2.547	2.623	2.327	2.331
thiocolchicoside1	12.58	0.00	0.00	6.534	6.560	3.218	3.251
digitoxin1	13.77	0.00	0.00	>400	>400	315.370	315.000
cortisol1	16.57	0.00	0.00	22.952	23.571	12.894	12.414

Acidic compounds with 0% ionization					
Substance	pKa	0% ionization		tr phenyl 40%MeOH	
		pH 2.3	pH 6.2	(HCl)	(NH ₃)
phenol	9.92	0.00	0.00	4.191	4.235
ethanophenone	18.41	0.00	0.00	7.269	7.265
benzaldehyde	14.92	0.00	0.00	5.996	5.997
1 naphthol	9.92	0.00	0.00	12.865	12.746
2 naphthol	9.92	0.00	0.00	11.842	11.766

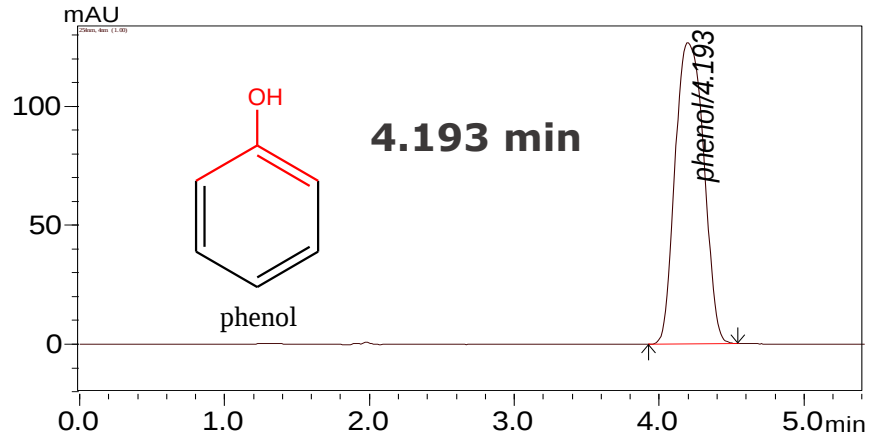


phenol

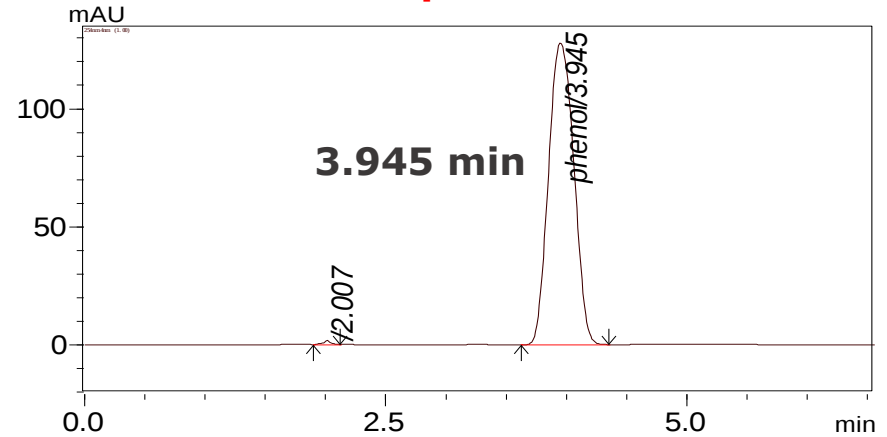
Phenyl Στήλη

pKa=10

pH 2.3



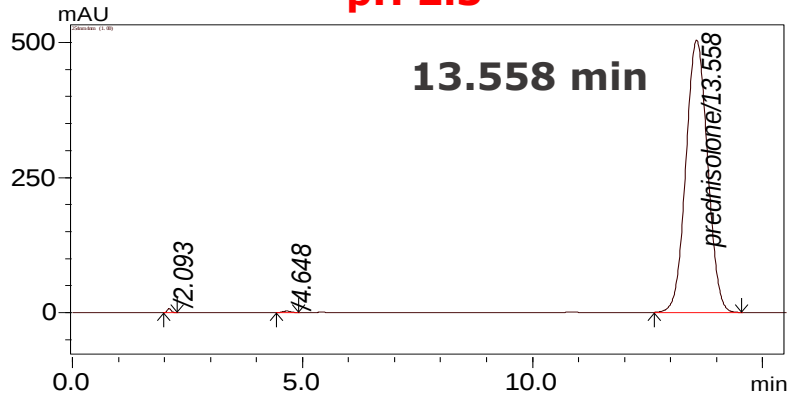
pH 6.2



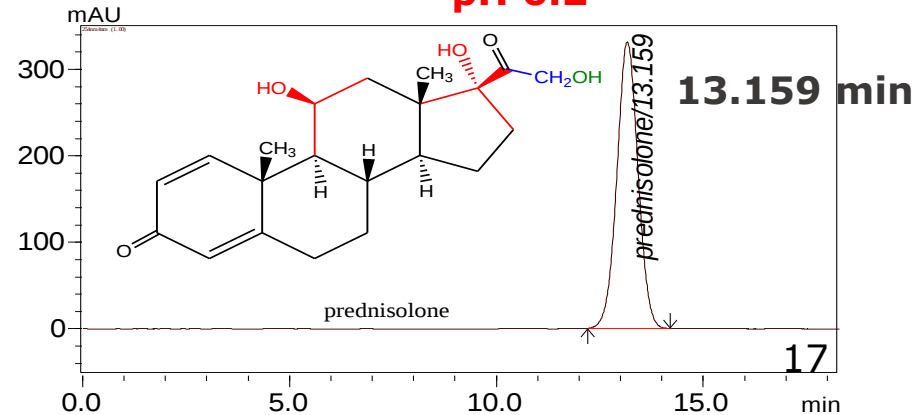
C4 Στήλη

pKa=14

pH 2.3



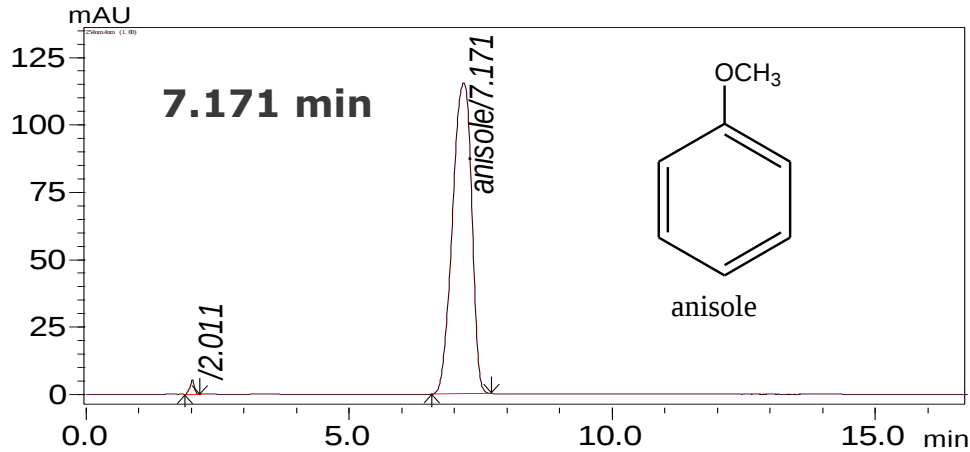
pH 6.2



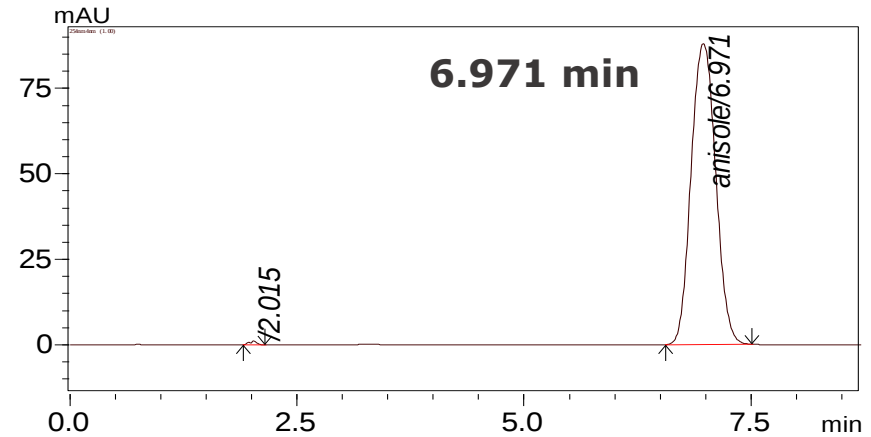
Retention times of neutral molecules

C4 Στήλη

pH 2.3

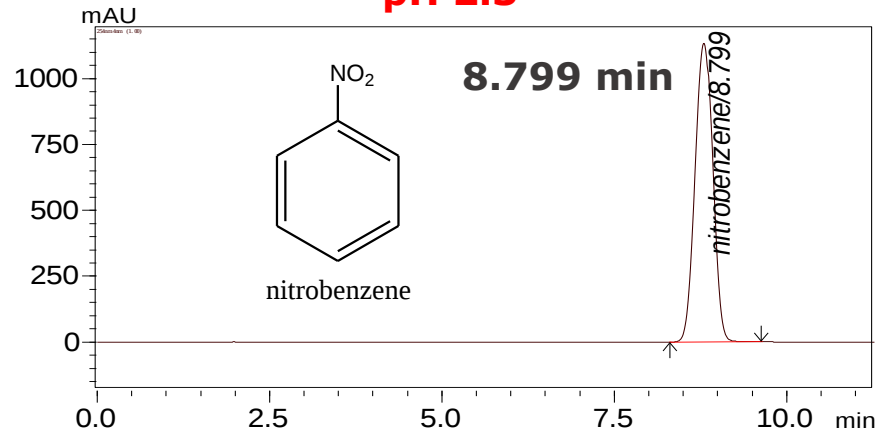


pH 6.2

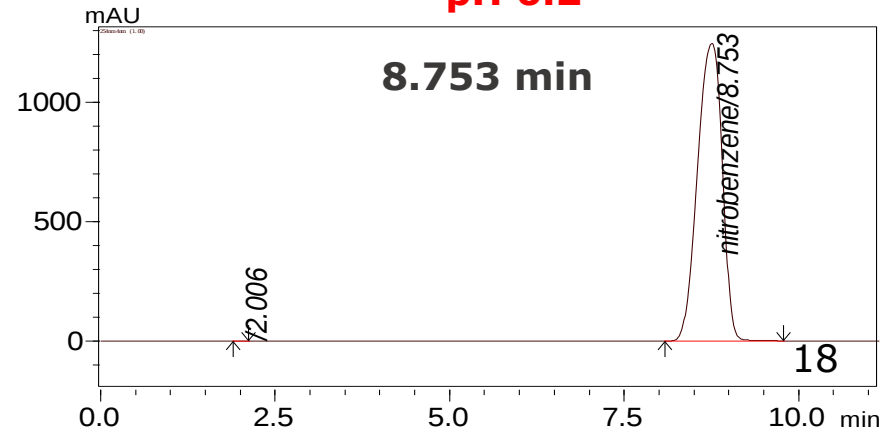


Phenyl Στήλη

pH 2.3



pH 6.2



Λιποφιλικότητα / Υδροφιλικότητα προσδιοριζόμενων ουσιών



Ουδέτερα Μόρια

$$P = \frac{[C_u]_o}{[C_u]_w}$$

Συντελεστής μερισμού

Ιονισμένα Μόρια

$$P_{app} \text{ ή } D = \frac{[C_i]_o + [C_u]_o}{[C_i]_w + [C_u]_w}$$

Φαινομενικός συντελεστής μερισμού

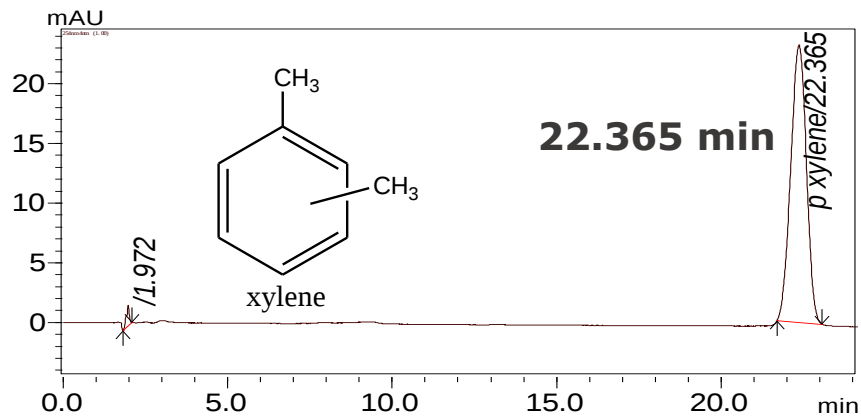
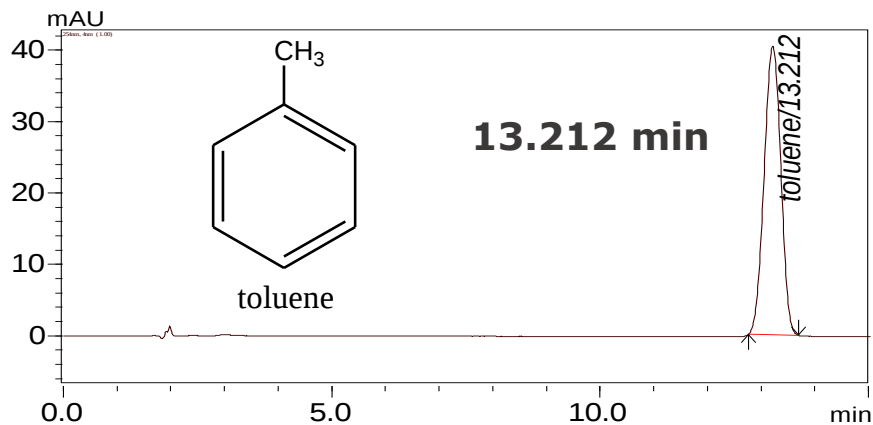
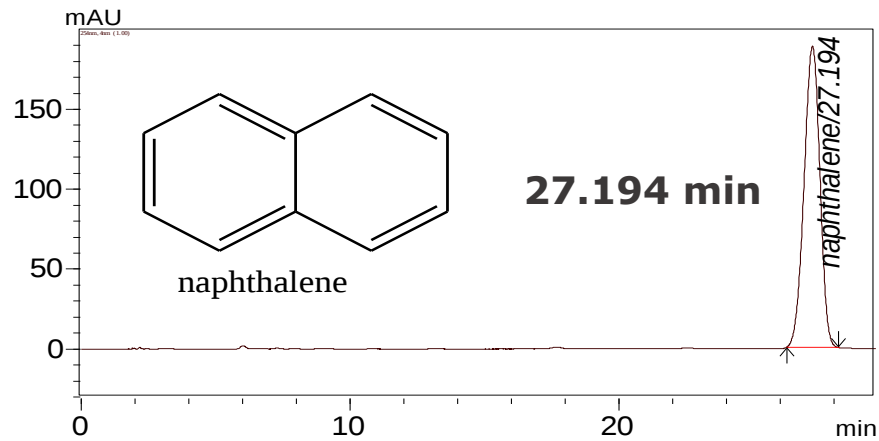
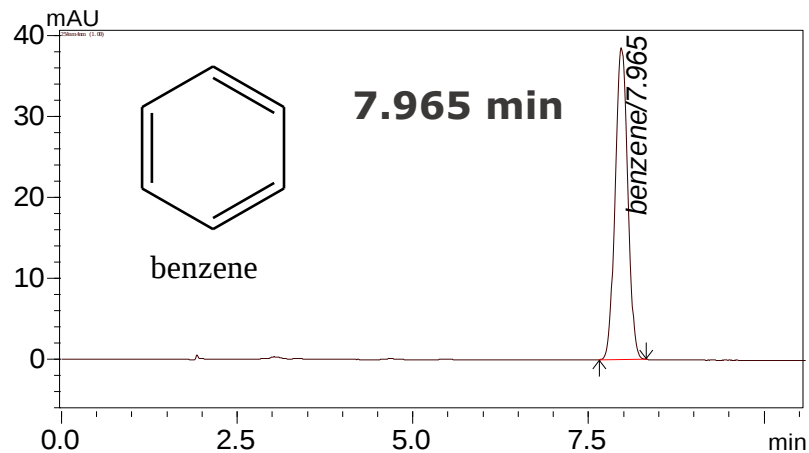
Οξέα : $D = \frac{P}{1 + 10^{pH - pK_a}}$ ή $\text{Log } D = \text{Log } P - \text{Log } [1 + 10^{pH - pK_a}]$

