**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Хроматография** |  | **ОФС.1.2.1.2.0001** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.2.0001.15** |

|  |
| --- |
|  |

Хроматографией называется метод разделения смесей веществ, основанный на их многократном перераспределении между двумя контактирующими фазами, одна из которых неподвижна, а другая имеет постоянное направление движения. Неподвижная фаза может быть твёрдым веществом, жидкостью, нанесённой на твёрдый носитель или гелем. Неподвижная фаза может помещаться в колонку или наноситься в виде тонкого слоя или плёнки и т.п. Подвижная фаза может быть газом (ГХ), жидкостью (ЖХ) или сверхкритическим флюидом. По механизму, лежащему в основе разделения, различают адсорбционную, распределительную, ионообменную и другие виды хроматографии.

В настоящее время используют следующие основные хроматографические методы анализа, представленные на рис. 1.

Газовая

Хроматография

Планарная

Колоночная

Тонко-слойная

Бумажная

Жидкостная

Сверхкрити-ческая флюидная

Обращённо-фазовая

Нормально-фазовая

Ионообменная

Ион-парная

Эксклюзионная

Хиральная (энантиоселективная)

Рисунок 1− Методы хроматографического анализа

Результат хроматографического разделения представляют в виде хроматограммы.

Для установления пригодности хроматографической системы и расчёта критериев приемлемости в фармакопейных статьях использованы приведённые ниже определения. Ряд параметров (например, отношение сигнал/шум и разрешение) может быть рассчитан с помощью программного обеспечения, предоставляемого производителем используемого оборудования. Обеспечение соответствия способов расчёта, используемых в программном обеспечении, требованиям Фармакопеи и внесение необходимых поправок в случае их несоответствия входит в ответственность пользователя.

**Хроматограмма и хроматографические параметры**

***Хроматограмма (Chromatogram)*** представляет собой графическое или иное представление сигнала детектора, концентрации веществ в элюате или другой количественной величины, используемой для измерения концентрации веществ в элюате, от времени или объёма подвижной фазы. В планарной (плоскостной) хроматографии хроматограммой называют также зафиксированную на бумаге (бумажная хроматография) или ТСХ-пластинке (тонкослойная хроматография) последовательность зон адсорбции веществ исходной (анализируемой) смеси.

Оптимальная хроматограмма представляет собой последовательность гауссовых пиков на базовой линии (рис. 2).

***Базовая линия (Base line)*** – участок хроматограммы, соответствующий сигналу детектора от подвижной фазы, не содержащей разделяемых веществ.

***Пик (Peak)* –** часть хроматограммы, регистрирующая отклик детектора во время элюирования из колонки одного или более компонентов. Пик отображает постепенное нарастание концентрации детектируемого вещества в элюате и последующее её уменьшение. В случае линейной изотермы сорбции кривая, описывающая пик, приближается к кривой гауссова распределения. Часть пика, на которой зарегистрировано возрастание концентрации вещества до максимума, называется фронтом пика, а часть, которая отвечает уменьшению концентрации вещества, называется тылом (тыльной частью) пика.

***Основание пика (Peak base)*** − продолжение базовой линии, соединяющее начало и конец пика.

***Площадь пика****(S)* ***(Peak area)*** – площадь хроматограммы, заключённая между кривой, описывающей пик, и его основанием.

***Высота пика****(H)* **(*Height of the peak)*** – расстояние от максимума пика до его основания, измеренное параллельно оси отклика детектора.

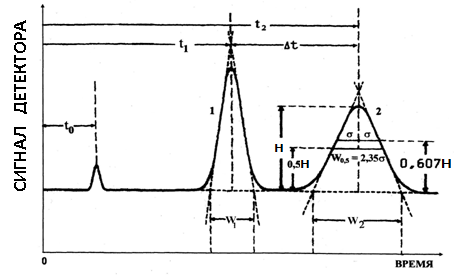


Рисунок 2−Хроматограмма и основные хроматографические параметры.

1 и 2 – пики соединений 1 и 2; *t*1 и *t*2 – соответствующие времена удерживания; *t*0 – время удерживания несорбирующегося вещества; *W*1 и *W*2 – ширина пиков у основания; *W*0,5 – ширина пика на половине его высоты,  – стандартное отклонение пика (предполагается гауссова форма пиков)

***Зона адсорбции* –** часть хроматографической пластинки, содержащая адсорбированное определяемое вещество и визуализируемая в виде пятна (круглого или эллипсовидного) или полосы.

**Интерпретация хроматографических данных**

***Время удерживания (tR или t)*** (***Retentiontime)*** – время, необходимое для элюирования вещества. Соответствует времени появления максимума пика на хроматограмме.

***Объём удерживания (VR)*** (***Retention volume)***– объём подвижной фазы, необходимый для элюирования вещества. Может быть вычислен по времени удерживания и скорости потока (*F*).

Объём удерживания, в отличие от времени удерживания, не зависит от скорости потока.

***Время удерживания неудерживаемого вещества (t0) или мёртвое время (tM) (Hold-up time (tM) или Retention time of an unretained compound (tо))*** (рис. 3) – время, необходимое для элюирования неудерживаемого на сорбенте вещества. В эксклюзионной хроматографии – (*t0)*, соответствует времени удерживания веществ, размер молекул которых больше, чем наибольшие поры сорбента.

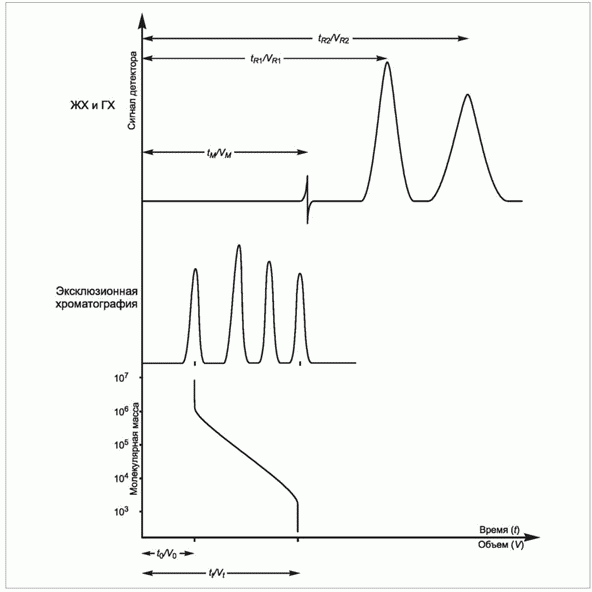


Рисунок 3 – Временные/объёмные показатели хроматограмм

***Объём удерживания неудерживаемого вещества (V0) или мёртвый объём (VM) (Hold-up volume (VM) или Retention volume of an unretained compound (Vо))*** – объём подвижной фазы, необходимый для элюирования неудерживаемого вещества. Может быть вычислен по времени удерживания неудерживаемого вещества и скорости потока (*F*):

В эксклюзионной хроматографии (*V0),* соответствует объёму удерживания веществ, размер молекул которых больше, чем наибольшие поры сорбента и соответствует объёму пространства между частицами сорбента в колонке (межгранульному объёму).

