

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

ОФС.1.2.1.2.0001

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Хроматографическими методами называют многостадийные методы разделения, в которых компоненты испытуемого образца распределяются между двумя фазами, одна из которых является неподвижной, а другая – подвижной. Неподвижная фаза может быть твёрдой или жидкой, нанесённой на твёрдое вещество или гель. Неподвижная фаза может помещаться в колонку, наноситься в виде тонкого слоя или распределяться в виде плёнки и т. д. Подвижная фаза может быть газом или жидкостью. Разделение может быть основано на адсорбции, распределении (разделении) масс, ионном обмене и т. д. или на различиях в физико-химических свойствах молекул, таких как размер, масса, объём и т. д.

Общая фармакопейная статья содержит определения и расчёты общих параметров, а также общеприменимые требования к пригодности системы. Принципы разделения, описание оборудования и методик приведены в соответствующих общих фармакопейных статьях:

- ОФС «Бумажная хроматография»;
- ОФС «Тонкослойная хроматография»;
- ОФС «Газовая хроматография»;
- ОФС «Жидкостная хроматография»;
- ОФС «Эксклюзионная хроматография» и др.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для установления пригодности хроматографической системы и расчёта критериев приемлемости в фармакопейных статьях использованы параметры, приведённые ниже. 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 (*Chromatogram*)

Графическое или иное представление зависимости сигнала детектора, концентрации элюируемого вещества или иной величины, используемой для измерения концентрации вещества в элюате, от времени или объёма. В идеале хроматограммы представляют собой последовательность гауссовых пиков, расположенных на базовой линии (Рисунок 1).