Βάσεις : $D = \frac{P}{1 + 10^{pK_a - pH}}$ ή $\text{Log } D = \text{Log } P - \text{Log } [1 + 10^{pK_a - pH}]$

$$P_{\text{naph}} > P_{\text{benz}}$$

Phenyl Column

pH 2.3

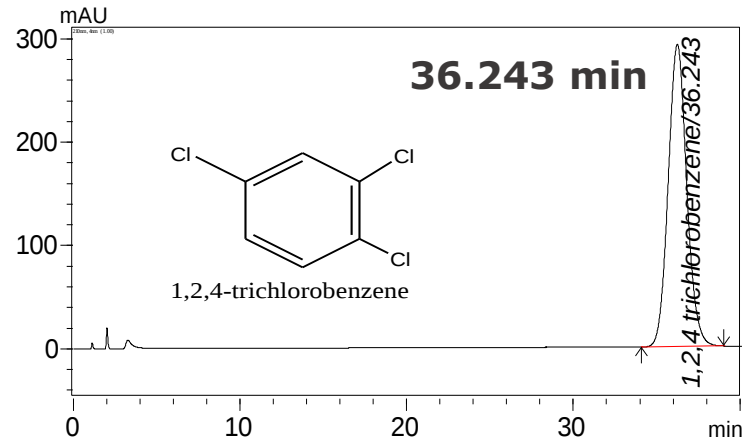
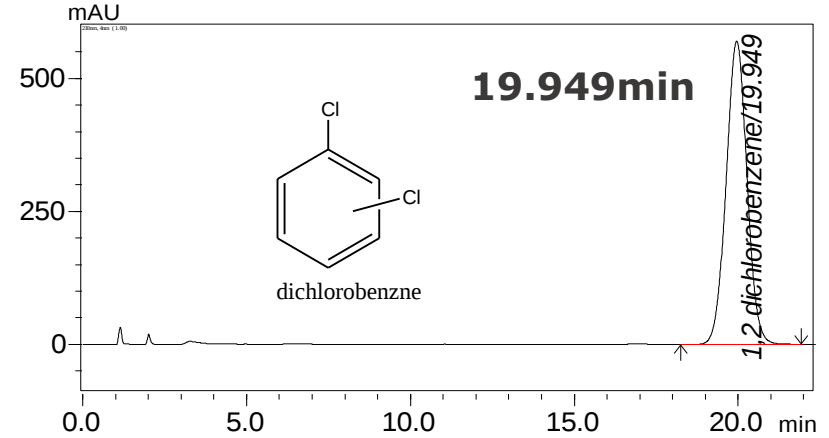
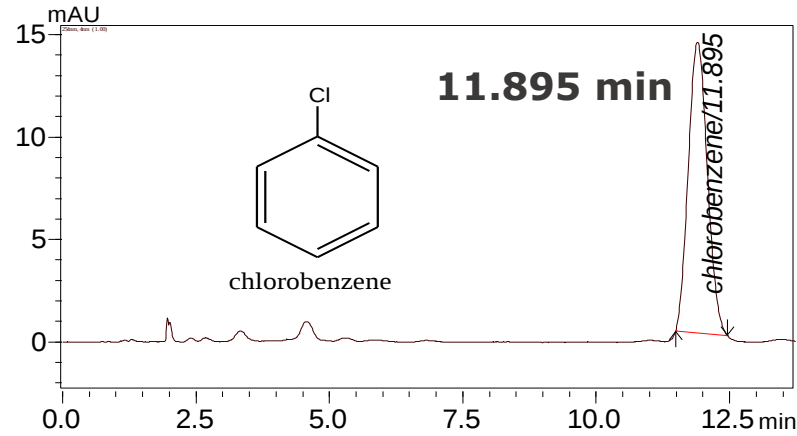


$$P_{\text{xyl}} > P_{\text{toluen}}$$

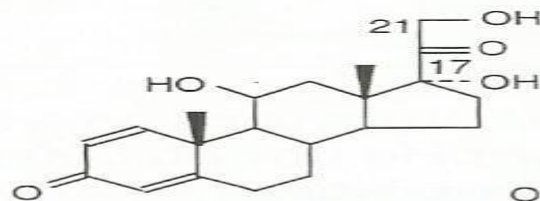
Χρόνοι κατακράτησης με βάση τη δομή

C4 Στήλη

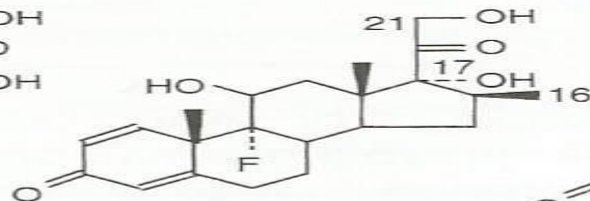
pH 6.2



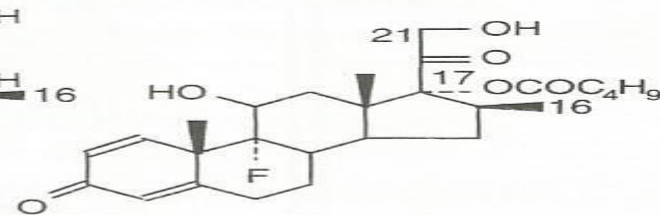
Έκλυση ουδέτερων ενώσεων σε C18



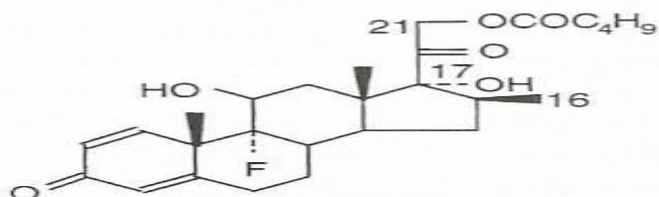
Πρεδνιζολόνη



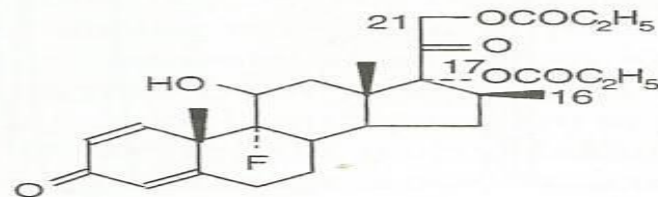
Βηταμεθαζόνη



17-βαλεριανική βηταμεθαζόνη



21-βαλεριανική βηταμεθαζόνη



17,21 διπροπιονική βηταμεθαζόνη

Πρεδνιζολόνη Βηταμεθαζόνη

5,43 min 6,24 min

21-βαλεριανική βηταμεθαζόνη

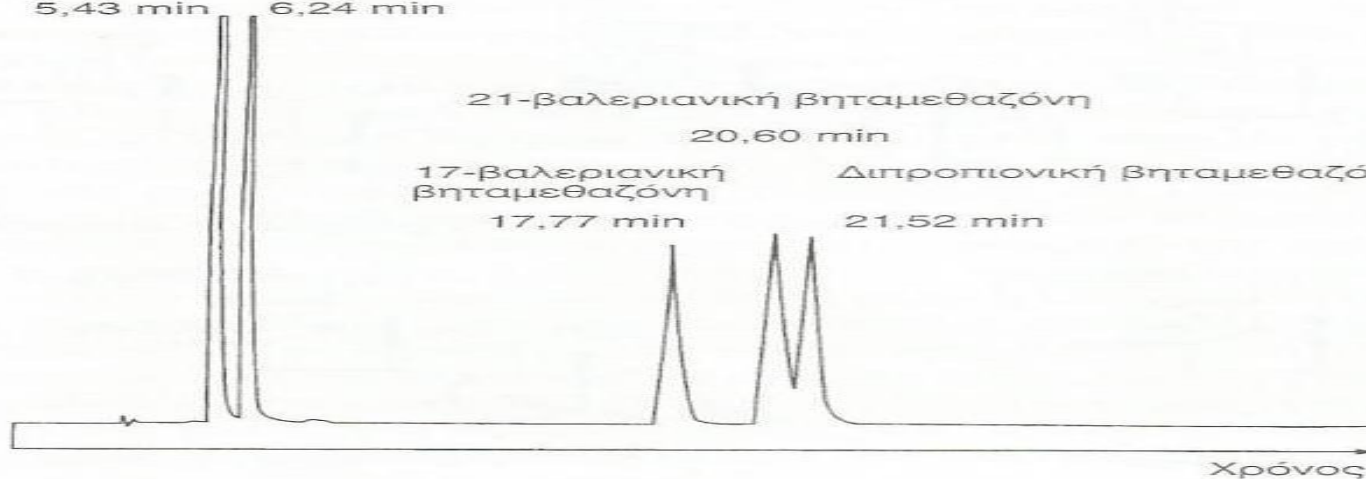
20,60 min

17-βαλεριανική
βηταμεθαζόνη

17,77 min

Διπροπιονική βηταμεθαζόνη

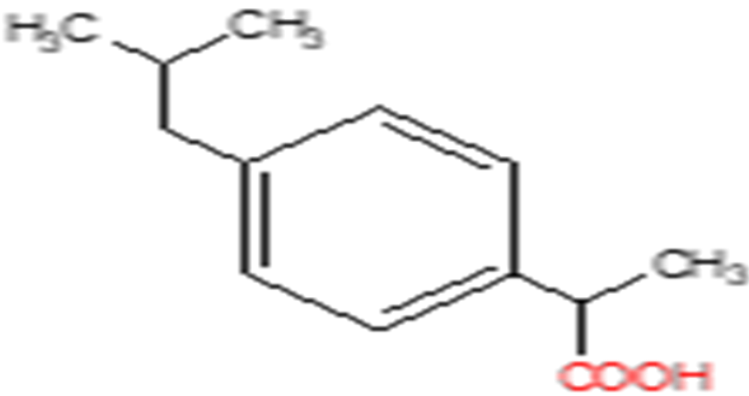
21,52 min



Χρόνοι κατακράτησης των ουσιών που ιονίζονται σε ποσοστό 51% έως 100%

Ποσοστά Ιονισμού των Όξινων ομάδων							
Ονομασία	pKa	% Ιονισμός		tr phenyl 40%MeOH		tr C4 40%MeOH	
		pH 2.3	pH 6.2	(HCl)	(NH ₃)	(HCl)	(NH ₃)
benzoic acid	4.2	1.24	99.01	5.785	2.315	5.180	1.998
naproxene	4.06	1.71	99.28	35.903	4.690	21.453	3.772
nicotinic acid	2.2	55.73	99.99	2.418	1.731	2.280	1.867
aspirin	3.83	2.87	99.58	5.189	1.707	4.248	1.722
ethamsylate 1	9.16	0.00	0.11	1.888	1.447	1.943	1.472
ethamsylate 2	10.92	0.00	0.00				
ethamsylate 3	-2.4	100	100				
ibuprofen	4.08	1.63	99.25	85.625	8.258	76.334	7.733
halazone	4.12	1.49	99.18	6.201	1.689	4.287	1.550
sulfisoxazole	6.17	0.01	51.73	4.602	3.067	3.139	1.952
sulfabenzamide	5.01	0.19	93.94	5.467	1.987	3.477	1.818
glibenclamide1	4.99	0.20	94.19	>300	96.820	99.478	32.500
glibenclamide2	7.06	0.00	12.13				23
diclofenac	4.46	0.60	98.21	227.800	14.076	55.305	5.993

Χρόνοι κατακράτησης των ουσιών που ιονίζονται σε ποσοστό 51% έως 100%

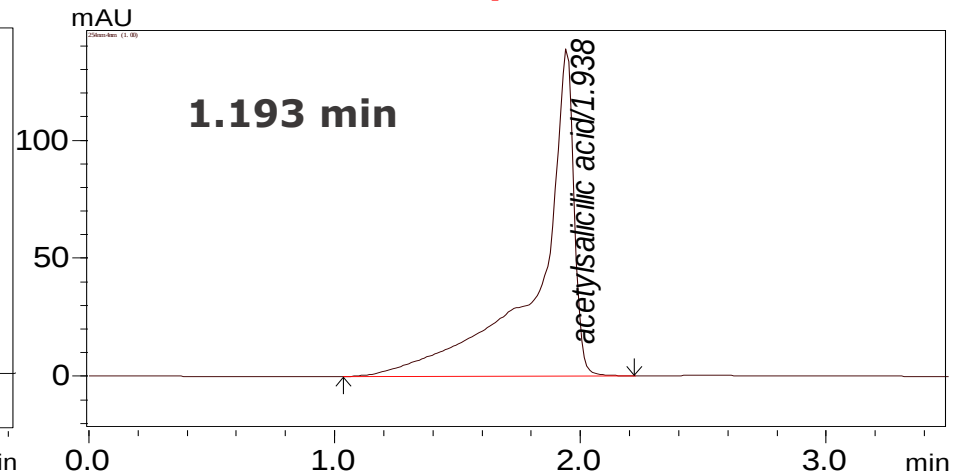
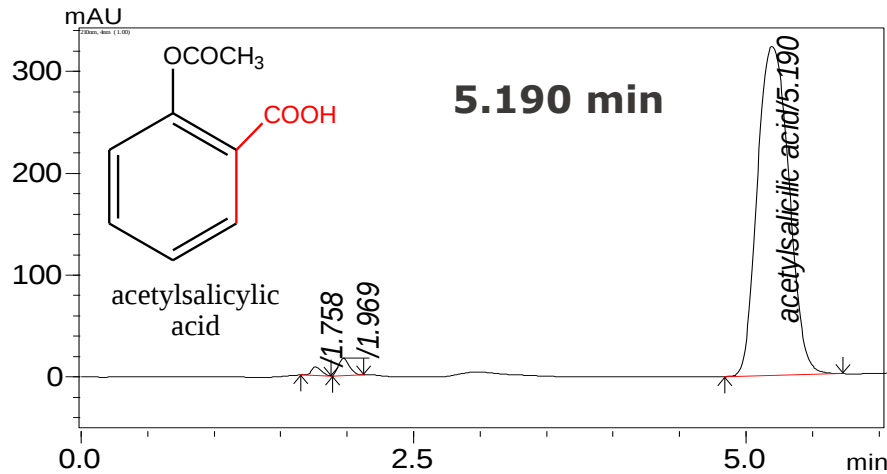
Ποσοστά Ιονισμού των Όξινων ομάδων							
Ονομασία	pKa	% Ιονισμός		tr phenyl 40%MeOH		tr C4 40%MeOH	
		pH 2.3	pH 6.2	(HCl)	(NH ₃)	(HCl)	(NH ₃)
ibuprofen	4.08	1.63	99.25	85.625	8.258	76.334	7.733
halazone					1.689	4.287	1.550
sulfisoxazole					3.067	3.139	1.952
sulfabenzamide					1.987	3.477	1.818
glibenclamide1					96.820	99.478	32.500