***Время удерживания вещества, проникающего во все поры (tt) (Total mobile phase time)*** – в эксклюзионной хроматографии время удерживания веществ, молекулы которых меньше, чем наименьшие поры сорбента, и которым доступен весь объём пор сорбента.

***Общий объём подвижной фазы (Vt) (Total mobile phase volume)*** – в эксклюзионной хроматографии объём удерживания веществ, молекулы которых меньше, чем наименьшие поры сорбента и которым доступен весь объём пор сорбента. Он соответствует общему свободному объёму колонки (сумме межгранульного объёма и объёма пор сорбента) и может быть вычислен по общему времени удерживания вещества, проникающего во все поры сорбента, и скорости подвижной фазы (*F*):

***Константа (коэффициент) распределения (K0)* (*Distribution constant)*** – в эксклюзионной хроматографии характеристика элюирования вещества из определенной колонки, которую рассчитывают с помощью выражения:

***Приведённое (исправленное) время удерживания вещества (t′R) (Adjusted retention time)* ‒** время удерживания вещества за вычетом времени удерживания несорбирующегося вещества. Может быть рассчитано по формуле:

Исправленное время удерживания не зависит от объёма капилляров хроматографической системы, установленных между инжектором и колонкой, и между колонкой и детектором.

***Относительное время удерживания (r) (Relative retention)***– относительное приведённое (исправленное) время удерживания вещества 2 по веществу 1:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | время удерживания пика вещества 1; |
|  |  | – | время удерживания пика вещества 2; |
|  |  | – | время удерживания несорбирующегося вещества. |

***Нескорректированное относительное время удерживания (RRT) (Relative retention, unadjusted (RRT))***– относительное время удерживания вещества 2 по веществу 1:

Если нет других указаний, значения относительного времени удерживания, указанные в методике приведённые в фармакопейных статьях, соответствуют нескорректированному относительному времени удерживания.

***Коэффициент ёмкости или фактор удерживания****(****k′) (Retention factor)* –** коэффициент ёмкости колонки по веществу с временем удерживания *tR,* показывающий, во сколько раз исправленное время удерживания вещества больше, чем время удерживания несорбирующегося вещества.

***Эффективность* (*Plate number)*** хроматографической системы ‒ параметр, характеризующий степень размывания хроматографического пика**.** Эффективность выражается числом теоретических тарелок (N) (Number of theoretical plates):

или

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | время удерживания пика вещества; |
|  |  | – | ширина пика у основания; |
|  |  | – | ширина пика на половине высоты. |

При расчёте числа теоретических тарелок значения времени удерживания и ширины пика должны быть приведены к одинаковой размерности.

Число теоретических тарелок зависит от природы определяемого вещества, его концентрации и объёма, вводимого в систему, от колонки, температуры колонки, состава и скорости подвижной фазы, от внеколоночного размывания.

***Высота, эквивалентная теоретической тарелке (H) (Plate height (H) (synonym: Height equivalent to one theoretical plate (HETP))*** равна отношению длины колонки (*L*), выраженной в мкм к числу теоретических тарелок (*N*).

***Приведённая высота, эквивалентная теоретической тарелке (h)* (*Reduced plate height)*** равна отношению высоты, эквивалентной теоретической тарелке (*H*), выраженной в мкм к диаметру частиц, выраженному в мкм (*dp*).

Если нет других указаний, то эффективность хроматографической системы, требования к которой приведено в фармакопейной статье, рассчитывается по формуле, использующей ширину пика на половине его высоты.

***Фактор асимметрии (фактор симметрии) пика (As)* (*Symmetry factor)*** – характеристика симметричности пика, рассчитываемаяпо формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | ширина пика на 5 % (1/20) его высоты; |
|  |  | – | расстояние между перпендикуляром, опущенным из вершины пика, и восходящей стороной пика на 5 % его высоты (рис. 4). |

Если фактор асимметрии равен 1, то пик симметричен. Если фактор асимметрии больше 1, то это означает, что растянут тыл пика. Если фактор асимметрии меньше 1, то растянут фронт пика.

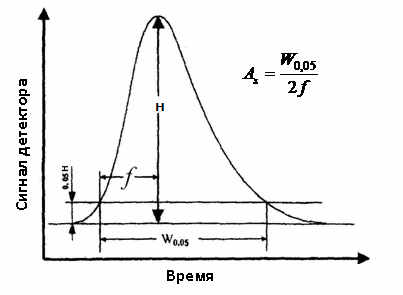


Рисунок 4 − Схема расчёта фактора асимметрии пика

***Разрешение (Rs) (Resolution)***

Разрешение между пиками двух веществ смеси рассчитывают по формулам:

или

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  |  |  |
|  |  | – | времена удерживания пиков; |
|  |  | – | ширина пиков у основания; |
|  |  | – | ширина пика на половине его высоты. |

В количественной планарной хроматографии с использованием денситометрии расстояния миграции используются вместо времени удерживания, и разрешение между пиками 2 компонентов может быть рассчитано с использованием следующего уравнения:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  |  |  |
|  |  | – | факторы замедления пиков; |
|  |  | – | ширина пиков на половине его высоты; |
|  |  | – | расстояние от линии старта до линии фронта элюента. |

При расчёте разрешения величины времени удерживания и ширины пиков должны быть приведены к одинаковой размерности.

Если нет других указаний, то разрешение, требования к которому приведены в фармакопейной статье, рассчитывается по формуле, использующей ширину пиков на половине высоты.

В случае, если пики несимметричны и если высота пиков значительно различается, параметр *Rs* не всегда корректно описывает разделение хроматографических пиков. Таким образом, даже при значениях *Rs* ≥ 1,5 может наблюдаться неполное разделение пиков. В этих случаях при оценке разделяющей способности можно заменить параметр *Rs* на параметр «отношение максимум/минимум».