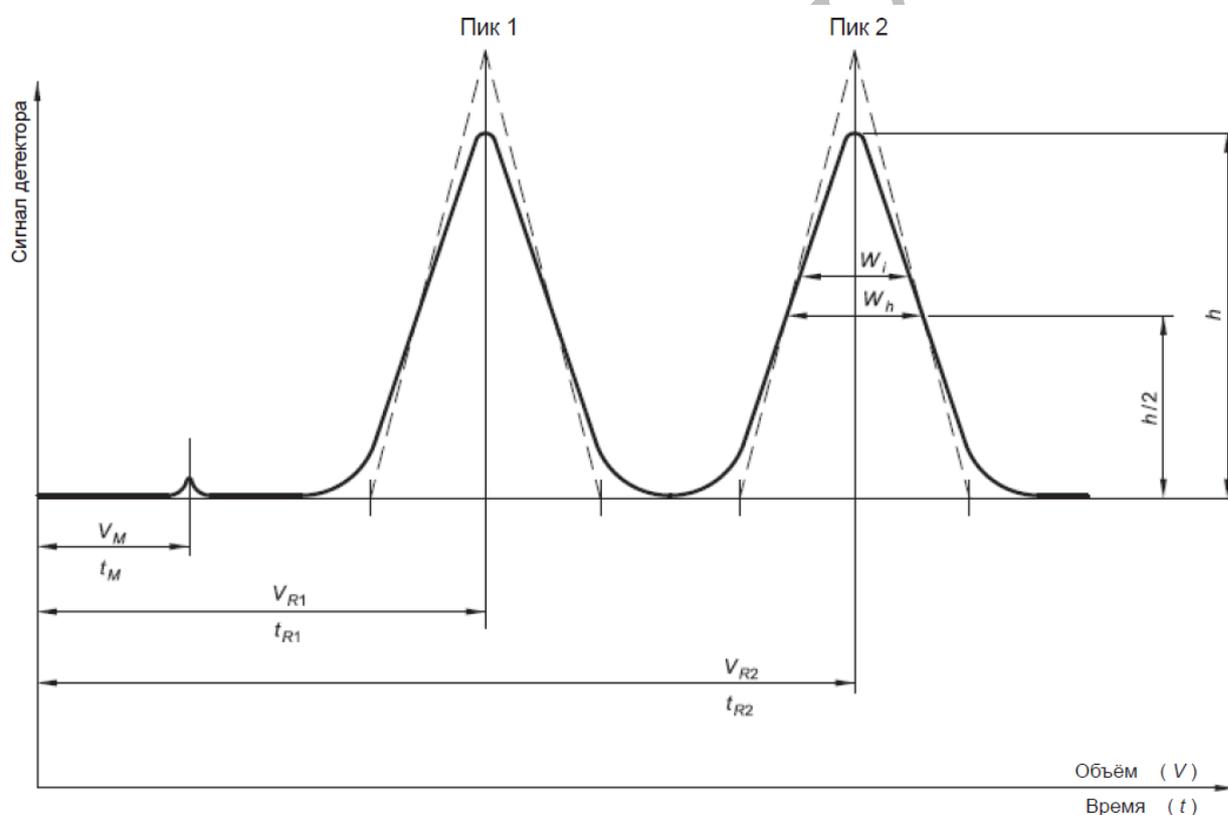


Рисунок 1

- V_M — «мёртвый» объём;
- t_M — «мёртвое» время;
- V_{R1} — объём удерживания пика 1;
- t_{R1} — время удерживания пика 1;
- V_{R2} — объём удерживания пика 2;
- t_{R2} — время удерживания пика 2;
- w_h — ширина пика на половине высоты;
- w_i — ширина пика между точками перегиба;
- h — высота пика;

$h/2$ половина высоты пика.

Константа распределения (K_0) (*Distribution constant*)

В эксклюзионной хроматографии характеристики элюирования компонента в конкретной колонке могут быть описаны константой распределения (также называемой коэффициентом распределения), которую рассчитывают по формуле (1):

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0} \quad (1)$$

где: t_R – время удерживания;
 t_0 – время удерживания неудерживаемого компонента;
 t_t – общее время подвижной фазы.

Объём задержки (D), также обозначаемый (V_D) (*Dwell volume*)

Объём задержки (также известный как объём задержки градиента) – это объём между точкой, при которой происходит смешение элюентов, и входом в колонку. Он может быть определён в приведённых ниже условиях хроматографирования.

Колонка: хроматографическую колонку заменяют подходящей капиллярной трубкой (например, длиной 1 м и внутренним диаметром 0,12 мм).

Подвижные фазы:

- подвижная фаза А: вода для хроматографии Р;
- подвижная фаза Б: 0,1 % (об/об) раствор ацетона Р в воде для хроматографии Р;

Время, мин	Подвижная фаза А, (% об/об)	Подвижная фаза Б, (% об/об)
0–20	100 → 0	0 → 100
20–30	0	100

Скорость потока: устанавливают до получения достаточного противодавления (например, 2 мл/мин).

Детектор: спектрофотометрический, длина волны 265 нм.

Определяют время ($t_{0,5}$) в минутах, при котором оптическая плотность увеличилась на 50 % (Рисунок 2).

$$D = t_D \cdot F \quad (2)$$

где: $t_D = t_{0,5} - 0,5t_G$, в минутах;

t_G – предварительно установленное время градиента (= 20 мин);

F – скорость потока, в миллилитрах в минуту.

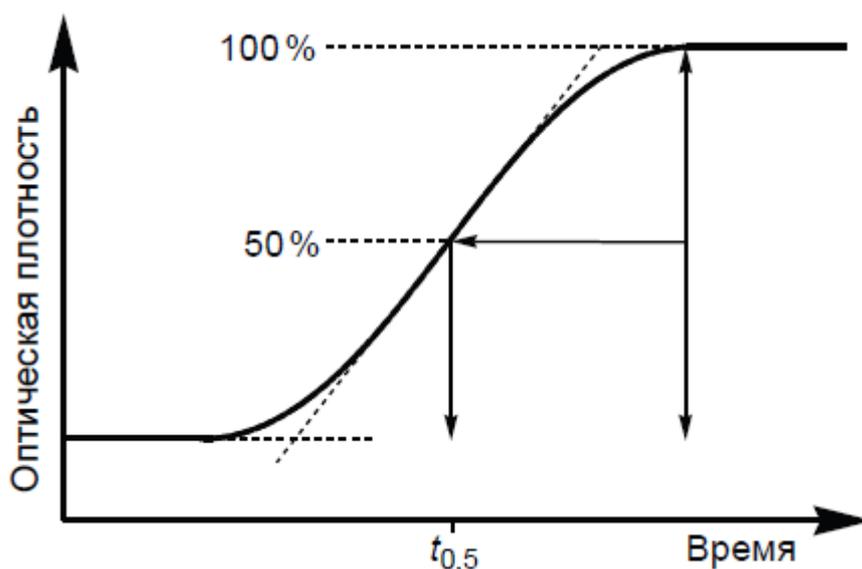


Рисунок 2

Примечание: если применимо, данное измерение выполняют с помощью автосамплера в положении «ввод», чтобы включить объём петли ввода в объём задержки.