Έκλουση όξινων ενώσεων

pH 2.3

Phenyl Στήλη

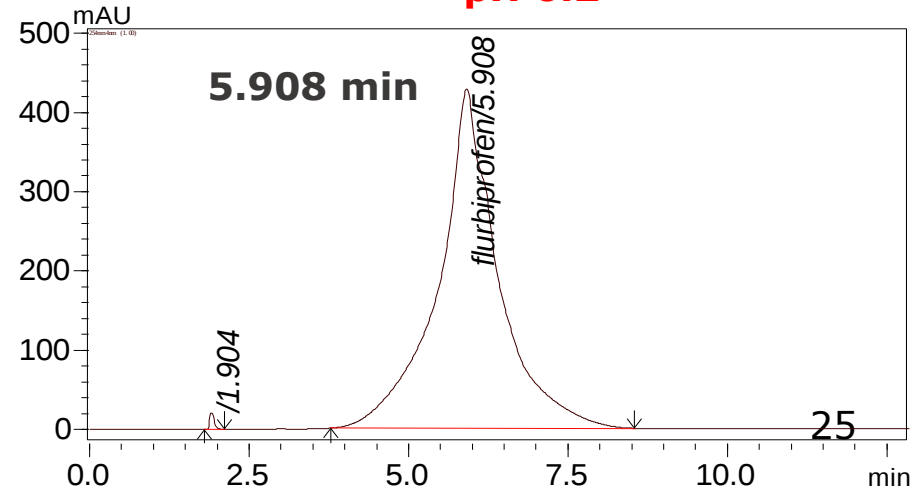
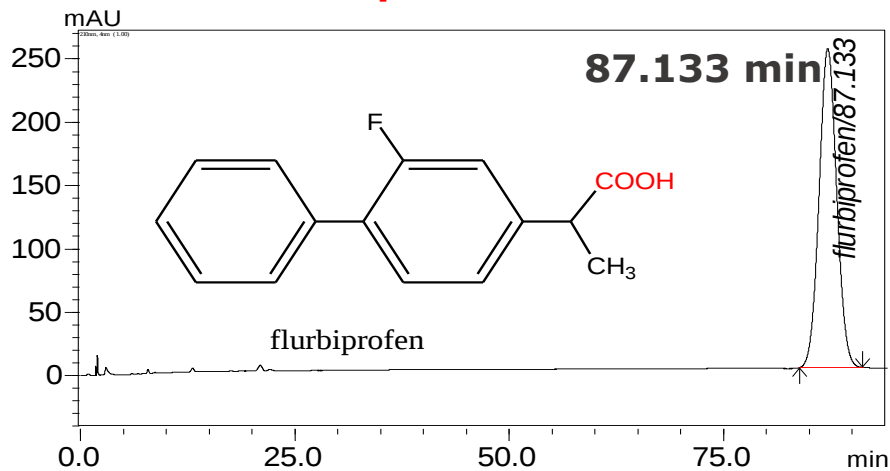
pH 6.2



pH 2.3

C4 Στήλη

pH 6.2



Εξίσωση Henderson -Hasselbach

Οξύ: %ιοντισμός $= \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}_a}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}_a}} \times 100 \quad (1)$

Βάση: %ιοντισμός $= \frac{10^{\text{pK}_a-\text{pH}}}{1 + 10^{\text{pK}_a-\text{pH}}} \times 100 \quad (2)$

ΟΞΕΑ

$\text{pH}=\text{pK}_a$ (50% ionization)

$\text{pH} > \text{pK}_a + 1$ (90% ionization)

$\text{pH} > \text{pK}_a + 3$ (99.9% ionization)

ΒΑΣΕΙΣ

$\text{pH}=\text{pK}_a$ (50% ionization)

$\text{pH} < \text{pK}_a - 1$ (90% ionization)

$\text{pH} < \text{pK}_a - 3$ (99.9% ionization)

Λιποφιλικότητα/Υδροφιλικότητα προσδιοριζόμενων ουσιών

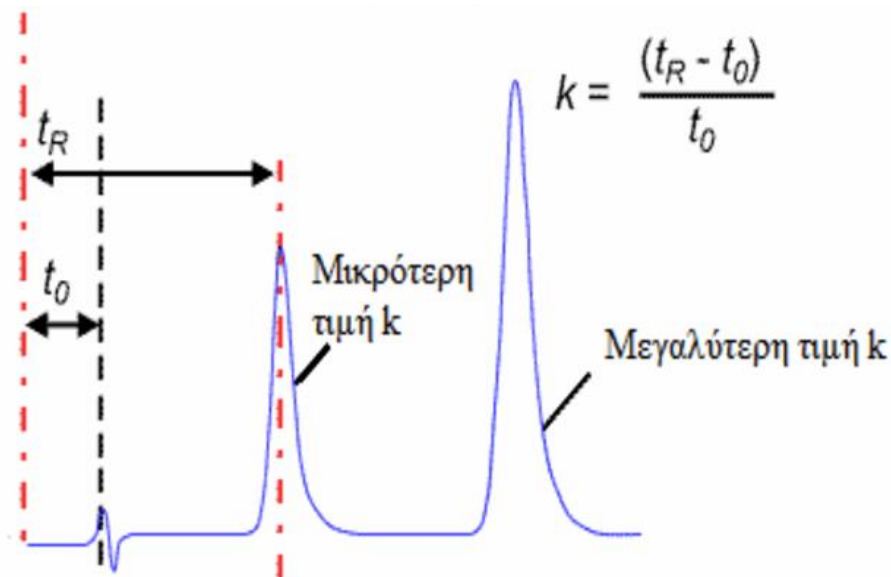
Ουδέτερα Μόρια

$$P = \frac{[C_u]_o}{[C_u]_w}$$

Συντελεστής μερισμού

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

Συντελεστής συγκράτησης ή
παράγοντας χωρητικότητας K'

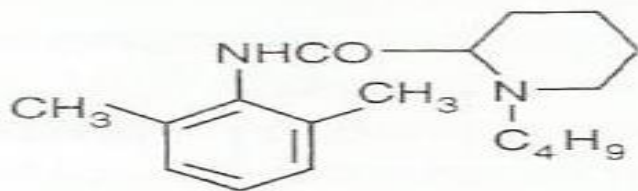


Οξέα : $D = \frac{P}{1 + 10^{pH - pK_a}}$

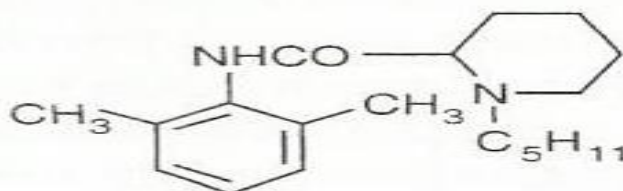
$$K'_{app} = \frac{K'}{1 + 10^{pH - pK_a}}$$

Βάσεις : $D = \frac{P}{1 + 10^{pK_a - pH}}$

$$K'_{app} = \frac{K'}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

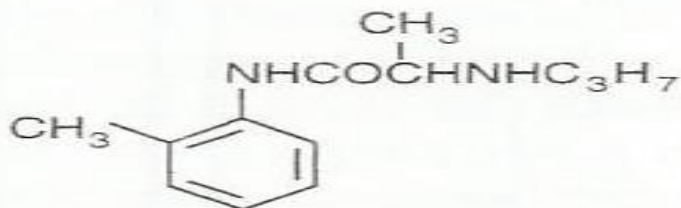


Βουπιβακαΐνη pKa 8,1

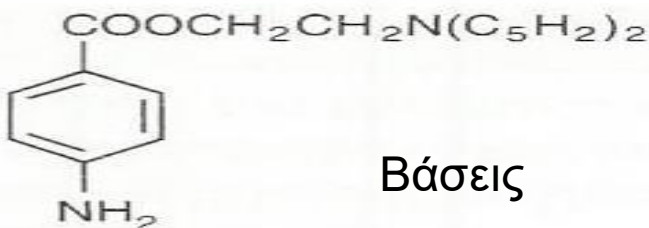


Πεντυκαΐνη pKa ~ 8,1

$$P = \frac{[C_u]_o}{[C_u]_w}$$

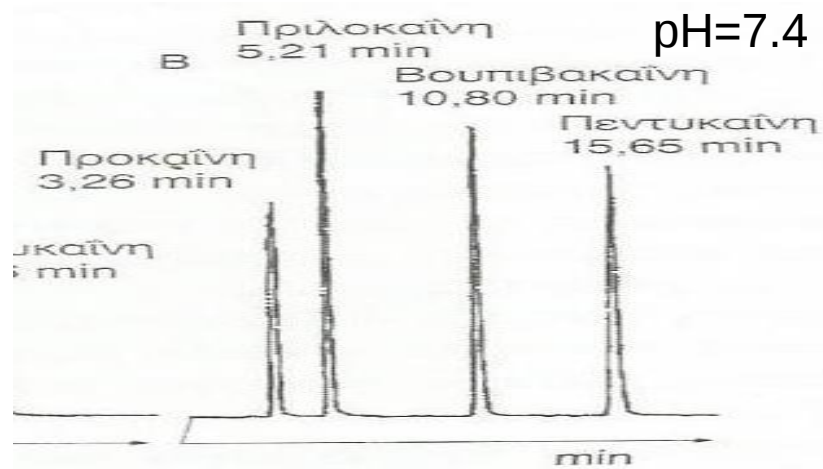
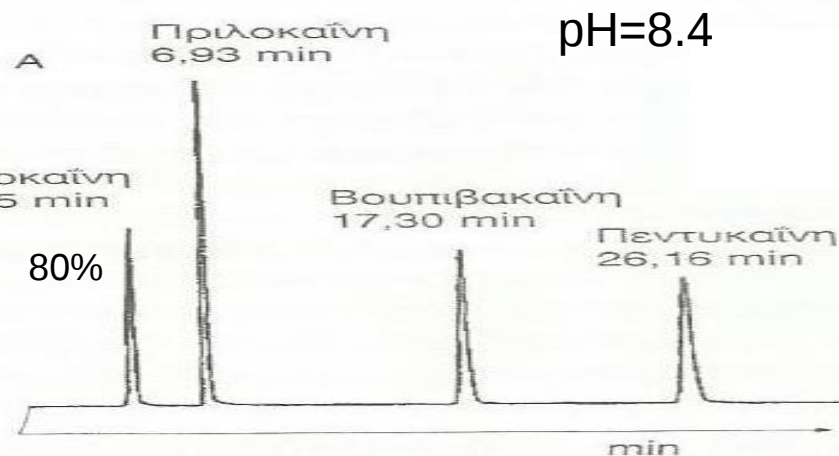


Πριλοκαΐνη pKa 7,9



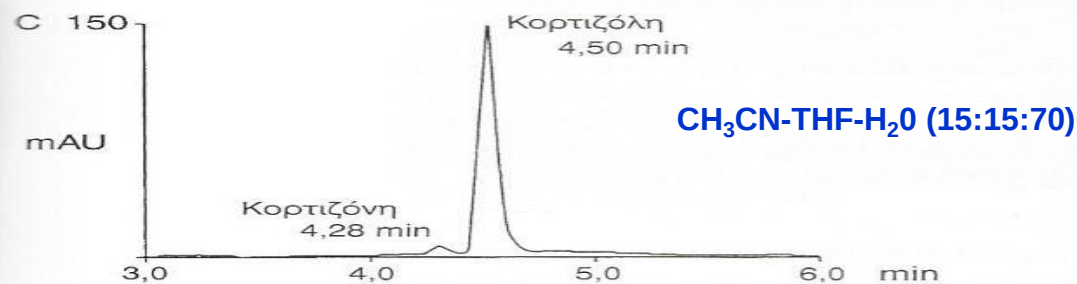
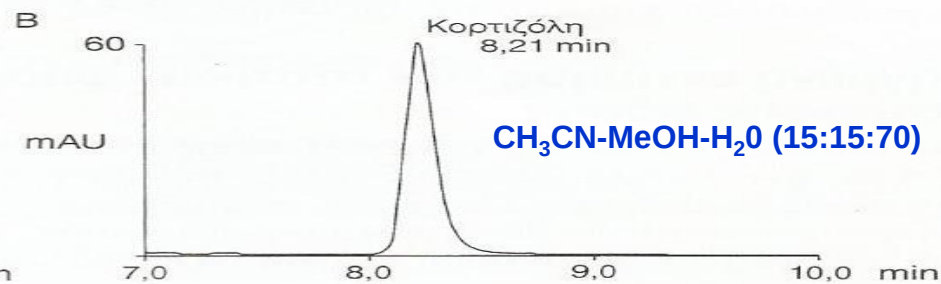
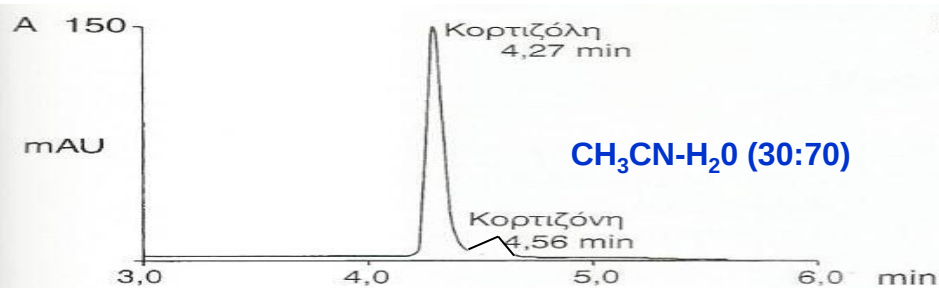
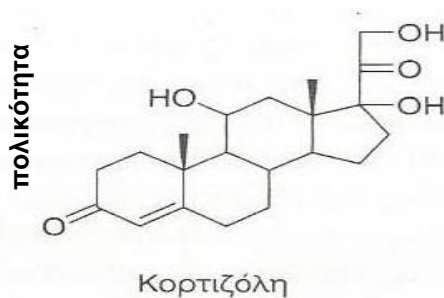
Προκαΐνη pKa 9,0

Βάσεις

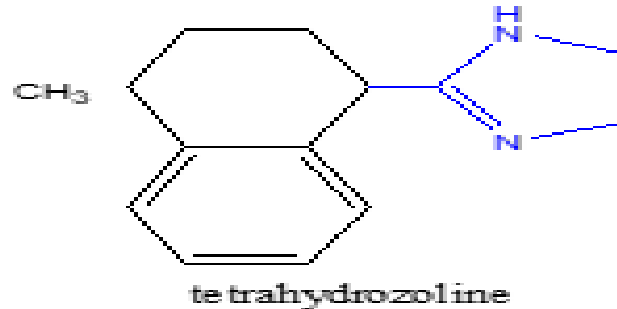
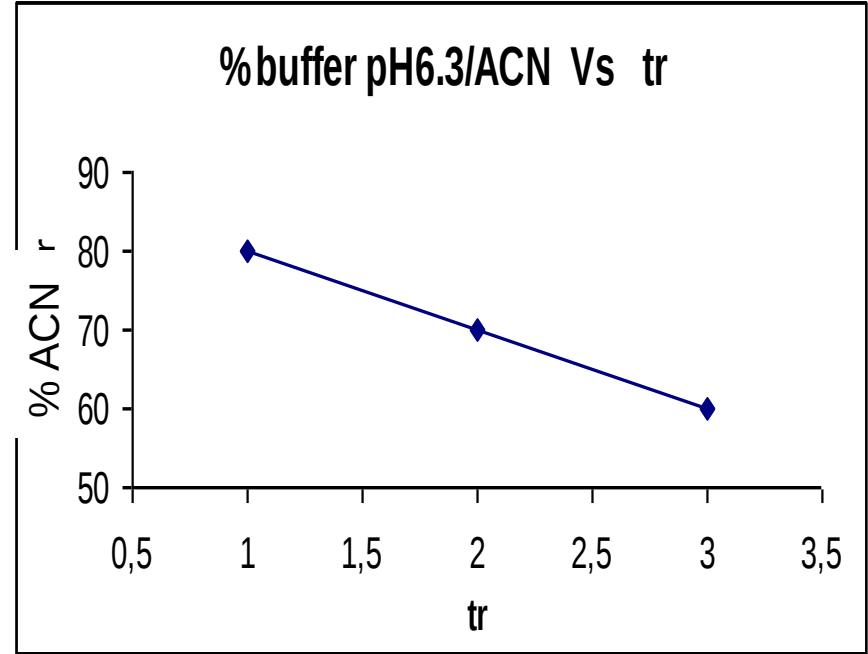
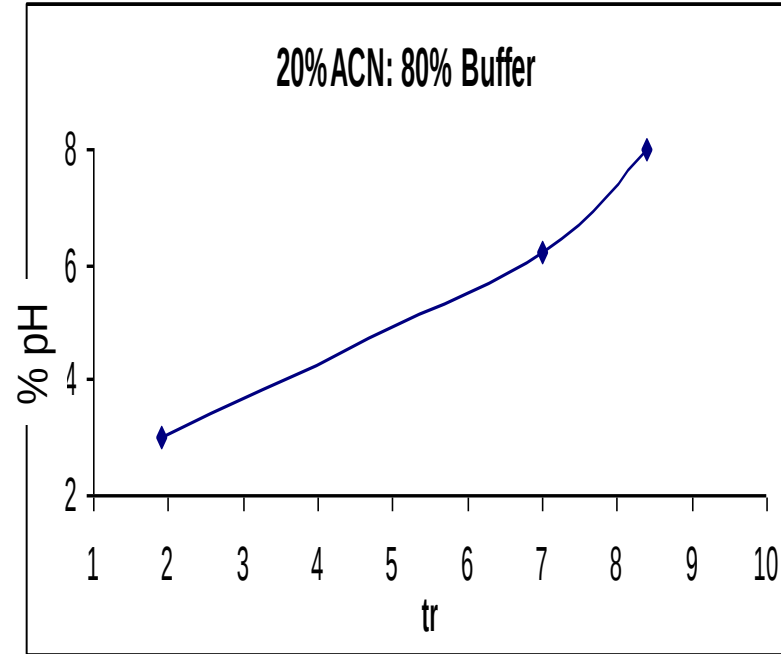