***Отношение максимум/минимум (p/v) (Peak-to-valley ratio)***, называемое также отношением «пик/долина», «пик/впадина», рассчитывается по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *Hp* | – | высота меньшего пика относительно экстраполированной базовой линии; |
|  |  | – | высота низшей точки (долины) кривой, разделяющей пики, относительно экстраполированной базовой линии (рис. 5). |

*Hp*

*Hv*

Рисунок 5 − Хроматограмма не полностью разделяемых веществ

Данное соотношение применяется для оценки разделительной способности хроматографической системы, если вещества смеси разделяются не полностью (не до базовой линии). Рассчитанное отношение максимум/минимум в значительной степени зависит от выбранного варианта интегрирования хроматограммы. Расчёт соотношения p/v невозможен в случае разметки меньшего пика в виде пика-наездника.

***Отношение сигнал/шум (S/N)* (*Signal-to-noise ratio)***

Краткосрочный шум сигнала детектора (шум базовой линии) влияет на прецизионность количественного определения. Отношение сигнал/шум рассчитывают по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | Н | – | высота пика, соответствующего рассматриваемому веществу на хроматограмме указываемого стандартного раствора, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии. Экстраполяция базовой линии проводится для сигнала на участке базовой линии во временном интервале, продолжительность которого равна 5 - кратному значению ширины пика на его полувысоте; |
|  | h | – | размах фонового шума, измеряемый либо на хроматограмме холостого раствора (или раствора плацебо), либо на хроматограмме того же раствора стандартного образца. |

Измерение размаха фонового шума проводится во временном интервале, продолжительность которого равна 5 – кратному значению ширины пика на его полувысоте, расположенном, если это возможно, равномерно по обе стороны от места возможного обнаружения пика. В случае использования для измерения шума хроматограммы холостого раствора (или раствора плацебо) измерение размаха фонового шума проводится во временном интервале, включающем в себя время удерживания рассматриваемого вещества (рис. 6).

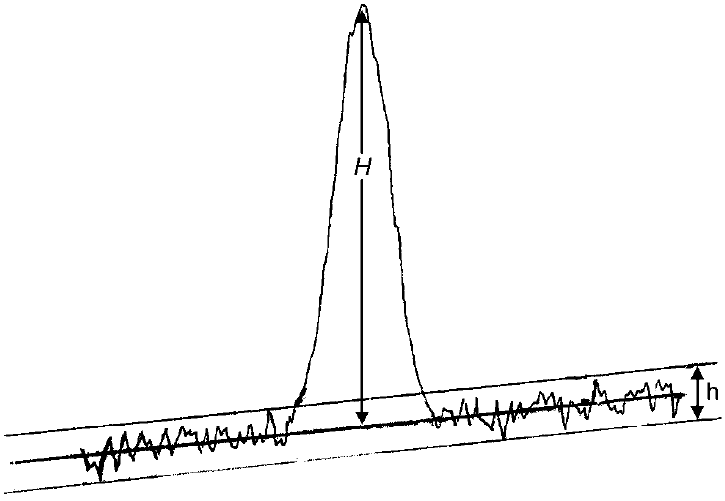


Рисунок 6 − Вычисление отношения сигнал/шум

***Объём задержки градиента (*D*) (Dwell volume (D) (так же referred to as VD))*** представляет собой объём системы между точкой, в которой происходит смешение элюентов, и входом в колонку.

Объём задержки градиента влияет на времена удерживания веществ и общий профиль хроматограммы, получаемой при использовании градиентного элюирования. Объём задержки градиента хроматографической системы может быть определён в приведённых ниже условиях.

Колонка. Заменяют хроматографическую колонку капилляром (например, 1 м × 0,12 мм).

*Подвижная фаза A (ПФА).*Вода.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетона раствор 0,1 %.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФA, % | ПФБ, % |
| 0–20 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 20–30 | 0 | 100 |

Скорость потока. Необходимая для создания давления, достаточного для стабильной работы насоса (например, 2 мл/мин).

Детектор. Спектрофотометрический при длине волны 265 нм.

Определяют время (*t0,5*) в минутах, когда оптическая плотность увеличилась на 50 % (рис. 7). Вычисляют объём задержки градиента:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | , мин; | | |
|  | tG | – | время градиента (20 мин); |
|  | F | – | скорость потока, мл/мин. |

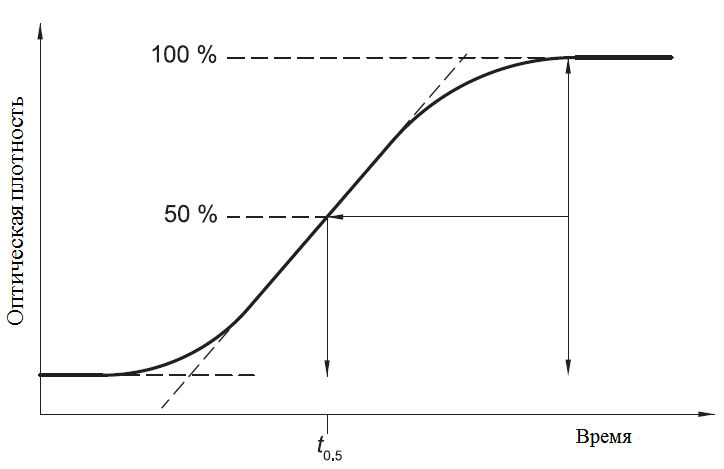


Рисунок 7 − Определение объёма задержки градиента

***Прецизионность системы в условиях повторяемости (System repeatability)***

Прецизионность системы в условиях повторяемости выражается в виде рассчитанного относительного стандартного отклонения в процентах (RSD, %) по результатам последовательных измерений аналитического сигнала (площади или высоты пика, отношения площадей пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта) для не менее чем трёх введений или нанесений раствора сравнения и рассчитывается по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | среднее значение аналитического сигнала; |
|  |  | – | результаты единичных измерений аналитического сигнала; |
|  |  | – | число измерений. |

В планарной хроматографии характеристикой удерживания является фактор замедления (используется так же как «фактор удерживания») *(Rf)* (Retardation factor):

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | расстояние от точки нанесения пробы до центра пятна, характеризующего зону адсорбции; |
|  | *b* | – | расстояние от линии старта до линии фронта элюента. |

На экспериментально определяемые значения *Rf* заметно влияют условия хроматографирования. Оценкой хроматографической подвижности, менее чувствительной к влиянию отклонений в условиях проведения эксперимента, является величина *Rs* (Relative retardation), представляющая собой отношение величины *Rf* одного вещества к величине *Rf* другого, принятого за стандарт:

Величины *Rf* и *Rs* используют для идентификации веществ. Обычно выбор стандарта осуществляется так, чтобы значение *Rs* определяемого вещества было в пределах от 0,5 до 2,0. Схема определения этих величин приведена на рис. 8.