«Мёртвое» время (t_M) (*Hold-up time*)

Время, необходимое для элюирования неудаерживаемого компонента (Рисунок 1, шкала базовой линии в минутах или секундах). В эксклюзионной хроматографии используют термин «время удерживания неудаерживаемого компонента (t_0)».

«Мёртвый» объём (V_M) (*Hold-up volume*)

Объём подвижной фазы, необходимый для элюирования неудаерживаемого компонента. Его можно рассчитать по времени удерживания (t_M) и скорости потока (F) в миллилитрах в минуту по формуле (3):

$$V_M = t_M \cdot F \quad (3)$$

В эксклюзионной хроматографии используют термин «объём удерживания неудерживаемого компонента (V_0)».

Пик (*Peak*)

Участок хроматограммы, на котором регистрируется сигнал детектора при элюировании из колонки одного компонента (или двух и более неразделённых компонентов).

Пик может быть охарактеризован площадью пика или высотой пика (h).

Отношение пик/впадина (p/v) (*Peak-to-valley ratio*)

Отношение пик/впадина может быть использовано в качестве критерия пригодности хроматографической системы, если не достигнуто разделение двух пиков до базовой линии (Рисунок 3).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v} \quad (4)$$

где: H_p – высота меньшего пика относительно экстраполированной базовой линии;
 H_v – высота относительно экстраполированной базовой линии наиболее низкой точки кривой, разделяющей меньший и больший пики.

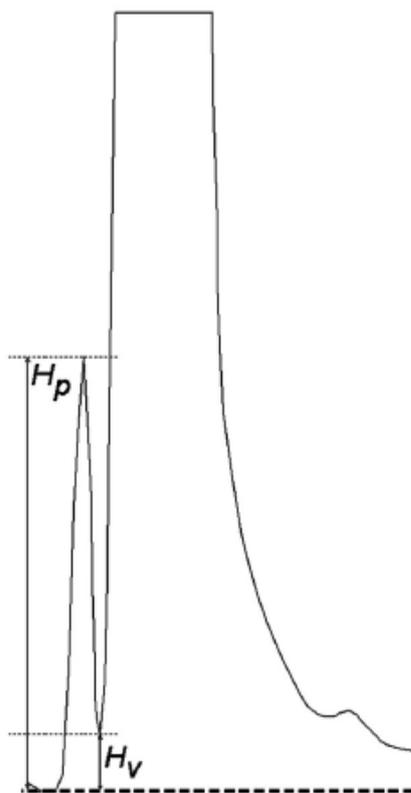


Рисунок 3

Высота тарелки (H) (Plate height), синоним: Высота, эквивалентная теоретической тарелке (synonym: Height equivalent to one theoretical plate (HETP))

Отношение длины колонки (L) в микрометрах к числу теоретических тарелок (N):

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

Число тарелок (N) (Plate number), синоним: Число теоретических тарелок (synonym: Number of theoretical plates)

Число, указывающее на эффективность (кажущуюся эффективность) колонки. Его можно рассчитать, как число тарелок, только на основе данных, полученных в изотермических, изократических или изоденситных режимах, в зависимости от методики, используя формулу (6), в которой значения t_R и w_h должны быть выражены в одинаковых единицах:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 \quad (6)$$

где: t_R – время удерживания пика соответствующего компоненту;
 w_h – ширина пика на половине высоты ($h/2$).

Число теоретических тарелок зависит от компонента, а также от колонки, температуры колонки, подвижной фазы и времени удерживания.