Επίδραση διαλύτη κινητής φάσης

Εκλουστική ισχύς ↑
Τετραυδροφουράνιο 23%
Ακετονιτρίλιο 33%
Μεθανόλη 40%
H₂O



Καμπύλες συσχέτισης (Βάσης)



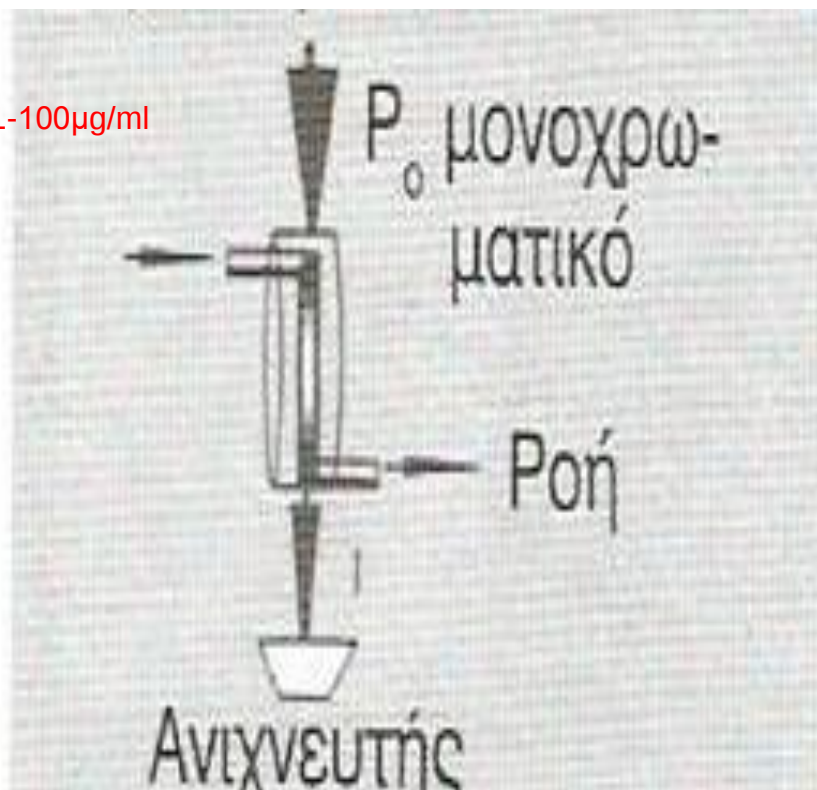
ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

0.01-100 μ g

Υπεριώδους UV

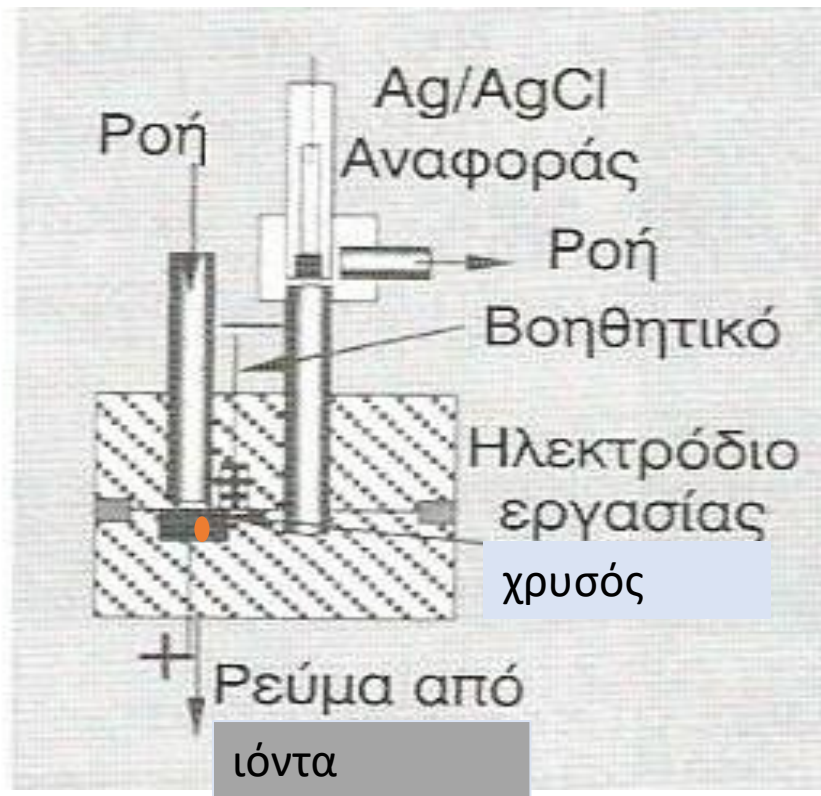
Συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD)

0,01-100 μ g/ml



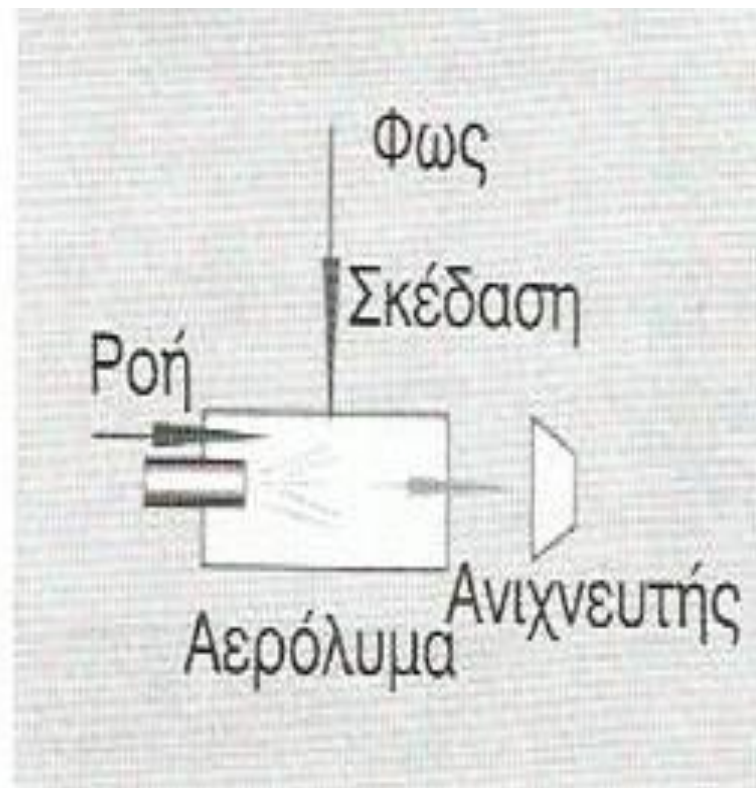
ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής



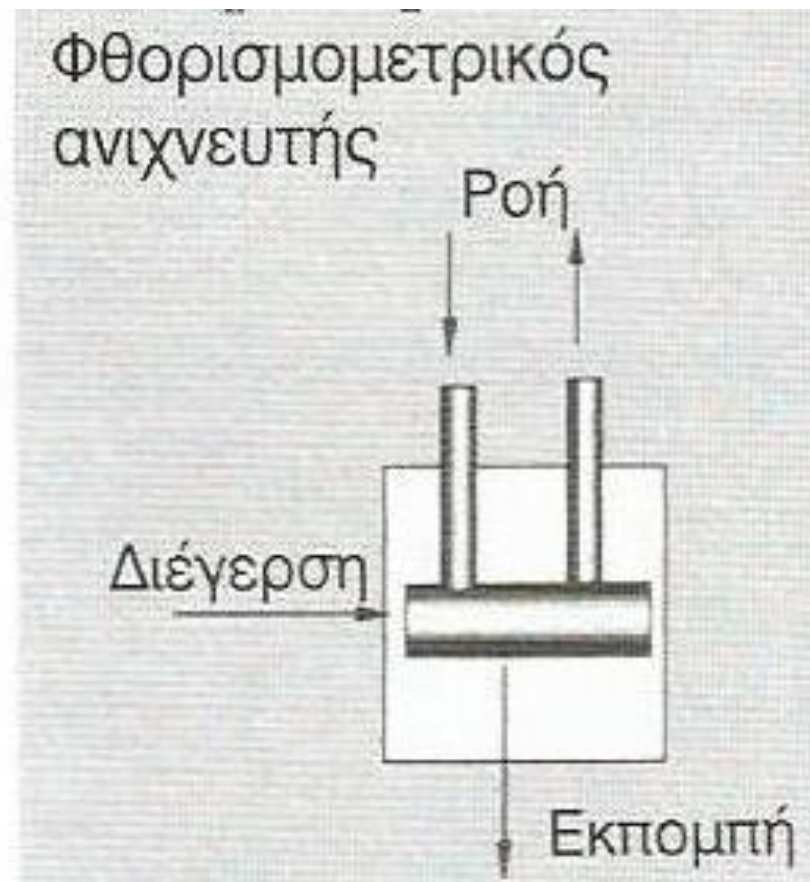
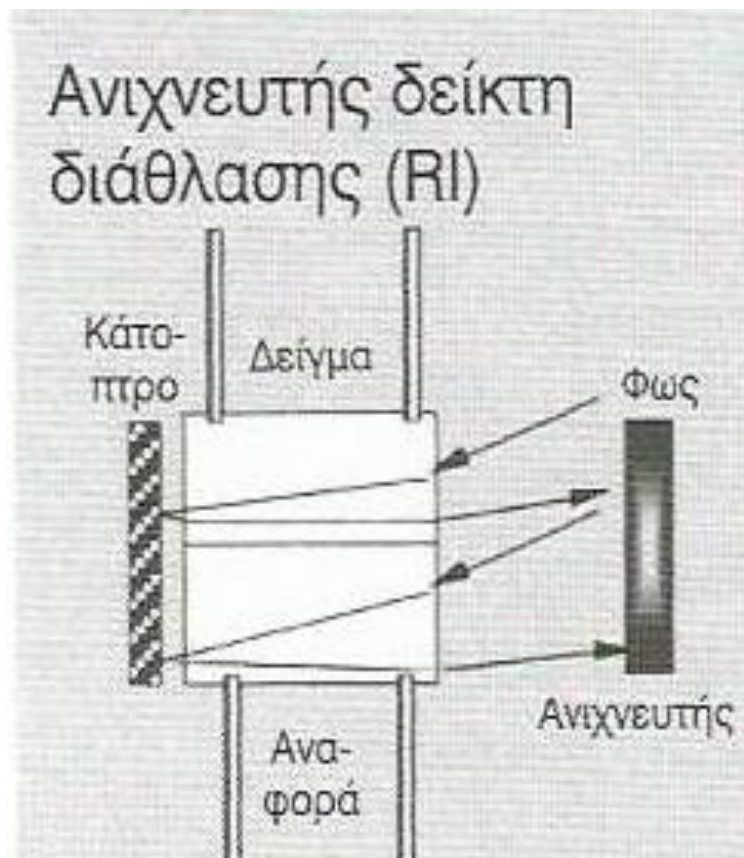
(παραγωγή ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση ή κατανάλωση ηλεκτρονίων στη αναγωγή)

Εξατμιστικός ανιχνευτής σκέδασης (ELSD)



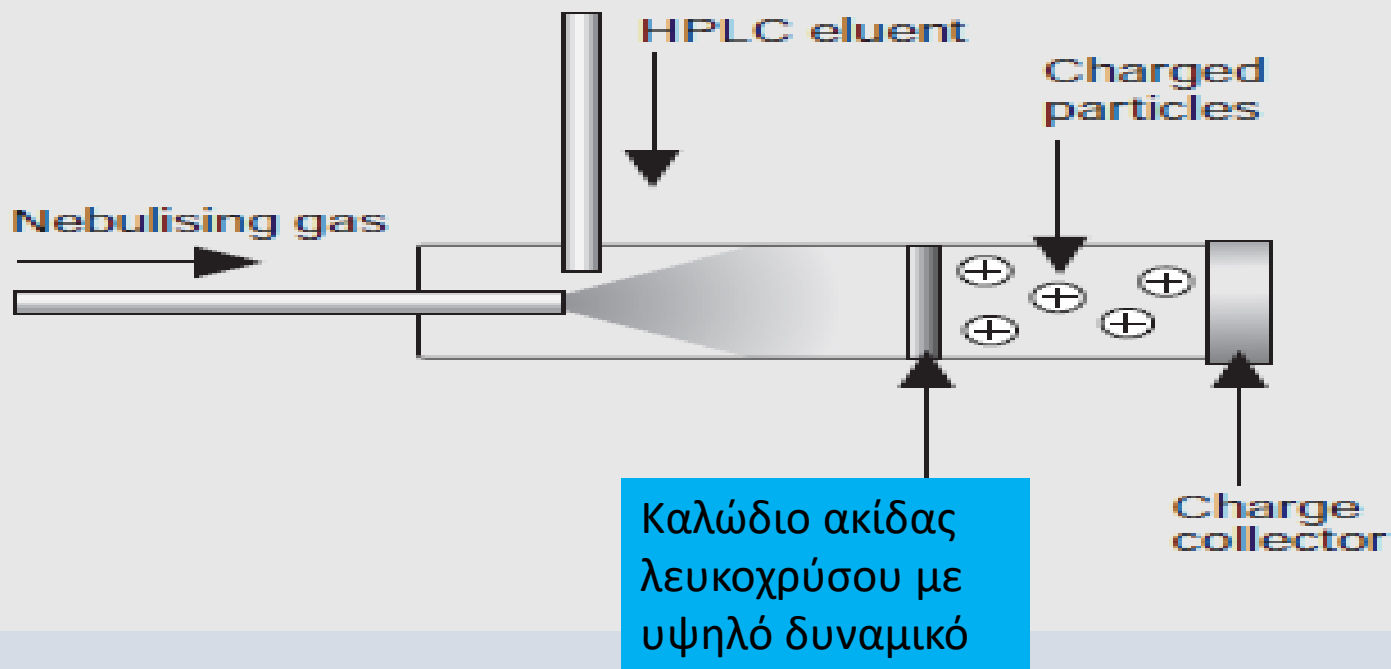
Ναι στη βαθμιδωτή έκλυση
Δε χρησιμοποιείται σε μη πτητικά ή πολύ πτητικά υλικά

ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ



Ανιχνευτής φορτισμένου αερολύματος μέσω ακίδας

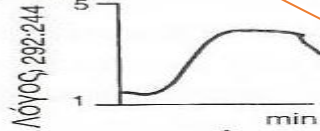
Corona[®] charged aerosol detector (CAD)



Απόδοση ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων ΟΧΙ

Προηγμένη εκτίμηση των στατικών φάσεων
αντίστροφης φάσης ΟΧΙ

4 Καθαρότητα κορυφής από τον λόγο απορρόφησης σε δύο μήκη κύματος (λογόγραμμα)

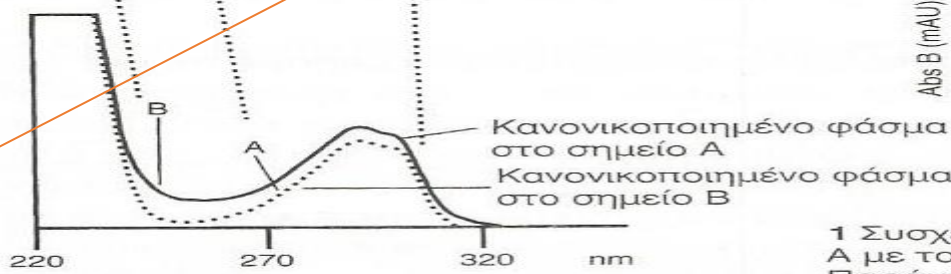
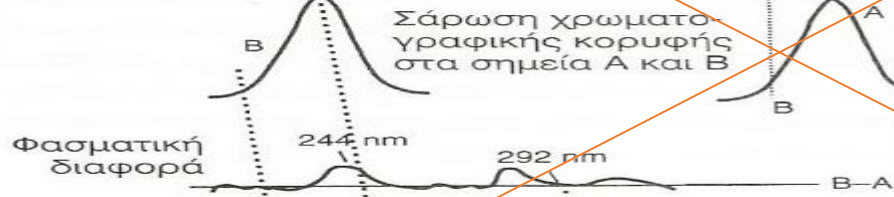