1

2

*ast*

*b*

*a*

**ЛИНИЯ ФРОНТА**

**СТАНДАРТ**

**ЛИНИЯ СТАРТА**

**УРОВЕНЬ ЭЛЮЕНТА**

**ОПРЕДЕЛЯЕМОЕ  
ВЕЩЕСТВО**

Рисунок 8−Схема определения значений *R*f и *Rs*

– место нанесения образца на линию старта; 1 – испытуемое вещество (*а*); 2 – вещество-стандарт (*ast*); *b* – расстояние от линии старта до линии фронта элюента.

Данные планарной хроматографии могут быть представлены в виде денситограмм.

**Расчёт содержания определяемых веществ**

При расчётах содержания определяемых веществ пики растворителей и реактивов, подвижной фазы или среды (матрицы) образца не учитывают.

Существуют 4 основных метода расчёта концентрации вещества по хроматографическим данным.

***1. Метод нормирования (метод внутренней нормализации).*** Применение данного метода основано на предположении, что на хроматограмме зарегистрированы все вещества, входящие в состав анализируемой смеси, и что доля площади каждого пика от суммы площадей всех пиков в процентах соответствует содержанию вещества в массовых процентах. Содержание каждого веществав смеси в процентах может быть вычислено по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | площадь (высота) *i*-го пика; |
|  |  | – | сумма площадей всех учитываемых пиков на хроматограмме. |

Если чувствительность детектора различна по отношению к каждому из веществ, то вводят поправочные коэффициенты . Относительный коэффициент отклика детектора (относительный фактор отклика, RRF) характеризует чувствительность детектора для данного вещества относительно стандартного вещества. Поправочный коэффициент – это число, обратное относительному фактору отклика.

Поправочные коэффициенты рассчитывают относительно основного вещества анализируемой смеси или другого стандартного вещества по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | и | – | концентрация *i*-го вещества и стандартного вещества соответственно; |
|  | и *S*0 | – | площадь пика *i*-го вещества и стандартного вещества соответственно. |

Данные коэффициенты могут не учитываться в случае, если они находятся в пределах диапазона 0,8–1,2.

При использовании поправочных коэффициентов выражение для расчёта содержания приобретает вид:

При проведении испытания на примеси методом нормализации или методом внешнего стандарта с использованием разведения раствора испытуемого образца в качестве раствора сравнения учитывают все указанные в методике поправочные коэффициенты, значение которых выходит за пределы диапазона 0,8–1,2.

***2. Метод внешнего стандарта.*** Концентрацию испытуемого вещества определяют путём сравнения сигнала (площади или высоты пика), полученного на хроматограммах испытуемого раствора, и сигнала (площади или высоты пика), полученного на хроматограммах раствора стандартного образца. Предпочтительно использовать площадь пика. Использование высоты пика должно быть обосновано.

Концентрацию определяемого вещества в испытуемом растворе рассчитывают по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S* и *S*0 | – | средние значения площадей (высот) пиков на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов соответственно; |
|  | *С* и *С*0 | – | концентрации определяемого вещества в испытуемом и стандартном растворах соответственно. |

Количественное определение содержания примесей методом внешнего стандарта предпочтительнее проводить с использованием стандартных растворов примесей с концентрациями, близкими к их ожидаемым концентрациям в испытуемом растворе.

В качестве раствора стандартного образца для количественного определения примесей возможно использование раствора основного вещества. В этом случае разведение подбирается таким образом, чтобы концентрация основного соединения в растворе стандартного образца по отношению к его концентрации в испытуемом растворе была близка к ожидаемой концентрации примесей в испытуемом растворе. При этом следует учесть относительные факторы отклика примесей (по отношению к основному веществу), если их значения выходят за рамки 0,8−1,2.

Эмпирическую зависимость измеренного или обработанного сигнала (*у*) от количества (концентрации, массы или объёма) определяемого вещества (*х*) аппроксимируют уравнением калибровочной функции (**) подходящего вида. Результаты испытания рассчитывают из измеренного или обработанного сигнала с помощью обратной функции (**).

***3. Метод внутреннего стандарта.*** Концентрацию вещества определяют путём сравнения отношения сигналов (площадей или высот пиков), соответствующих определяемому веществу и внутреннему стандарту, на хроматограмме испытуемого раствора и отношения сигналов (площадей или высот пиков), соответствующих определяемому веществу и внутреннему стандарту, на хроматограмме раствора стандартного образца. В испытуемый и стандартный растворы вводят одинаковые количества внутреннего стандарта, хроматографируют растворы и определяют отношения площадей (высот) пиков определяемого вещества к площади (высоте) пика внутреннего стандарта в испытуемом и стандартном растворах.

Концентрацию определяемого вещества (*Х*) рассчитывают по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | отношение площади (высоты) пика определяемого вещества к площади (высоте) пика внутреннего стандарта в испытуемом растворе; |
|  |  | – | отношение площади (высоты) пика определяемого вещества к площади (высоте) пика внутреннего стандарта в растворе стандартного образца; |
|  |  | – | концентрация определяемого вещества в растворе стандартного образца. |

В качестве внутреннего стандарта выбирается вещество, отсутствующее в испытуемой пробе, не взаимодействующее с определяемым веществом и другими веществами пробы, обладающее достаточной стабильностью, полностью отделяющееся от веществ пробы и не содержащее примесейс временами удерживания, совпадающими с временем удерживания определяемого вещества. Концентрация внутреннего стандарта должна быть близка к концентрации определяемых веществ, а структура и свойства по возможности аналогичны структуре и свойствам определяемых веществ.

***4. Метод стандартных добавок.*** Концентрация вещества определяется путём сравнения сигнала (площади или высоты пика), соответствующего этому веществу, на хроматограмме испытуемого раствора, и сигнала (площади или высоты пика) определяемого вещества на хроматограмме испытуемого раствора с известной добавкой определяемого вещества. При внесении стандартной добавки стараются минимизировать разбавление испытуемого образца, чтобы измерения раствора со стандартной добавкой и без добавки проходили в одинаковых условиях с одинаковым влиянием матрицы. Количество вводимого в стандартной добавке определяемого вещества должно быть соизмеримо с его предполагаемым содержанием в испытуемом образце. После проведения испытания сравнивают полученные значения сигнала детектора и рассчитывают содержание определяемого вещества по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | концентрация стандартной добавки; |
|  |  | – | площадь (высота) пика определяемого вещества для испытуемого раствора без стандартной добавки; |
|  |  | – | площадь (высота) пика определяемого вещества для испытуемого раствора со стандартной добавкой. |

При необходимости формулу корректируют с учётом разбавлений испытуемого раствора за счёт введения стандартной добавки.