Приведённая высота тарелки (h) (*Reduced plate height*)

Отношение высоты теоретической тарелки (H) в микрометрах к диаметру частицы (d_p) в микрометрах:

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (7)$$

Относительное замедление (R_{rel}) (*Relative retardation*)

Относительное замедление, используемое в плоскостной хроматографии, рассчитывают как отношение расстояний, пройденных пятном определяемого компонента и компонента сравнения (Рисунок 4).

$$R_{rel} = \frac{b}{c} \quad (8)$$

где: a – расстояние, пройденное фронтом подвижной фазы;
 b – расстояние, пройденное определяемым компонентом;
 c – расстояние, пройденное компонентом сравнения.

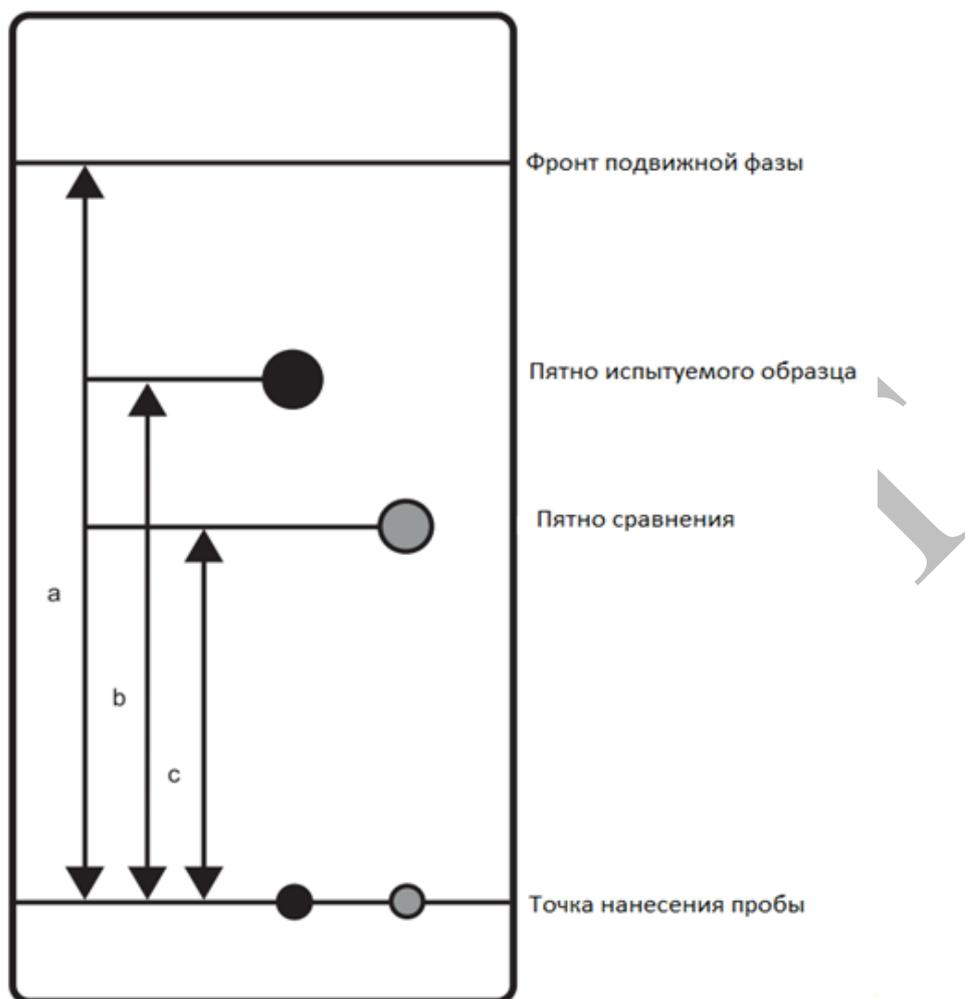


Рисунок 4

Относительное удерживание (r) (*Relative retention*)

Относительное удерживание рассчитывают с использованием формулы (9):

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M} \quad (9)$$

где: t_{Ri} — время удерживания интересующего пика;
 t_{Rst} — время удерживания пика сравнения (обычно пика, соответствующего испытуемому веществу);
 t_M — «мёртвое» время.

Неоткорректированное относительное удерживание (r_G) или (*RRT*) (*Relative retention, unadjusted*)

Неоткорректированное относительное удерживание рассчитывают с использованием формулы (10):

$$r_G = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}} \quad (10)$$

При отсутствии других указаний, значения относительного удерживания, приведённые в фармакопейных статьях, соответствуют неоткорректированному относительному удерживанию.