$r^2 \times 1000$

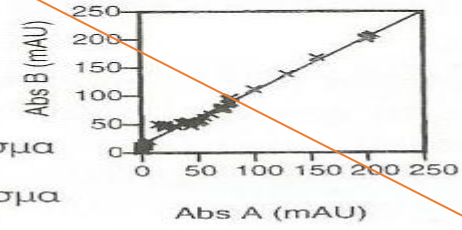


2 Καθαρότητα κορυφής από καμπύλη στο κατώφλιο

$$\text{Ομοιότητα} = r^2 \times 1.000$$



$$y = 0,952x + 12,163r^2 = 0,985$$

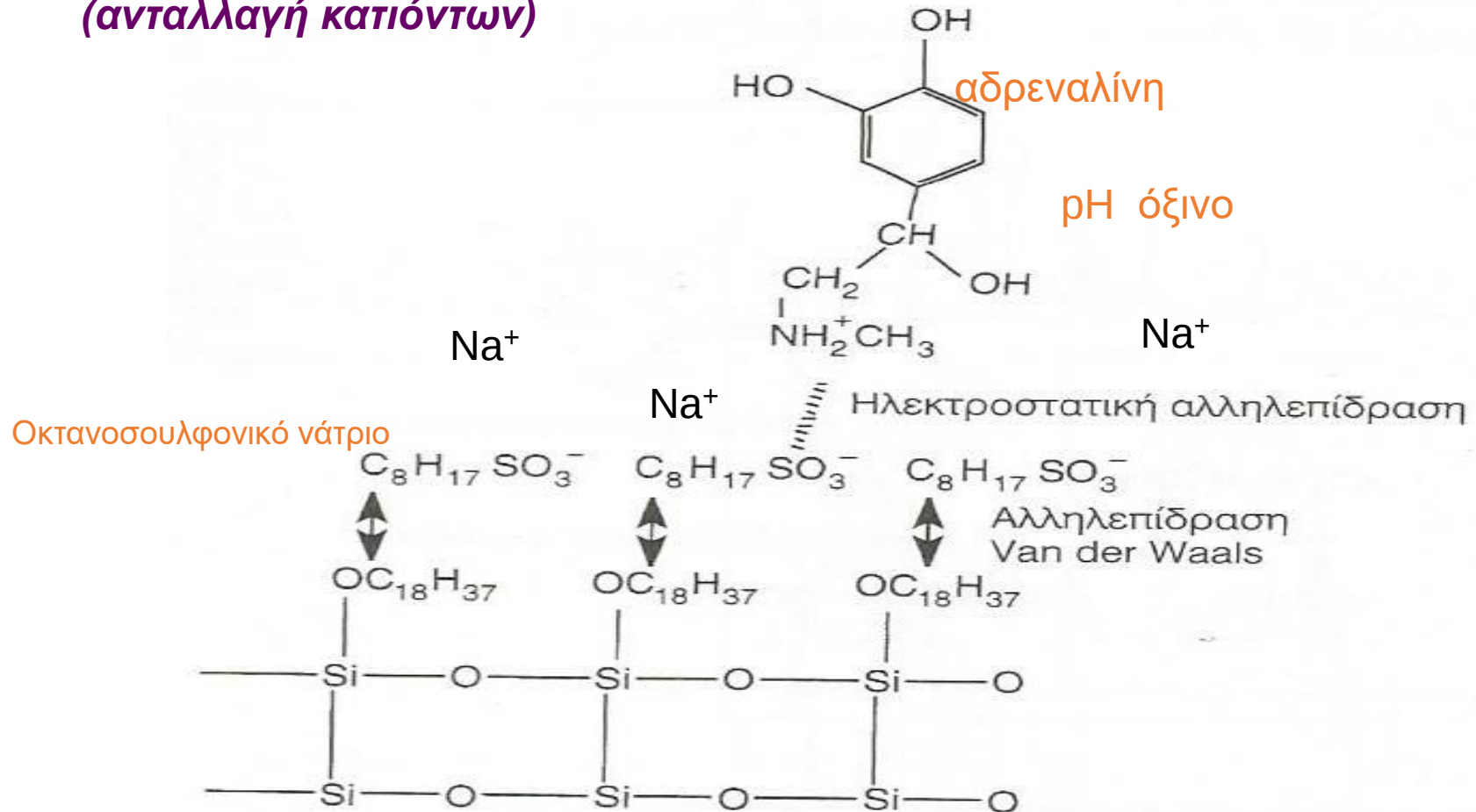


1 Συσχέτιση φάσματος στο A με το φάσμα στο B
Παράμετρος καθαρότητας (ομοιότητα) = $r^2 \times 100 = 985$

Αναλύσεις με εξειδικευμένες τεχνικές HPLC

Ανάλυση ζεύγους ιόντων

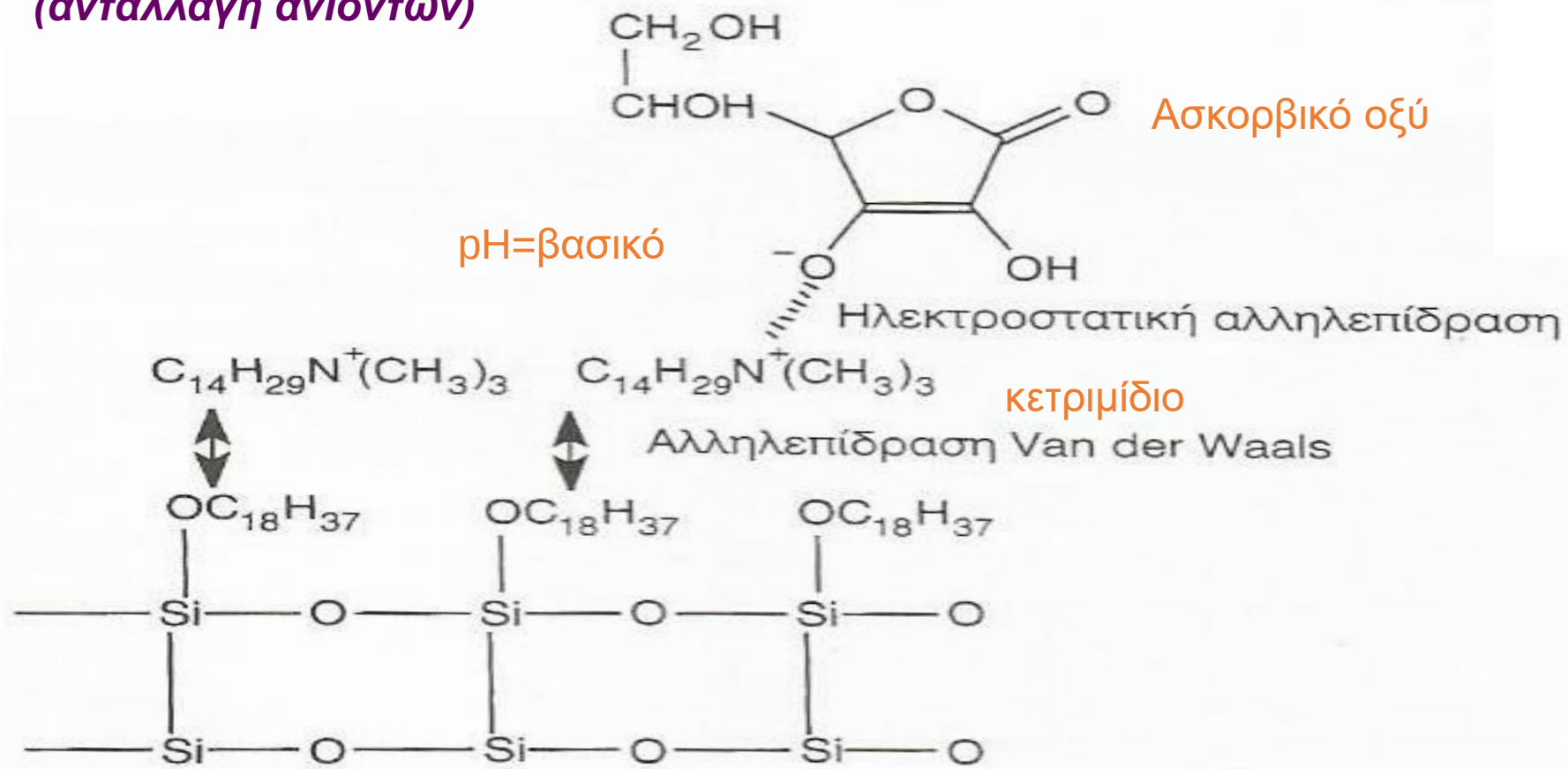
(ανταλλαγή κατιόντων)



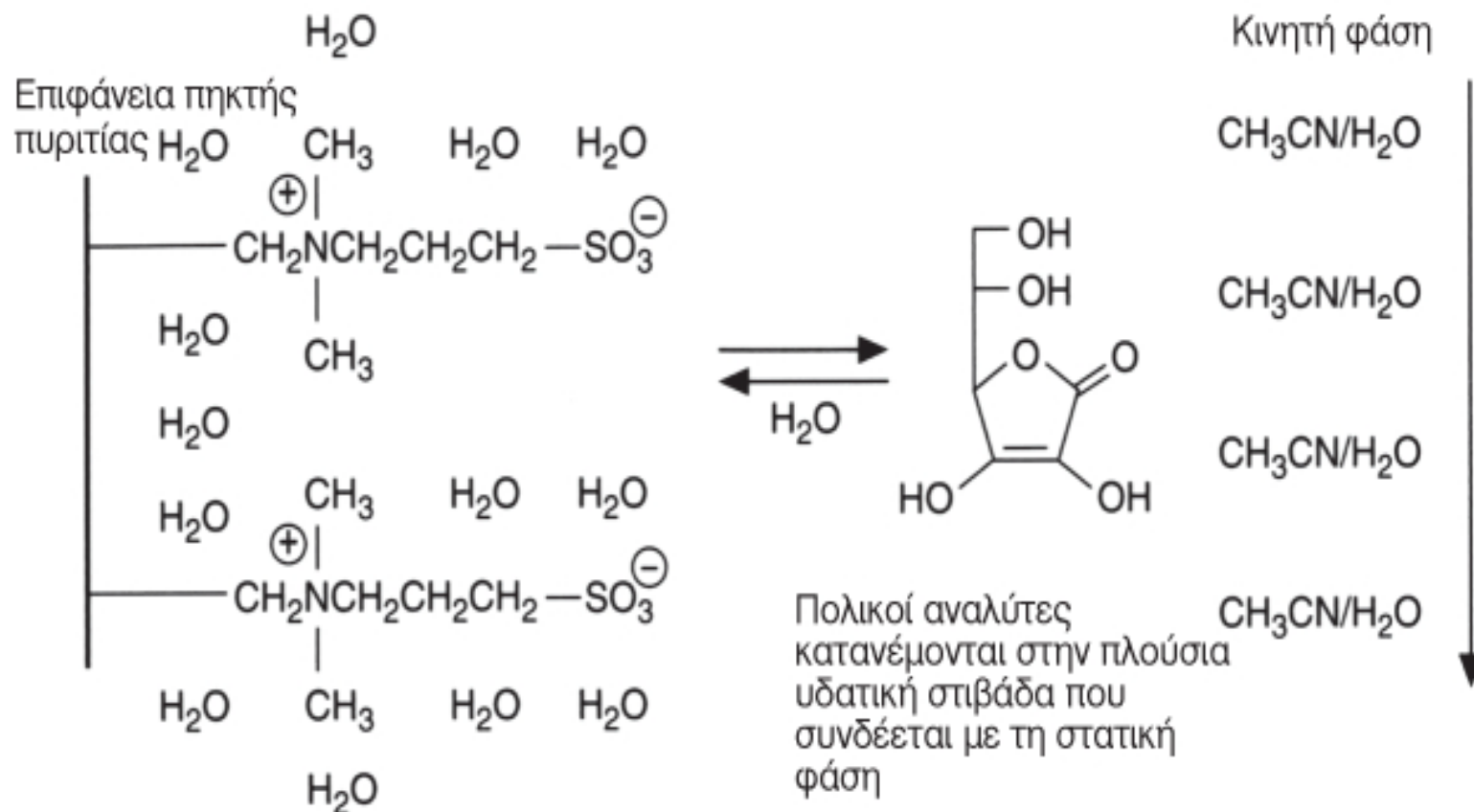
Αναλύσεις με εξειδικευμένες τεχνικές HPLC

Ανάλυση ζεύγους ιόντων

(ανταλλαγή ανιόντων)



Χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλοεπίδρασης (ZIC- HILIC)

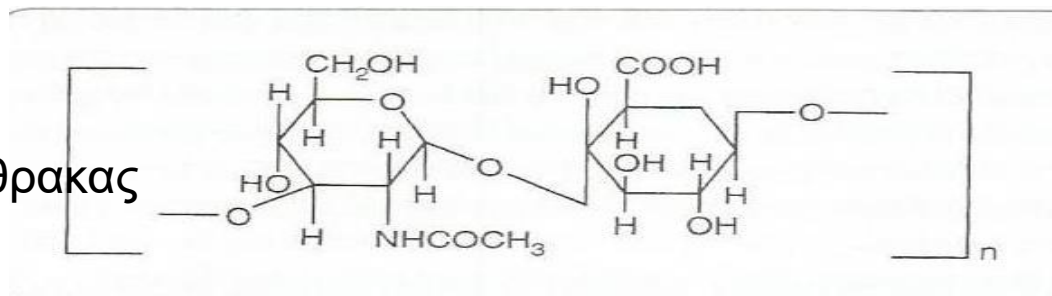


Αναλύσεις με εξειδικευμένες τεχνικές HPLC

Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

(υαλουρονικό οξύ)

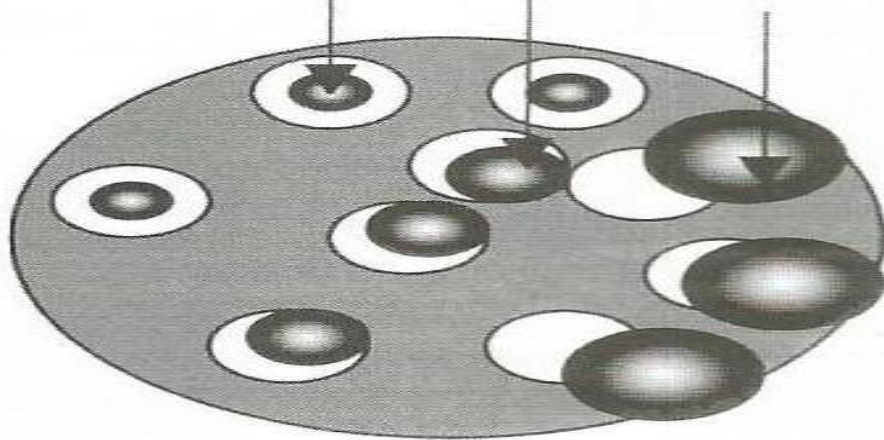
υδατάνθρακας



Τα μικρά μόρια εισέρχονται ελεύθερα στους πόρους

Τα ενδιάμεσα μόρια εισέρχονται τους πόρους σε διαφορετική έκταση

Τα μεγαλομόρια αποκλείονται από τους πόρους



UV 215nm ή ELSD

MB>10⁶Daltons

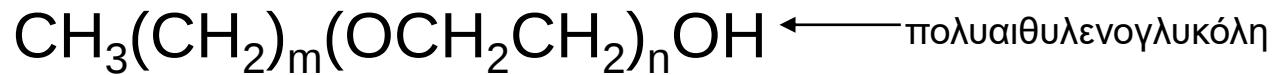
Στατική φάση: Συμβατή με το νερό

Κινητή φάση: Υδατικό διάλυμα

Αναλύσεις με εξειδικευμένες τεχνικές HPLC

Ανάλυση μη-ιοντικών επιφανειοδραστικών με ELSD

αλκυλομάδα



Εξάνιο 76
Χλωροφόρμιο 19
Μεθανόλη 5

Βαθμιδωτή έκλυση

Εξάνιο 56
Χλωροφόρμιο 14
Μεθανόλη 30

Ολιγομερή αλκυλοπολυαιθυλενογλυκόλης



Ουσία: Cetomacrol ($m=15-17$, $n=20-24$)