**Рекомендации по разметке и интегрированию хроматограмм при определении примесей**

Если нет других указаний, в испытаниях на содержание примесей в качестве порога игнорирования (reporting threshold) (содержания вещества, ниже которого его пик не учитывают) принимают величину 0,05 % от содержания основного вещества.

В случаях, когда при испытании на примеси требуется определение суммарного содержания примесей или количественное определение примеси, при интерпретации хроматограммы важно выбрать подходящие условия интегрирования и значение порога интегрирования (интенсивность сигнала пика соединения в виде высоты или площади), при котором (и при меньшем) пик не учитывается системой сбора данных и не участвует в количественных расчётах.

С целью разметки на хроматограмме всех пиков, подлежащих учёту, заданный порог интегрирования системы сбора данных не должен превышать величины сигнала, соответствующей половине порога игнорирования.

Интегрирование площади пика любой примеси, пик которой не полностью разделяется с основным пиком, в общем случае проводится в виде пика-наездника. Использование других способов интегрирования должно быть специально оговорено в методике.

**Оценка пригодности хроматографической системы**

Данный раздел применим для жидкостной и газовой хроматографии.

Испытания пригодности системы являются неотъемлемой частью методики и используются для того, чтобы убедиться в надлежащем функционировании хроматографической системы и обеспечить выполнение предъявляемых к ней требований.

При проведении испытаний используемое оборудование должно быть квалифицировано и способно к функционированию надлежащим образом.

Для оценки пригодности системы указывают:

- требования к параметрам, характеризующим форму пика (эффективность хроматографической системы *N* и фактор асимметрии, *As*);

- требования к разделительной способности (разрешение между пиками *RS* или отношение «пик/долина» *p/v* (при неполном разделении пиков));

- требования к повторяемости (относительное стандартное отклонение, *RSD*) значений площади или высоты пиков, а также времен удерживания пиков в случае оценки подлинности соединений;

- требования к чувствительности при проведении испытания на примеси (минимально определяемая концентрация, нижний предел количественного определения примеси (ПКО)). Кроме того, оценка чувствительности требуется при анализе профиля хроматограммы, который содержит множественные пики различной интенсивности, и к которому предъявляются строгие требования к наличию или, наоборот, отсутствию тех или иных идентифицированных и/или неидентифицированных малоинтенсивных пиков. В общем случае оценивается посредством расчёта отношения сигнал/шум для раствора соответствующей концентрации.

Дополнительные требования оценки пригодности системы приводятся в методике и определяются спецификой проводимого испытания.

Если в методике нет других указаний, должны выполняться следующие нормы и все дополнительные требования, приведённые в фармакопейной статье:

- в испытаниях на примеси или количественное содержание для пика на хроматограмме раствора стандартного образца, используемого для количественных определений, значение величины фактора асимметрии *As* должно находиться в пределах от 0,8 до 1,8;

- разрешение между пиками *Rs* ≥ 1,5 для критичной пары (пар) пиков (в случае не полностью разделённых пиков вместо разрешения предпочтительно использование соотношения *p/v;* при этом нормы к минимальному значению соотношения *p/v* устанавливаются в фармакопейной статье);

- отношение сигнал/шум для пика вещества, полученное для раствора с концентрацией, равной требуемому уровню минимально определяемой концентрации, должно быть не менее 10.

Требуемый уровень минимально определяемой концентрации (предел количественного определения, ПКО) зависит от того, предполагает ли методика вычисление содержания примесей, или только полуколичественную оценку, когда результат представляется в виде «менее *Х*» или «не более *Х*», где *Х* – допустимое содержание примеси. Для методик, предполагающих вычисление содержания примесей, ПКО не должен превышать значение порога игнорирования (если нет других указаний – 0,05 % относительно концентрации основного вещества в испытуемом растворе). Для полуколичественных методик ПКО не должен превышать максимально допустимое содержание примеси. При необходимости оценки содержания нескольких примесей требуемый ПКО определяется примесью, нормы содержания которой наиболее строги. В случаях, когда факторы отклика примесей отличаются, и для примеси с меньшим допустимым содержанием наблюдается больший поправочный коэффициент, в первую очередь принимают во внимание факторы отклика примесей с учётом которых готовят растворы для оценки чувствительности хроматографической системы. При этом, если наименьшее допустимое содержание соответствует одновременно нескольким примесям, для оценки чувствительности выбирают ту примесь, которой соответствует наибольший поправочный коэффициент. Если в фармакопейной статье нет других указаний, то раствор вещества минимально определяемой концентрации для оценки чувствительности детектирования можно приготовить растворением стандартного образца в том же растворителе, который используется для приготовления испытуемого раствора или разбавлением испытуемого раствора тем же растворителем, с уровнем концентрации 0,05 % относительно концентрации основного вещества в испытуемом растворе.

В некоторых случаях для оценки чувствительности может быть применён раствор стандартного образца (или разбавленный испытуемый раствор) с большей концентрацией, чем порог игнорирования, с пропорциональным увеличением требований к значению отношения «сигнал/шум» для целевого пика.

**Требования к прецизионности системы в условиях повторяемости при количественном определении основного вещества в фармацевтических субстанциях или вспомогательных веществах**

При количественном определении основного вещества в фармацевтических субстанциях, содержание которого близко к 100 %, максимально допустимое относительное стандартное отклонение значений интенсивности (площади или высоты) пика основного вещества для заданного количества повторных последовательных введений стандартного раствора *x* вычисляется по формуле:

Где  – константа (0,349), полученная из выражения:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | в котором множитель соответствует значению после 6 повторных инжекций для *В* = 1,0; | | |
|  | *В* | – | верхний предел содержания основного вещества, приведённый в фармакопейной статье, минус 100 %; |
|  | *n* | – | число повторных введений стандартного раствора, (3 ≤ *n* ≤ 6); |
|  |  | – | коэффициент Стьюдента (двусторонний) при доверительной вероятности 90 % с *n*–1 степенью свободы. |

Если в фармакопейной статье нет других указаний, то значение *RSD* не должно превышать величин *RSDmax*, приведённых в таблице 1.