В плоскостной хроматографии вместо t_{Rst} и t_{Ri} используют коэффициенты замедления R_{Fst} и R_{Fi} . Коэффициент R_{Fst} (также известный как R_{st}) представляет собой отношение расстояния, пройденного веществом, к расстоянию, пройденному веществом сравнения.

Разрешение (R_s) (*Resolution*)

Разрешение между пиками двух компонентов (Рисунок 1) можно рассчитать по формуле (11):

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (11)$$

где: $t_{R2} > t_{R1}$;

t_{R1} и t_{R2} – времена удерживания пиков;

w_{h1} и w_{h2} – ширина пиков на половине высоты.

В количественной плоскостной хроматографии с использованием денситометрии вместо времён удерживания используют пройденные расстояния, а разрешение между пиками двух компонентов можно рассчитать по формуле (12):

$$R_s = \frac{1,18a \cdot (R_{F2} - R_{F1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (12)$$

где: $R_{F2} > R_{F1}$;

R_{F1} и R_{F2} – коэффициенты замедления пиков;

w_{h1} и w_{h2} – ширина пиков на половине их высоты;

a – расстояние, пройденное фронтом растворителя.

Фактор замедления (R_F) (*Retardation factor*)

Фактор замедления (также известный, как фактор удерживания (R_f)), используемый в плоскостной хроматографии, представляет собой отношение расстояния от точки нанесения пробы до центра пятна к расстоянию, которое

одновременно проходит фронт растворителя от точки нанесения пробы (Рисунок 4):

$$R_F = \frac{b}{a} \quad (13)$$

где: b – расстояние, пройденное интересующим компонентом;
 a – расстояние, пройденное фронтом растворителя.

Фактор удерживания (k) (*Retention factor*)

Фактор удерживания (известный также как коэффициент распределения масс (D_m) или коэффициент ёмкости (k')), определяют по формуле (14):

$$k = \frac{\text{количество вещества в неподвижной фазе}}{\text{количество вещества в подвижной фазе}} = K_C \frac{V_S}{V_M} \quad (14)$$

где: K_C – константа распределения (известная также как коэффициент равновесного распределения);
 V_S – объём неподвижной фазы;
 V_M – объём подвижной фазы.

Фактор удерживания компонента может быть определён из хроматограммы по формуле (15):

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (15)$$

где: t_R – время удерживания;
 t_M – «мёртвое» время.

Время удерживания (t_R) (*Retention time*)

Время, прошедшее между введением образца и появлением максимума пика зоны элюируемого образца (Рисунок 1, шкала базовой линии в минутах или секундах).

Объём удерживания (V_R) (*Retention volume*)

Объём подвижной фазы, необходимый для элюирования компонента. Он может быть рассчитан по времени удерживания (t_R) и скорости потока (F) в миллилитрах в минуту по формуле (16):

$$V_R = t_R \cdot F \quad (16)$$

Время удерживания неудерживаемого компонента (t_0) (*Retention time of an unretained compound*)

В эксклюзионной хроматографии время удерживания компонента, молекулы которого больше, чем размер наибольшей поры геля (Рисунок 5).