Ανιχνευτής : IR, ELSD

Στατική φάση: αμινοπροπυλ στήλη

Κινητή φάση: εξάνιο/χλωροφόρμιο/MeOH
(Βαθμιδωτή έκλυση)

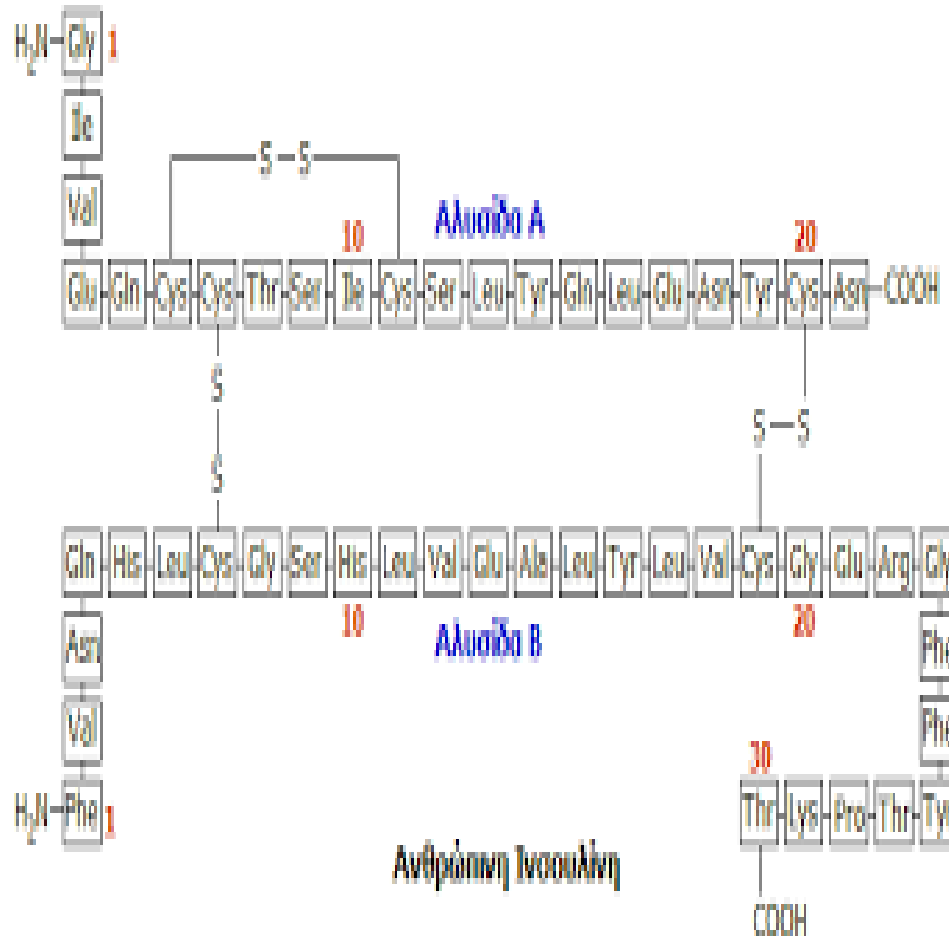
Ανάλυση πρωτεϊνών

Στατική: φάση C18

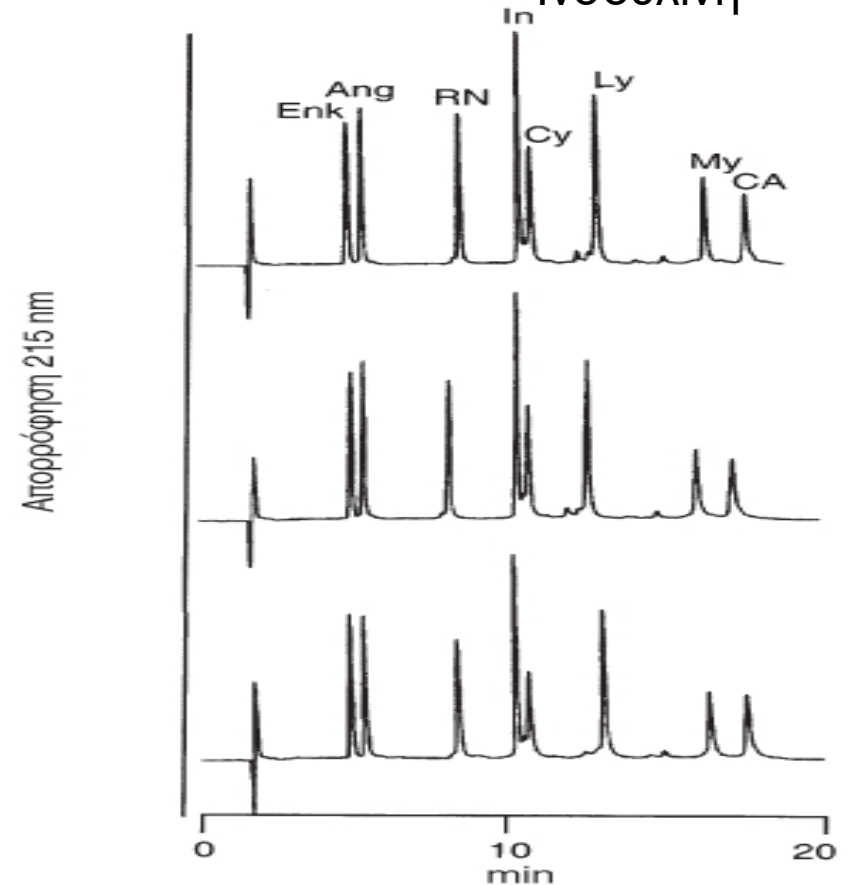
Κιν. Φάση : Τριφθ. Οξύ/Ακετονιτρίλιο

Βαθμιδωτή έκλουση

Ανίχν. UV (215nm)



Ινσουλίνη



Αναλύσεις με εξειδικευμένες τεχνικές HPLC

Αντιδράσεις παραγωγοποίησης

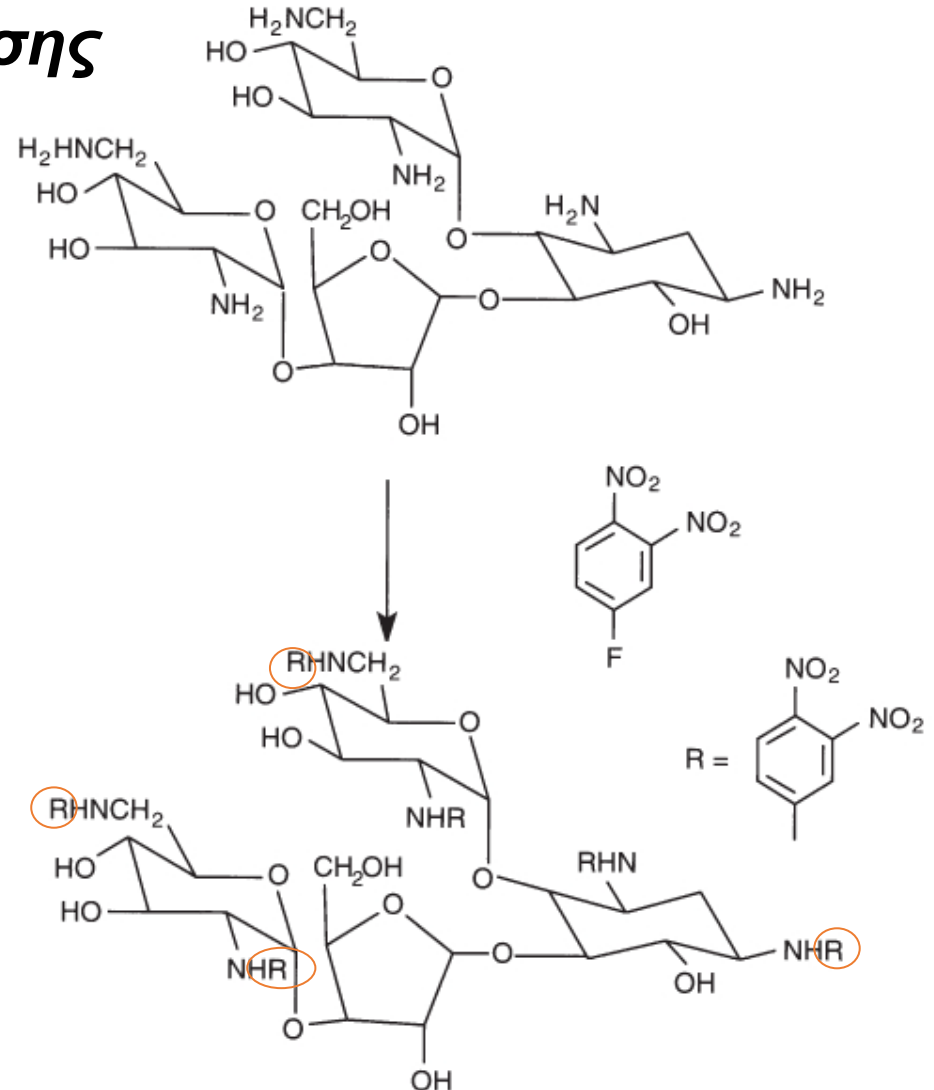
Ουσία: νεομυκίνη

Αντιδραστήριο: φθοροδινιτροβενζόλιο

Ανιχνευτής : UV

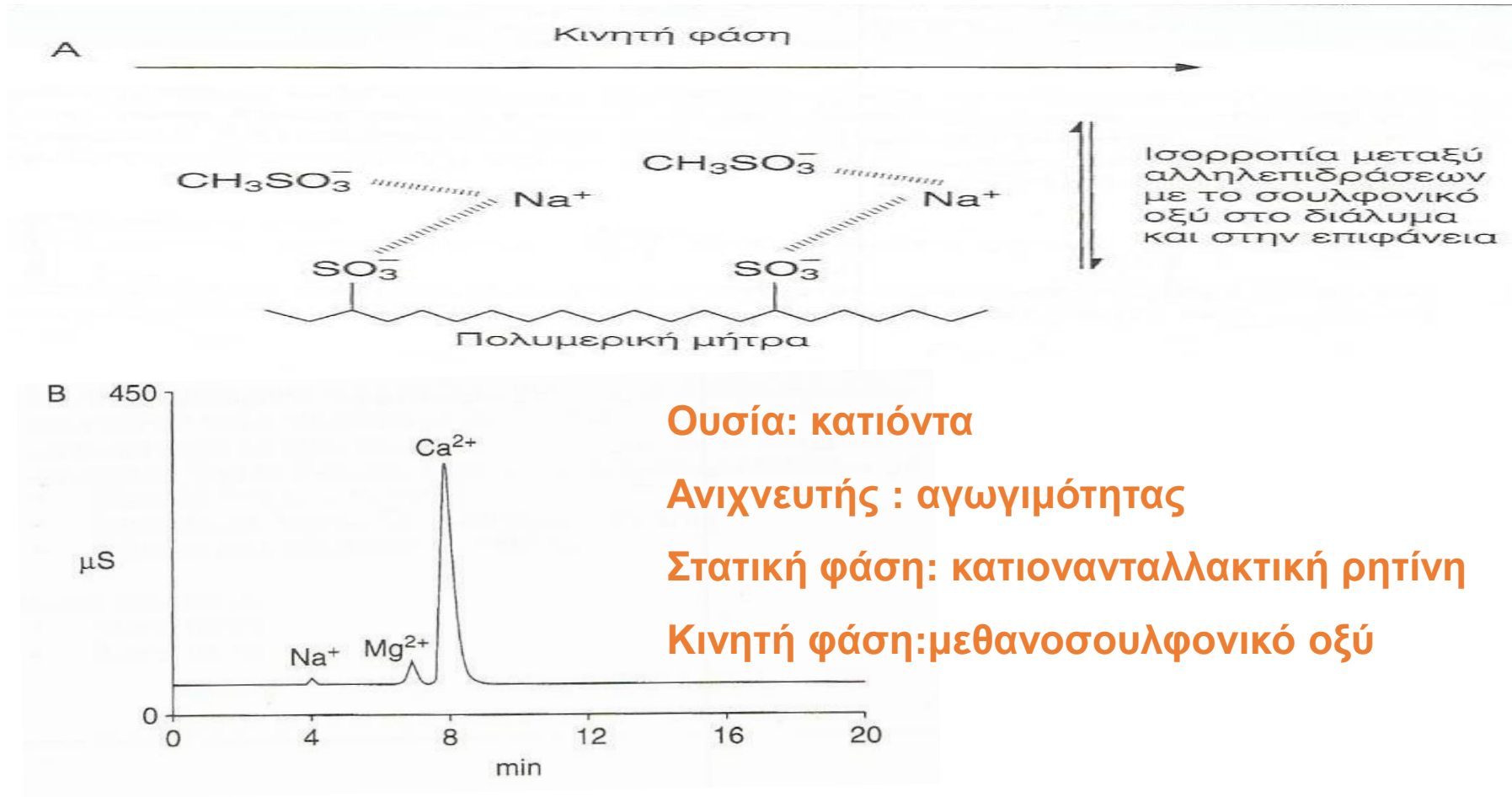
Στατική φάση: SiO_2

Κινητή φάση: EtOH/χλωροφόρμιο



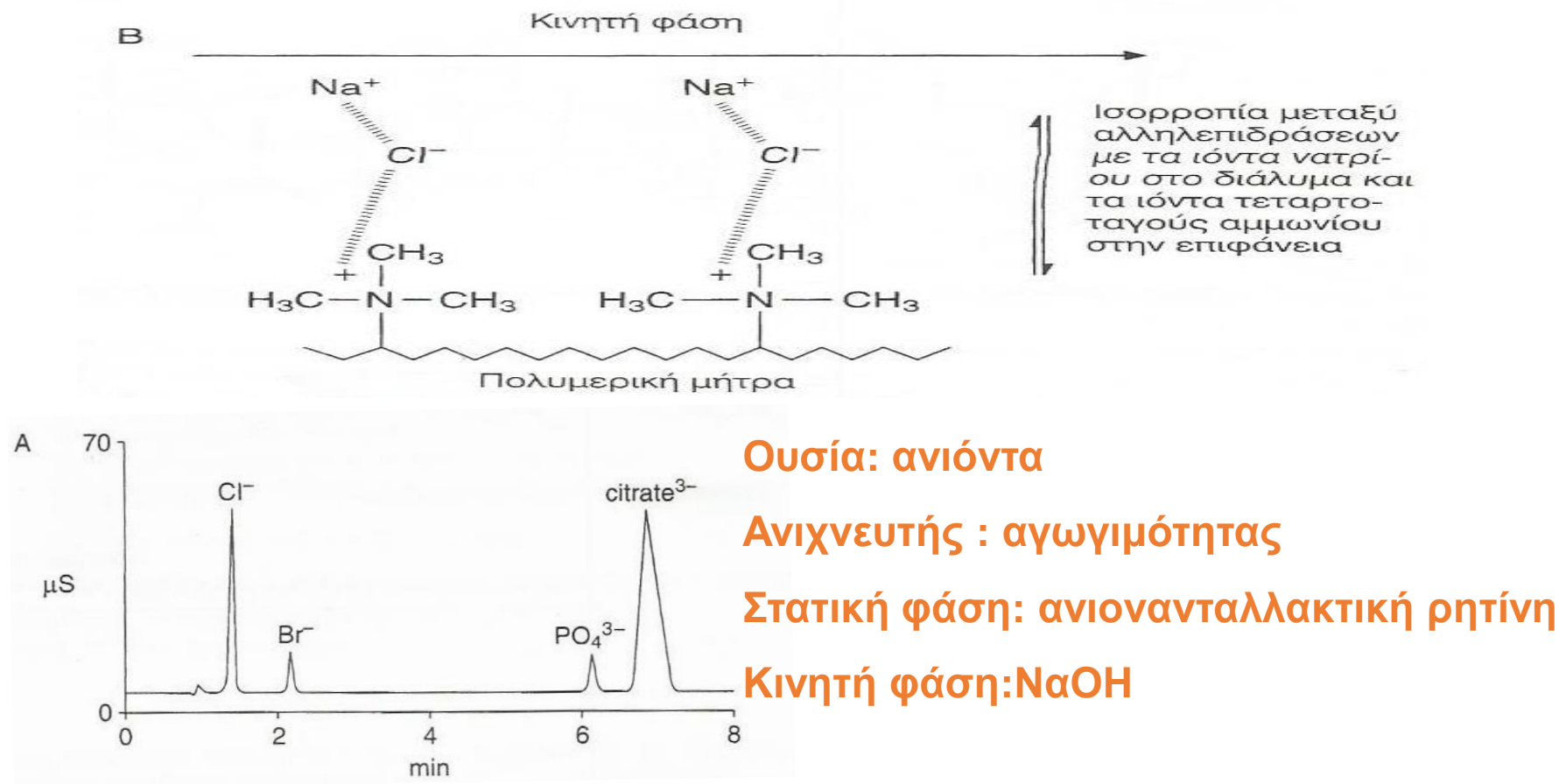
Αναλύσεις με εξειδικευμένες τεχνικές HPLC