Таблица 1 – Максимально допустимое относительное стандартное отклонение *RSDmax* в зависимости от верхнего предела содержания и числа повторных введений проб

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| В, % | Число повторныхвведений проб | | | |
| 3 | 4 | 5 | 6 |
| Максимально допустимое относительное стандартное отклонение *RSDmax* | | | |
| 2,0 | 0,41 | 0,59 | 0,73 | 0,85 |
| 2,5 | 0,52 | 0,74 | 0,92 | 1,06 |
| 3,0 | 0,62 | 0,89 | 1,10 | 1,27 |

Соответствие критериям пригодности системы должно поддерживаться на протяжении всего испытания. В зависимости от различных факторов, например, частоты использования методики и опыта работы с хроматографической системой, аналитик выбирает соответствующую схему проверки, подтверждающую соответствие этим требованиям.

В планарной хроматографиипри проведении испытаний, регламентирующих наличие посторонних примесей/родственных соединений, должны быть предусмотрена оценка предела обнаружения примесей и разделительной способности хроматографической системы.

Для подтверждения пригодности системы возможно одновременное использование двух испытаний: «Подтверждение разделительной способности» и «Подтверждение чувствительности».

Подтверждение разделительной способности проводят путём нанесения на пластинку и последующего хроматографирования специального стандартного раствора, содержащего два или более веществ с известными значениями *R*f. После хроматографирования эти вещества должны разделиться, образуя зоны адсорбции, значения *R*f которых соответствуют допустимым диапазонам.

Подтверждение чувствительности позволяет оценить чувствительность проявления и заключается в нанесении определённого количества стандартного образца хроматографируемого в условиях предыдущего испытания и проявляемого тем же реагентом. Зона адсорбции стандартного образца должна чётко обнаруживаться.

В каждом случае используемые стандартные образцы, состав стандартного раствора, наносимые количества, приблизительные значения *R*f указывают методиках испытаний.

При необходимости для достижения требуемых критериев пригодности хроматографической системы проводится корректировка хроматографических условий.

**Корректировка условий хроматографирования**

Приведённые в методике хроматографические условия валидируют при её разработке. Тем не менее, для выполнения требований пригодности хроматографической системы на практике может потребоваться корректировка указанных условий.

Далее приводятся допустимые пределы изменений различных параметров хроматографической методики, которые могут быть внесены в неё аналитиком. При внесении изменений, выходящих за указанные ниже пределы, требуется ревалидация (повторная валидация) методики.

Многочисленные корректировки могут оказывать кумулятивное воздействие на работоспособность системы и должны быть правильно оценены пользователями. Это особенно важно в тех случаях, когда хроматограмма подлежит сравнению с хроматографическим профилем в методике.

Для проверки того, что обеспечены условия для приемлемого выполнения испытания, необходимо подтверждение соответствия критериям пригодности системы.

Корректировка условий градиентного элюирования (ВЭЖХ) или температурной программы (ГХ) является более критичной, чем изократических (ВЭЖХ) или изотермических (ГХ) условий, так как может вызвать сдвиг пиков на другую стадию градиента или температурной программы и, таким образом, привести к наложению пиков, изменению порядка элюирования, некорректной идентификации и маскировке пиков или к таким сдвигам, при которых элюирование интересующих соединений происходит после указанного времени регистрации хроматограммы.

Для некоторых параметров методики корректировки с целью достижения пригодности системы могут быть указаны непосредственно в методике.

Если в методике нет других указаний, допустимы следующие изменения параметров хроматографической системы.

***Тонкослойная хроматография***

Состав подвижной фазы: количество растворителя, содержание которого в смеси наименьшее, может изменяться в пределах ±30 % (относительное изменение) или ±2 % (абсолютное изменение) в зависимости от того, какая из величин будет больше. Содержание других веществ не может быть изменено по абсолютной величине более чем на 10 %. Наименьшим компонентом считается тот, содержание которого не превышает 100/n процентов, где n – общее число компонентов подвижной фазы.

Пример 1: для вещества, содержание которого составляет 10 % подвижной фазы, относительное изменение содержания на 30 % соответствует абсолютному изменению содержания на 3 % (диапазон содержаний 7–13 %), что больше 2 % (диапазон содержаний 8–12 %). Таким образом, допускается содержание наименьшего компонента в диапазоне 7–13 %.

Пример 2: для вещества, содержание которого составляет 5 % подвижной фазы, относительное изменение содержания на 30 % соответствует абсолютному изменению содержания на 1,5 % (диапазон содержаний 3,5–6,5 %), что меньше 2 % (диапазон содержаний 3–7 %). Таким образом, допускается содержание наименьшего компонентов диапазоне 3–7 %.

pH водного компонента подвижной фазы: ±0,2 единицы pH, если в фармакопейной статье не указано иначе.

Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: ±10 %.

Объём наносимой пробы: ±20 % от заявленного объёма при использовании пластинок с малым размером частиц сорбента (2–10 мкм).

*Жидкостная хроматография: изократическое элюирование*

Неподвижная фаза:

- замена типа неподвижной фазы недопустима (например, недопустима замена фазы С18 на фазу С8); физико-химические параметры альтернативных фаз должны быть сходными; переход от полностью пористых частиц к поверхностно-пористым возможен при соблюдении указанных выше требований.

Размеры колонки и частиц:

- размер частиц и/или длина колонки могут быть изменены при условии, что отношение длины колонки к размеру частиц остаётся постоянным или изменяется на величину до –25 % от предписанного значения. При переходе от полностью пористых частиц к поверхностно-пористым можно использовать другие комбинации длины колонки и размера частиц, при условии, что число теоретических тарелок изменяется на величину до –25 % по сравнению с результатами, полученными для исходной колонки; эти изменения допустимы при условии выполнения требований пригодности системы и сохранении селективности и порядка выхода примесей, подлежащих контролю;

- внутренний диаметр колонки может быть изменён при условии выполнения требований пригодности системы.

В случае, если в результате корректировки условий хроматографического разделения ширина зоны элюирующегося вещества в единицах объёма уменьшается вследствие меньшего размера частиц или меньшего внутреннего диаметра колонки, что могут потребоваться действия, направленные на минимизацию внеколоночного уширения пиков под влиянием таких факторов, как диаметр капилляров прибора и их соединения, объём ячейки детектора, частота сбора данных детектором и объём вводимой пробы.