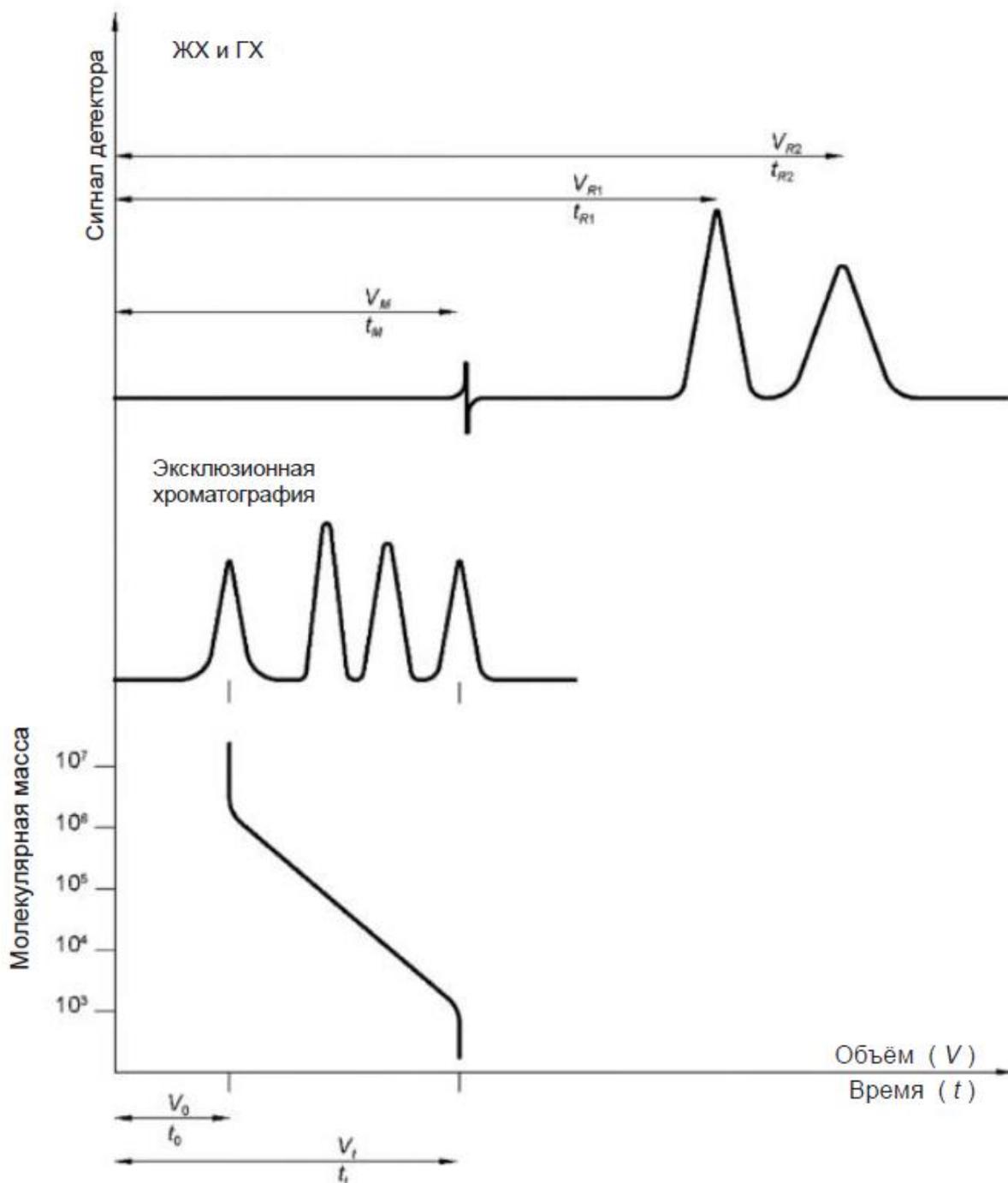


Рисунок 5

Объём удерживания неудерживаемого компонента (V_0) (*Retention volume of an unretained compound*)

В эксклюзионной хроматографии объём удерживания компонента, молекулы которого больше, чем размер наибольшей поры геля, может быть рассчитан по времени удерживания неудерживаемого компонента (t_0) и скорости потока (F) в миллилитрах в минуту по формуле (17):

$$V_0 = t_0 \cdot F \quad (17)$$

Фактор разделения (α) (*Separation factor*)

Относительное удерживание, рассчитанное для двух соседних пиков (условно, значение фактора разделения всегда > 1) по формуле (18):

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad (18)$$

где: k_1 – фактор удерживания пика 1;
 k_2 – фактор удерживания пика 2.

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

Кратковременный шум влияет на прецизионность и правильность количественного определения. Отношение сигнал/шум рассчитывают по формуле (19):

$$S/N = \frac{2H}{h} \quad (19)$$

где: H – высота пика (Рисунок 6), соответствующего рассматриваемому компоненту, на хроматограмме, полученной с использованием раствора сравнения, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии сигнала, наблюдаемого на расстоянии, равном не менее пятикратной ширины пика на половине его высоты;

h – уровень шума на хроматограмме, полученной после ввода контрольного раствора (Рисунок 7), наблюдаемый на расстоянии, равном не менее пятикратной ширины пика на половине его высоты на хроматограмме, полученной с использованием раствора сравнения, и, по возможности, расположенной симметрично по обе стороны от места возможного обнаружения пика.