Ιοντική Χρωματογραφία



Αναλύσεις με εξειδικευμένες τεχνικές HPLC

Ιοντική Χρωματογραφία



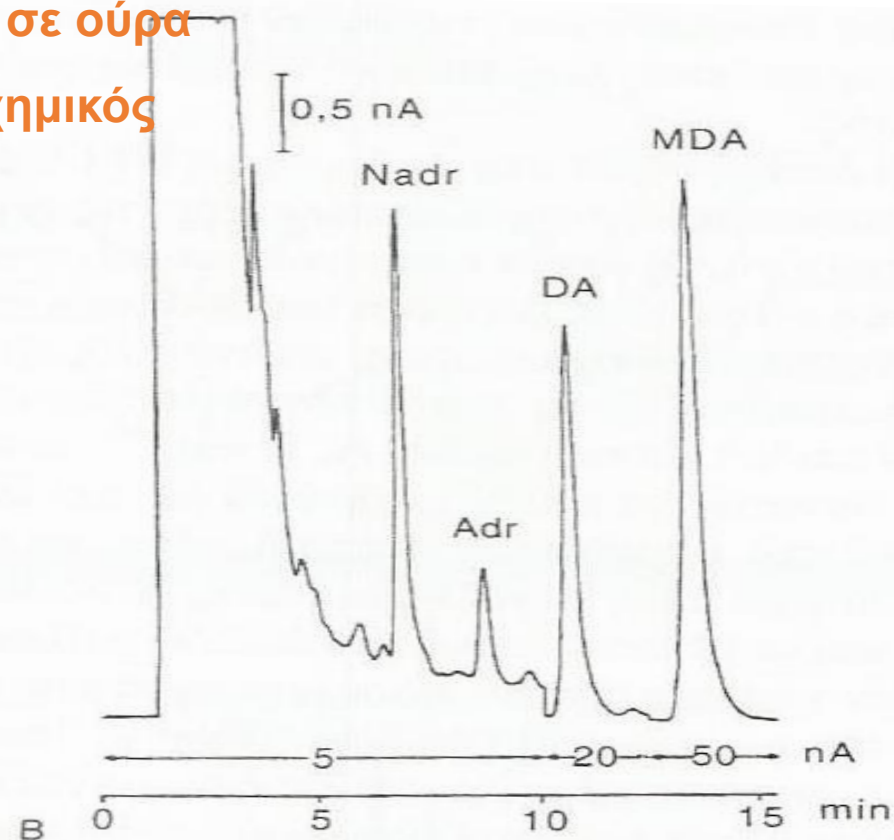
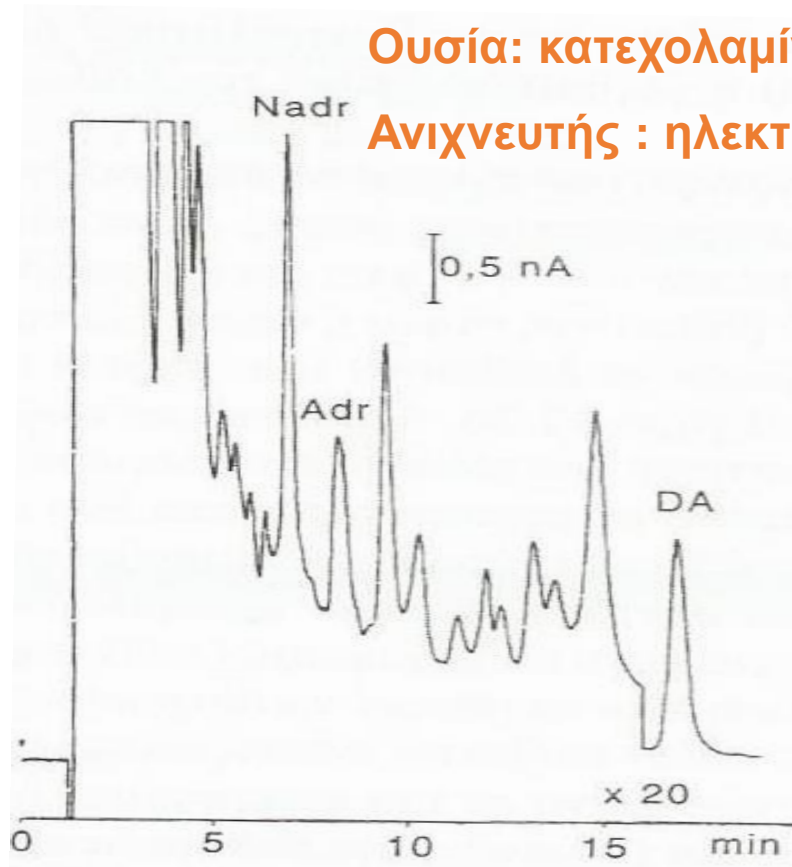
Αναλύσεις με εξειδικευμένες τεχνικές HPLC

Μηχανισμός A: Σχηματισμός ζεύγους ιόντων (με θειικό διμεθυλοκυκλοεξύλιο)

Μηχανισμός B: Ιονανταλλαγή

Ουσία: κατεχολαμίνες σε ούρα

Ανιχνευτής : ηλεκτροχημικός



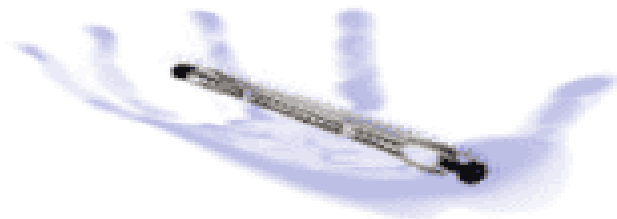
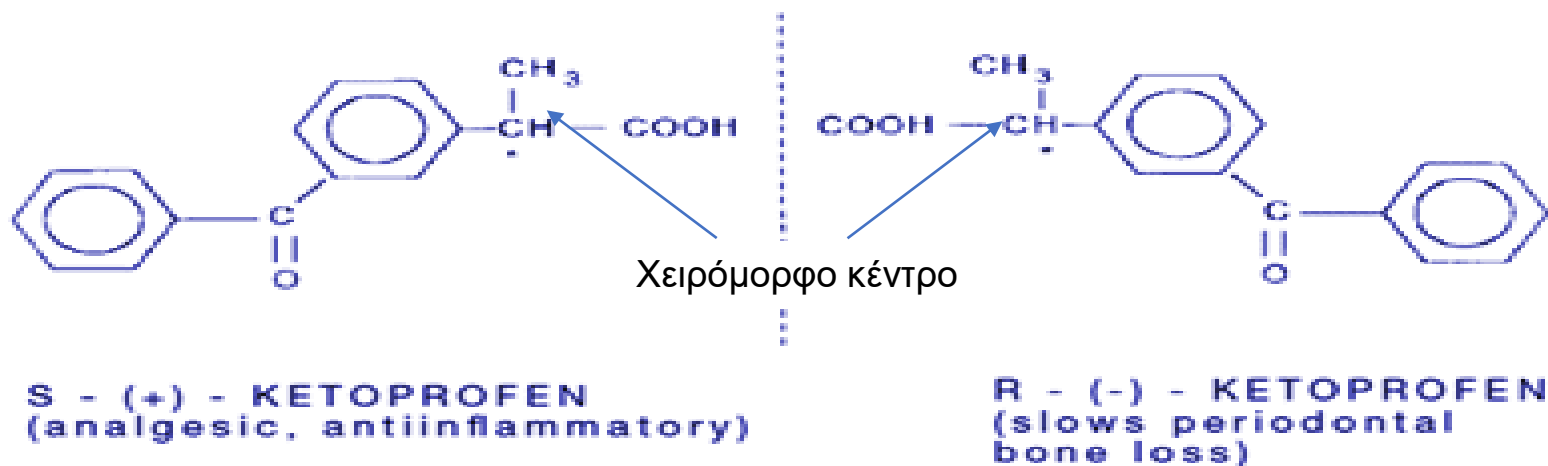
Στατική φάση A : C₁₈ στήλη

B: κατιονανταλλακτική ρητίνη

Χηλική χρωματογραφία (Chiral chromatography)

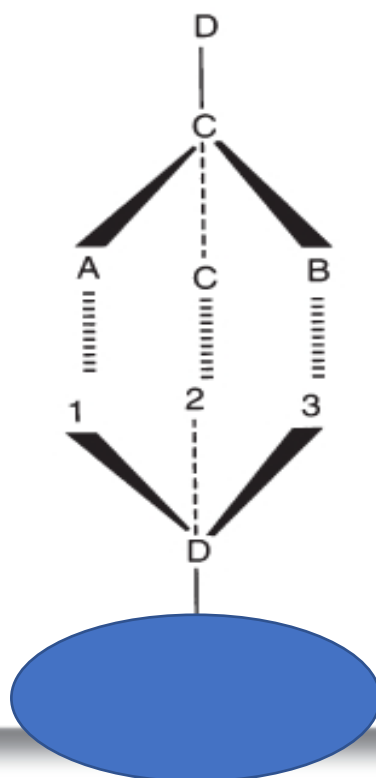
Εναντιομερή (κατοπτρική σχέση)

Στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός σε διαφορετικές κατευθύνσεις με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες

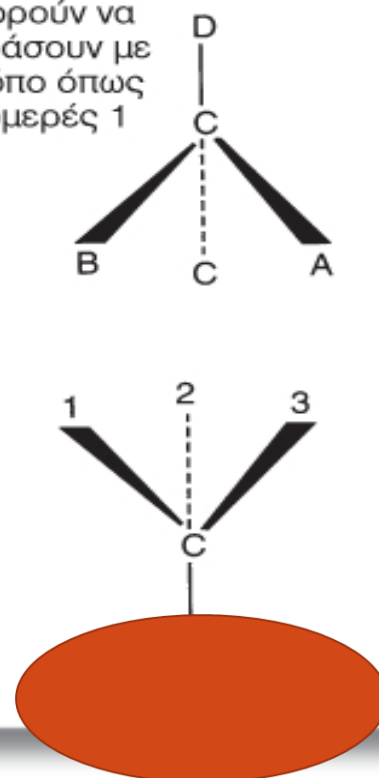


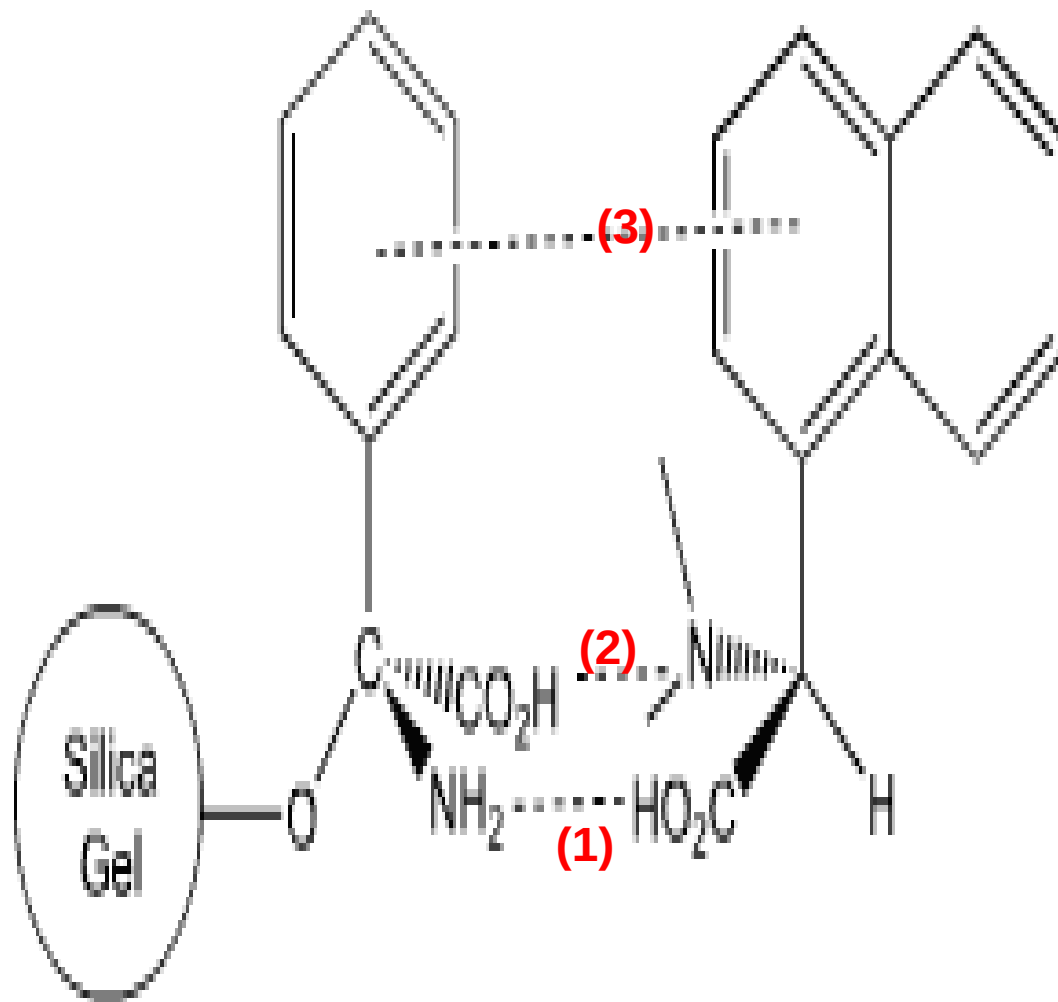
Το μοντέλο των τριών σημείων σύνδεσης για τον διαχωρισμό εναντιομερών σε χειρόμορφη στατική φάση.

Εναντιομερές 1



Εναντιομερές 2
Μόνο δύο από τις ομάδες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον ίδιο τρόπο όπως στο εναντιομερές 1





Εμφάνιση αλληλεπίδρασης τριών σημείων, με τις καρβοξυλομάδες (1) να ευθυγραμμίζονται με τις αμινομάδες (2) και τα αρωματικά να ευθυγραμμίζονται μεταξύ τους με αλληλεπίδραση π-π δεσμών (3). Το εναντιομερές αυτού του διφαινυλίου δεν θα μπορούσε να έχει και τις τρεις αυτές αλληλεπιδράσεις, επειδή οι ομάδες του δεν θα ευθυγραμμίζονταν σωστά και κατά συνέπεια, θα κολλήσει λιγότερο στη χειρόμορφη στάσιμη φάση και θα εκλουστεί πρώτο στη στήλη.