При изменении размера частиц требуется регулировка скорости потока, поскольку колонки с меньшими частицами требуют более высоких линейных скоростей для достижения той же эффективности (выраженной через приведенную высоту, эквивалентную теоретической тарелке). При изменении размера частиц и диаметра колонки скорость потока пересчитывают, используя следующее уравнение:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | скорость потока, указанная в методике, мл/мин; |
|  |  | – | скорректированная скорость потока, мл/мин; |
|  | c1 | − | внутренний диаметр колонки, указанный в методике, мм; |
|  | c2 | – | внутренний диаметр используемой колонки, мм; |
|  |  | – | размер частиц, указанный в методике, мкм; |
|  |  | – | размер используемыхчастиц, мкм. |

При переходе от частиц размером ≥ 3 мкм к частицам размером < 3 мкм при изократическом элюировании может быть оправдано дополнительное увеличение линейной скорости (путём регулирования скорости потока) при условии, что эффективность колонки не снизится более чем на 20 %. Аналогично, при переходе от частиц размером < 3 мкм к частицам размером ≥ 3 мкм может быть оправдано дополнительное снижение линейной скорости во избежание снижения эффективности колонки более чем на 20 %.

После корректировки, связанной с изменением размеров колонки, допускается дополнительное изменение скорости потока на ±50 %.

Температура колонки: ±10 °C от указанной рабочей температуры.После корректировки параметров колонки и скорости потока может потребоваться дополнительная корректировка условий аналитической методики (подвижной фазы, объёма пробы и др.) в пределах допустимых диапазонов, описанных в разделах «Пригодность хроматографической системы» и «Корректировка условий хроматографирования».

Состав подвижной фазы: количество растворителя, содержание которого в смеси наименьшее, может изменяться в пределах ±30 % (относительное изменение) или ±2 % (абсолютное изменение) в зависимости от того, какая из величин будет больше (см. примеры для тонкослойной хроматографии). Наименьшим компонентом считается тот, содержание которого менее 100/n процентов, где n – общее число компонентов подвижной фазы.

pH водного компонента подвижной фазы: ±0,2 единицы pH. Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: ± 10 %.

Скорость потока подвижной фазы: ± 50 % при отсутствии изменений параметров колонки. При одновременном изменении размеров колонки допустима большая степень изменений. При необходимости одновременного изменения размеров колонки и скорости потока сначала рассчитывается номинальная скорость потока для колонки, размеры которой отличаются от приведённой в методике, а затем допускается корректировка полученного значения скорости потока на ± 50 %.

Длина волны детектора*:* изменения не допускаются.

Объём вводимой пробы*.* При изменении размеров колонки для корректировки объёма ввода пробы можно использовать следующее уравнение:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | объём ввода пробы, указанный в методике, мкл; |
|  |  | – | скорректированная объём ввода пробы, мкл; |
|  |  | – | длина колонки, указанная в методике, мм; |
|  |  | – | длина используемой колонки, мм; |
|  | c1 | − | внутренний диаметр колонки, указанный в методике, мм; |
|  | c2 | – | внутренний диаметр используемой колонки, мм. |

Это уравнение может быть неприменимо при замене колонок с полностью пористыми частицами на колонки с поверхностно-пористыми частицами.

Даже при отсутствии изменения размеров колонки объём ввода пробы может быть изменён при условии, что критерии пригодности системы остаются в пределах установленных границ приемлемости. При уменьшении объёма ввода пробы особое внимание уделяется пределу обнаружения и повторяемости площади (высоты) пика. Увеличение объёма ввода допустимо при условии, что линейность отклика и разрешение пиков остаются удовлетворительными.

*Жидкостная хроматография: градиентное элюирование*

Изменение хроматографических условий для систем с градиентом требует большей осторожности, чем для изократических.

Неподвижная фаза: замена типа неподвижной фазы недопустима (например, недопустима замена С18 на С8); физико-химические параметры альтернативных фаз должны быть сходными; переход от полностью пористых частиц к поверхностно-пористым возможен при соблюдении указанных выше требований.

Размеры колонки и частиц:

- размер частиц и/или длина колонки могут быть изменены при условии, что отношение длины колонки к размеру частиц остаётся постоянным или изменяется на величину до –25 % от предписанного значения. При переходе от полностью пористых частиц к поверхностно-пористым можно использовать другие комбинации длины колонки и размера частиц, при условии, что отношение (*tR*/*w*0,5)2 для каждого пика, используемого в проверке пригодности системы, изменяется в пределах до –25 % по сравнению с результатами, полученными для исходной колонки; эти изменения допустимы при условии выполнения требований пригодности системы и сохранении селективности и порядка выхода примесей, подлежащих контролю;

- внутренний диаметр колонки может быть изменёнпри условии выполнения требований пригодности системы.

В случае, если в результате корректировки условий хроматографического разделения ширина зоны элюирующегося вещества в единицах объёма уменьшается вследствие меньшего размера частиц или меньшего внутреннего диаметра колонки, что могут потребоваться действия, направленные на минимизацию внеколоночного уширения пиков под влиянием таких факторов, как диаметр капилляров прибора и их соединения, объём ячейки детектора, частота сбора данных детектором и объём вводимой пробы.

При изменении размера частиц необходима регулировка скорости потока, поскольку колонки с меньшими частицами требуют более высоких линейных скоростей для достижения той же эффективности (выраженной через приведенную высоту, эквивалентную теоретической тарелке). При изменении размера частиц и диаметра колонки скорость потока пересчитывают, используя следующее уравнение:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | скорость потока, указанная в методике, мл/мин; |
|  |  | – | скорректированная скорость потока, мл/мин; |
|  | c1 | − | внутренний диаметр колонки, указанный в методике, мм; |
|  | c2 | – | внутренний диаметр используемой колонки, мм; |
|  |  | – | размер частиц, указанный в методике, мкм; |
|  |  | – | размер используемыхчастиц, мкм. |

Изменение размеров колонки, а значит, и её объема, влияет на объём градиента, который контролирует селективность. Градиенты подстраиваются под объём колонки путём изменения объёма градиента пропорционально объёму колонки. Это относится к объёму каждой стадии градиента. Поскольку объём градиента равен времени градиента (*t*G), умноженному на скорость потока (*F*), время каждой стадии градиента должно быть отрегулировано для поддержания постоянного отношения объёма градиента к объёму колонки (пропорциональному произведению *L* × *dc*2). Таким образом, новое время градиента () может быть рассчитано на основе исходного времени градиента (), скорости потока и размеров колонки следующим образом:

Таким образом, изменение условий для градиентного элюирования включает 3 этапа:

1) отрегулировать длину колонки и размер частиц с учётом отношения L/dp;

2) отрегулировать скорость потока с учётом изменения размера частиц и диаметра колонки;

3) отрегулировать время каждой стадии градиента с учётом изменений длины колонки, её диаметра и скорости потока.

Приведённый ниже пример иллюстрирует этот процесс.