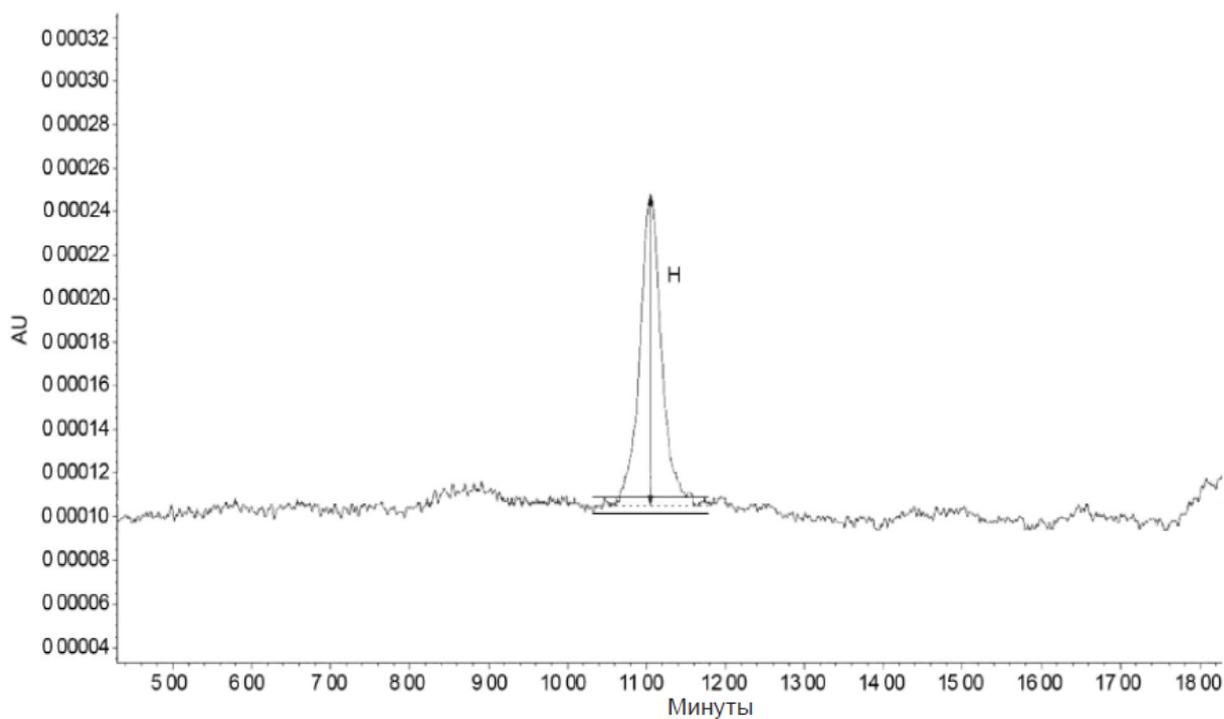


Рисунок 6 – Хроматограмма раствора сравнения

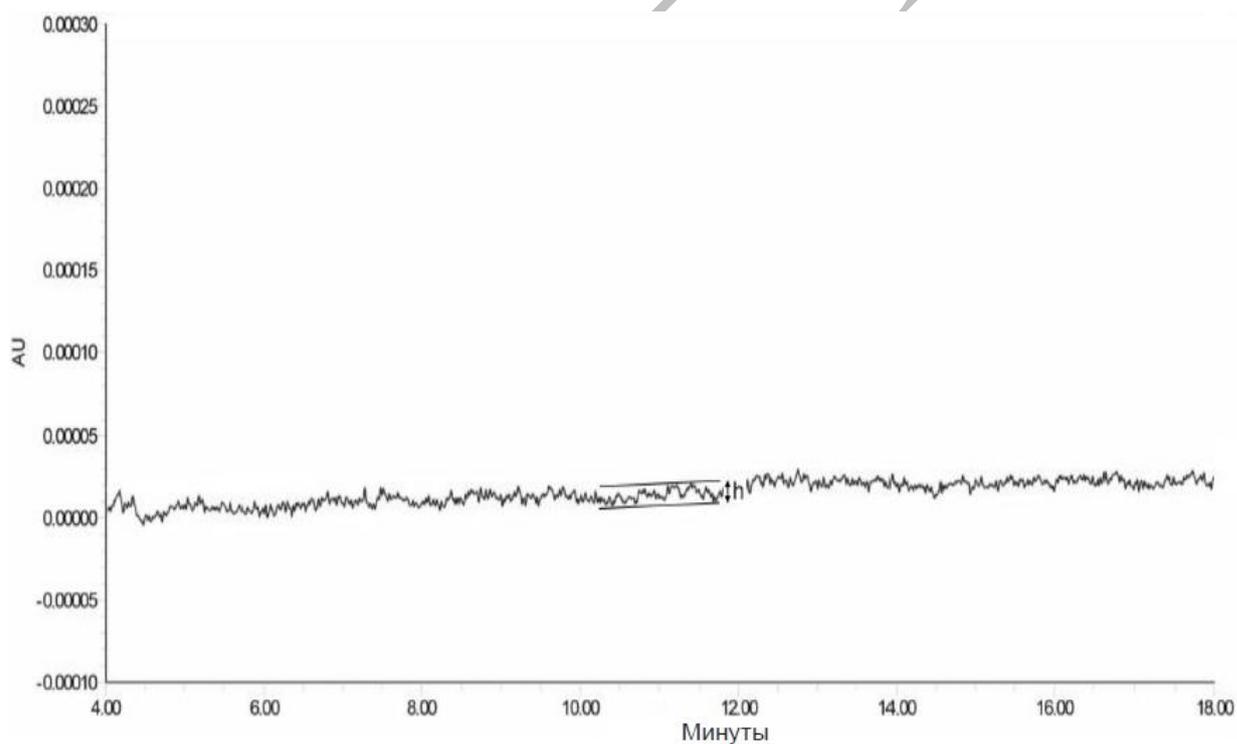


Рисунок 7 – Хроматограмма контрольного раствора

Фактор симметрии (A_s) (*Symmetry factor*)

Фактор симметрии пика (также известный как фактор асимметрии или хвостовой фактор) (Рисунок 8) рассчитывают по формуле (20):

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (20)$$