Τύπος χρωματογραφικού διαχωρισμού	Σχόλια
Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reversed Phase Chromatography)	Η στήλη είναι μη πολική και η κινητή φάση είναι ένα πολικό μίγμα νερού με οργανικό διαλύτη (π.χ. ακετονιτρίλιο). Χρησιμοποιείται ευρέως, ειδικά για υδατοδιαλυτά δείγματα.
Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης (Normal Phase Chromatography)	Η στήλη είναι πολική και η κινητή φάση είναι ένα μίγμα λιγότερο πολικών οργανικών διαλυτών (π.χ. εξάνιο κ.λπ.). Χρησιμοποιείται κυρίως για μη υδατοδιαλυτά δείγματα, για παρασκευαστική HPLC και για τον διαχωρισμό ισομερών.
Μη υδατική Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Non-aqueous reversed phase Chromatography)	Η στήλη είναι μη πολική και η κινητή φάση είναι ένα μίγμα οργανικών διαλυτών . Χρησιμοποιείται για πολύ υδρόφοβα, μη υδατοδιαλυτά δείγματα.
Χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης Hydrophilic interaction Chromatography (HILIC)	Η στήλη είναι πολική και η κινητή φάση είναι ένα μίγμα νερού με οργανικό διαλύτη. Είναι χρήσιμη για δείγματα που είναι πολύ πολικά και επομένως δεν κατακρατούνται στην Reversed Phase Chromatography
Χρωματογραφία ιον-ανταλλαγής Ion-exchange chromatography (IEC)	Η στήλη περιέχει φορτισμένες ομάδες που μπορούν να δεσμεύσουν τα αντίθετου φορτίου ιόντα του δείγματος και η κινητή φάση είναι συνήθως ένα υδατικό διάλυμα ενός αλατούχου ρυθμιστικού δ/τος. Είναι χρήσιμη για τον διαχωρισμό ιονίσιμων δειγμάτων όπως οξέα ή βάσεις και ειδικά για τον διαχωρισμό μεγάλων βιομορίων όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα.
Χρωματογραφία ζεύγους ιόντων Ion-pair chromatography (IPC)	Οι συνθήκες της Χρωματογραφίας Αντίστροφης φάσης χρησιμοποιούνται, εκτός από ένα αντιδραστήριο ζεύγους ιόντων που προστίθεται στην κινητή φάση για να αλληλεπιδράσει με τα αντίθετου φορτίου ιόντα του δείγματος. Είναι χρήσιμη για τον διαχωρισμό οξέων ή βάσεων που ασθενώς κατακρατούνται στην Χρ. Αντίστροφης Φάσης.

Εφαρμογές HPLC σε ποσοτικές αναλύσεις φαρμάκων

- Αναλύσεις βασισμένες σε βαθμονόμηση με καμπύλη αναφοράς(εύρος $\pm 20\%$, $r>0.99$)
- Ανάλυση με πρότυπο ενός σημείου
- Ανάλυση με βαθμονόμηση ενός σημείου και εσωτερικό πρότυπο
- Ανάλυση με εκχύλιση

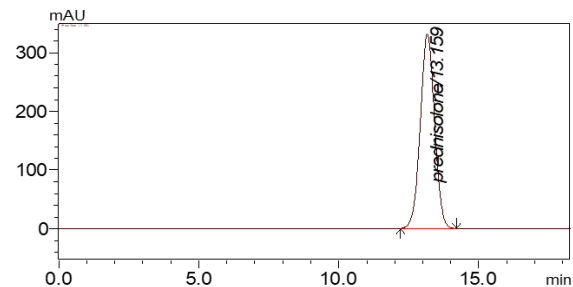
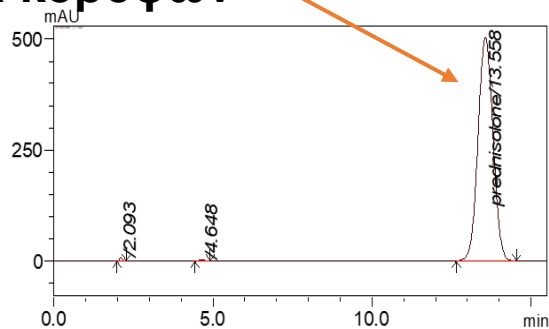
HPLC-UV

Για μετρήσεις ενός προτύπου (Std), και ενός αγνώστου δείγματος (Sm), σε μήκος κύματος λ_i ($b=1\text{cm}$) ισχύει :

$$A_{std,\lambda_i} = \varepsilon_{std,\lambda_i} C_{std}$$

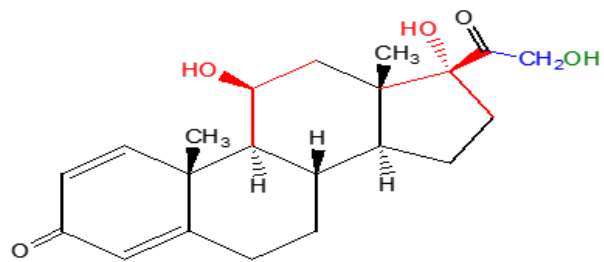
$$A_{sm,\lambda_i} = \varepsilon_{sm,\lambda_i} C_{sm}$$

A:Εμβαδά κορυφών



Διαίρεση κατά μέλη

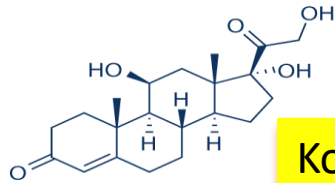
$$\frac{A_{std}}{A_{sm}} = \frac{C_{std}}{C_{sm}} \rightarrow C_{sm} = \frac{A_{sm}}{A_{std}} \times C_{std}$$



prednisolone

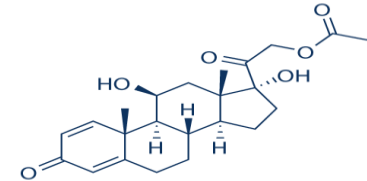


Εσωτερική πρότυπος ουσία



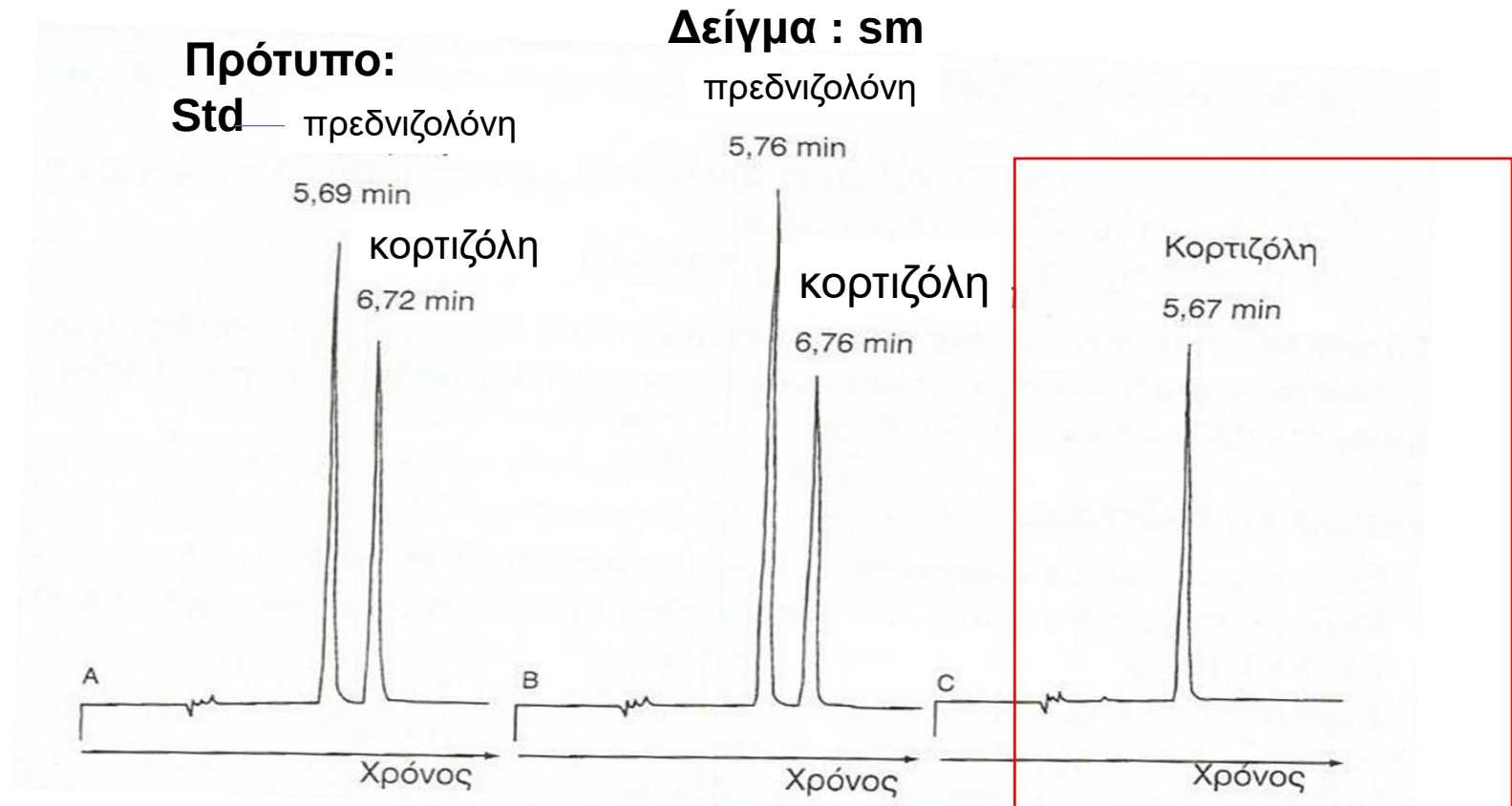
Κορτιζόλη

Οξική πρεδνισολόνη:



- ανήκει στην κατηγορία των κορτικοστεροειδών ορμονών.
- έχει ανάλογη χημική δομή.
- παρουσιάζει παραπλήσιες φυσικοχημικές ιδιότητες.
- παρουσιάζει παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά.
- δεν εκλούεται σε χρόνο πολύ διαφορετικό από αυτόν της προσδιοριζόμενης ουσίας.
- δεν βρίσκεται στα προς ανάλυση δείγματα.

Αναλύσεις με χρήση εσωτερικού προτύπου (Internal standard)



- Η ποσότητα εσωτερικού προτύπου σε πρότυπο και δείγμα είναι η ίδια

Υπολογισμός συγκέντρωσης κορτιζόλης σε άγνωστο δείγμα παρουσία εσωτερικής προτύπου

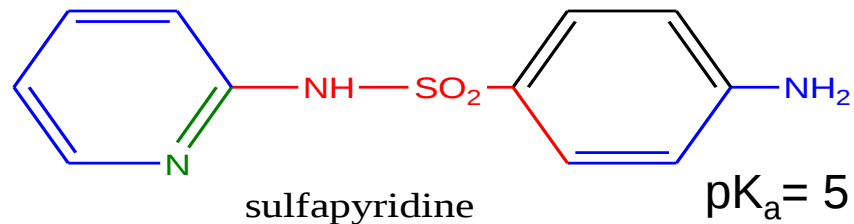
- Η ποσότητα εσωτερικού προτύπου σε πρότυπο και δείγμα είναι η ίδια

$$C_{\text{πρεδνιζ. δείγμα}} = \frac{\text{Παράγων απόκρισης για άγνωστο δείγμα}}{\text{Παράγων απόκρισης για πρότυπο}} \times C_{\text{πρεδνιζολ στο πρότυπο}}$$

Παράγων απόκρισης = Εμβαδόν πρεδνιζολ. / εμβ. εσωτερικής προτύπου

100%	Εμβαδόν πρεδνιζολόνης = 100 Εμβαδ. Εσωτερ. Πρότυπης = 50	100/50=2
80%	Εμβαδόν πρεδνιζολόνης = 80 Εμβαδ. Εσωτερ. Πρότυπης = 40	80/40=2

Εκχύλιση



➤ Σε δισκίο (στερεού-υγρού)

Συνήθως η ουσία ιονίζεται στο κατάλληλο pH (όξινο) και παραλαμβάνεται με υδατικό διαλύτη

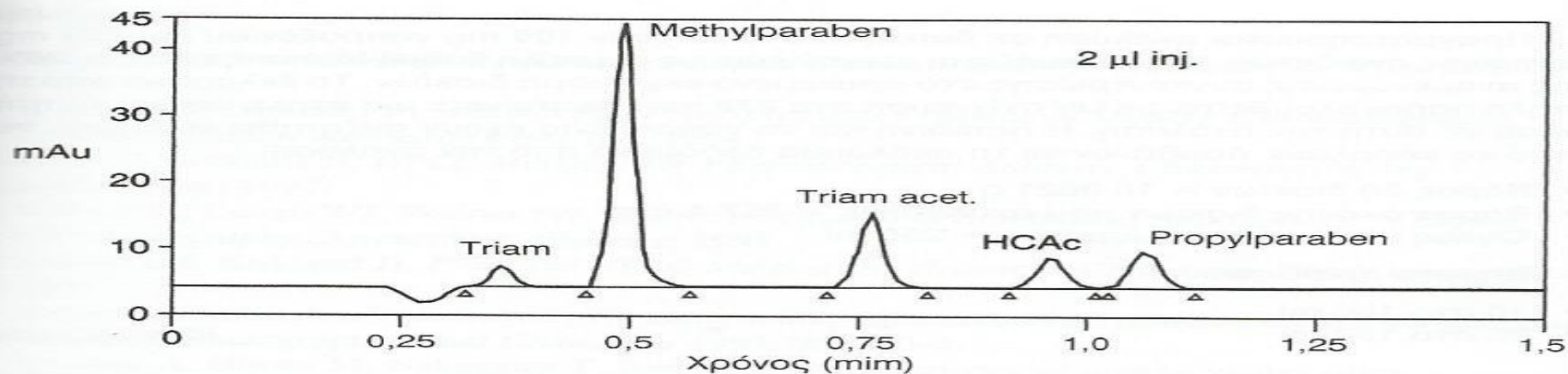
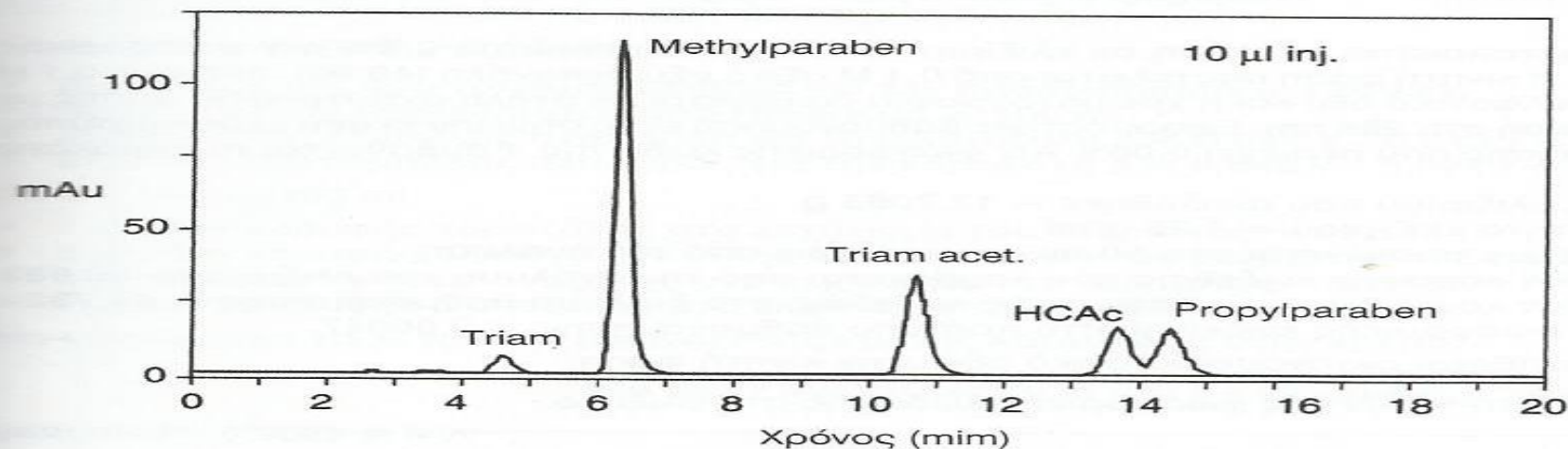
➤ Σε υδρόφιλο σιρόπι (υγρού-υγρού)

Συνήθως η ουσία διατηρείται σε μη ιονιζόμενη μορφή pH (αλκαλικό) και παραλαμβάνεται με οργανικό μη πολικό διαλύτη διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το σιρόπι

➤ Σε αλοιφή (στερεού-υγρού)

Συνήθως η ουσία ιονίζεται στο κατάλληλο pH (όξινο) και παραλαμβάνεται με πολικό οργανικό ή υδατικό διαλύτη

Χρωματογραφία Υπευψηλής Απόδοσης (UPLC)



Χρωματογραφία Υπευψηλής Απόδοσης (UPLC)