Таблица 2 – Пример корректировки для градиентного режима жидкостной хроматографии

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Параметр** | **Исходные условия** | **Скорректированные условия** | **Комментарий** |
| Длина колонки (*L*), мм | 150 | 100 | Выбор пользователя |
| Диаметр колонки (*dc*), мм | 4,6 | 2,1 | Выбор пользователя |
| Размер частиц (*dp*), мкм | 5 | 3 | Выбор пользователя |
| *L/dp* | 30,0 | 33,3 | (1) |
| Скорость потока (*F*), мл/мин | 2,0 | 0,7 | (2) |
| Фактор корректировки градиента (*t*G2/*t*G1) | | 0,4 | (3) |
| **Условия градиента** | | | |
| ПФБ, % | Время, мин | Время, мин |  |
| 30 | 0 | 0 |  |
| 30 | 3 | 3 · 0,4 = 1,2 |  |
| 70 | 13 | 1,2 + (13 – 3) ·0,4 = 5,2 |  |
| 30 | 16 | 5,2 + (16 – 13) ·0,4 = 6,4 |  |
| (1) 11-процентное увеличение в пределах допустимого изменения L/dp от  –25 % до +50 %;  (2) рассчитано с использованием F2 = F1·[(dc22 × dp1) / (dc12 × dp2)];  (3) рассчитано с использованием = × (F1/F2) [(L2 × dc22) / (L1 × dc12)]. | | | |

После корректировки параметров колонки и скорости потока может потребоваться дополнительная корректировка условий методики (подвижной фазы, температуры и др.) в пределах допустимых диапазонов, описанных в разделах «Пригодность хроматографической системы» и «Корректировка условий хроматографирования».

Температура колонки: ±5 °C от указанной рабочей температуры. Состав подвижной фазы/профиль градиентного элюирования: изменения состава подвижной фазы и программы градиента являются приемлемыми при условиях, если:

*-*выполняются требования пригодности системы;

*-*основной пик элюируется в пределах ±15 % от указанного времени удерживания; требование не применяется, если изменены размеры колонки;

*-*состав подвижной фазы и градиент таковы, что компоненты, элюирующиеся первыми, в достаточной степени удерживаются, а сильно удерживаемые компоненты элюируются, не оставаясь в колонке.

pH водного компонента подвижной фазы: ±0,2 единицы pH.Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: ±10 %.

Если при использовании градиентного элюирования не может быть достигнуто соответствие требованиям пригодности системы, рекомендуется оценить объём задержки градиента или сменить используемую колонку.

Объём задержки градиента. Конфигурация используемого оборудования может значительно изменить разрешение, указанные абсолютные и относительные времена удерживания. Это может произойти из-за отличия объёма задержки градиента используемой системы от объёма задержки градиента системы, с помощью которой проводилась валидация методики. В методике часто перед началом программы градиента включена изократическая стадия, чтобы можно было адаптировать систему к временным точкам градиента с учётом разницы объёма задержки у системы, использованной при разработке методики, и у фактически использующейся системы. Решение о необходимости адаптации длительности изократической стадии для данного аналитического оборудования принимается пользователем. Если в методике приведён объём задержки, использованный при разработке методики, то интервалы времени (), указанные в таблице градиента, можно заменить адаптированными интервалами времени (), рассчитанными с помощью уравнения:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | объём задержки градиента, мл; |
|  |  | – | объём задержки градиента, использованный при разработке методики, мл; |
|  |  | – | скорость потока, мл/мин. |

Изократическая стадия, введённая с целью адаптации системы, может быть исключена, если имеются данные валидации по применению методики без неё.

Длина волны детектора: изменения не допускаются.

Объём вводимой пробы. При изменении размеров колонки для корректировки объёма ввода пробы можно использовать следующее уравнение:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | объём ввода пробы, указанный в методике, мкл; |
|  |  | – | скорректированный объём ввода пробы, мкл; |
|  |  | – | длина колонки, указанная в методике, мм; |
|  |  | – | длина используемой колонки, мм; |
|  | 1 | − | внутренний диаметр колонки, указанный в методике, мм; |
|  | 2 | – | внутренний диаметр используемой колонки, мм. |

Это уравнение может быть неприменимо при замене колонок с полностью пористыми частицами на колонки с поверхностно-пористыми частицами.

Даже при отсутствии изменения размеров колонки объём ввода пробы может быть изменён при условии, что критерии пригодности системы остаются в пределах установленных границ приемлемости. При уменьшении объёма ввода пробы особое внимание уделяется пределу обнаружения и повторяемости площади (высоты) пика. Увеличение объёма ввода допустимо при условии, что линейность отклика и разрешение пиков остаются удовлетворительными.

***Газовая хроматография***

Неподвижная фаза:

- размер частиц: максимальное уменьшение на 50 %, увеличение не допускается (набивные колонки);

- толщина плёнки: от –50 % до +100 % (капиллярные колонки).

Размеры колонки*:*

- длина колонки: от –70 % до +100 %;

- внутренний диаметр колонки: ±50 %.

Температура колонки: ±10 %.

Температурная программа: допускается регулировка температуры, как указано выше; допускается регулировка скорости изменения температуры и времени выдержкипри постоянной температуре до ±20 %.

Скорость потока: ±50 %.

Объём вводимой пробы: может быть изменён при условии выполнения требований пригодности системы. При уменьшении объёма ввода или увеличении деления потока особое внимание уделяется пределу обнаружения и повторяемости площади пика определяемого вещества. Увеличение объёма ввода или уменьшение деления потока допускается при условии, что линейность отклика и разрешение пиков остаются удовлетворительными.

Температура испарителя и линии передачи в условиях статического парофазного анализа: ±10 °C, при условии отсутствия разложения или конденсации.

***Сверхкритическая флюидная хроматография***

Состав подвижной фазы: для наполненных колонок количество растворителя, содержание которого в смеси наименьшее, может изменяться в пределах ±30 % (относительное изменение) или ±2 % (абсолютное изменение) в зависимости от того, какая из величин будет больше; для систем с капиллярной колонкой изменения не допускаются.

Длина волны детектора: изменения не допускаются.

Параметры колонки:

Неподвижная фаза:

- размер частиц: максимальное уменьшение на 50 %, увеличение не допускается (набивные колонки).

Размер колонки:

- длина колонки: ±70 %;

- внутренний диаметр колонки: ±25 % (набивные колонки), ±50 % (капиллярные колонки).

Скорость потока: ±50 %.

Температура: ±5 °C, если температура указана в фармакопейной статье.

Объём вводимой пробы: может быть уменьшен при условии, что чувствительность фактически применяемой хроматографической системы (предел количественного определения) и прецизионность системы в условиях повторяемости для определяемых соединений остаются удовлетворительными; увеличение не допускается.