где: $w_{0,05}$ – ширина пика на одной двадцатой его высоты;
 d – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика, и передней границей пика на одной двадцатой его высоты.

Значение (A_s), равное 1,0 свидетельствует о симметричности. Если $A_s > 1,0$, это означает, что пик имеет растянутый задний фронт («хвост»); если $A_s < 1,0$, то пик имеет растянутый фронт.

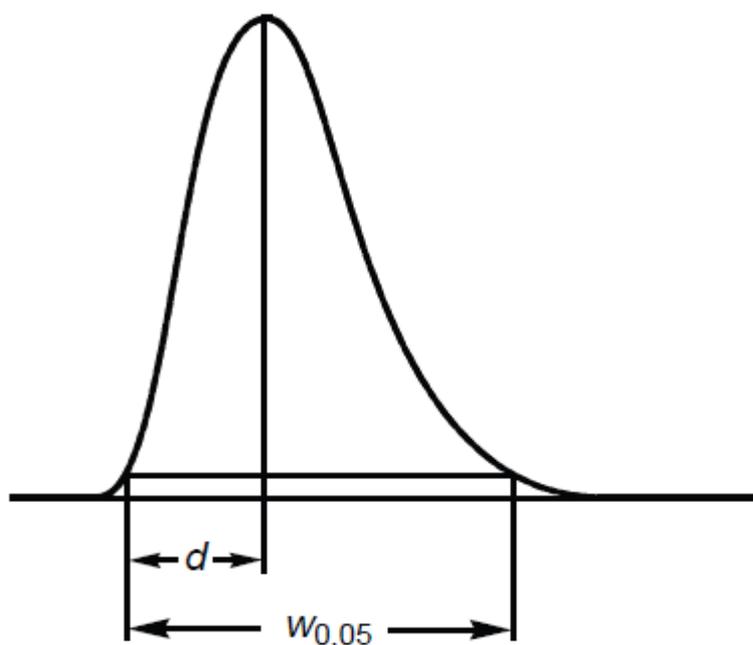


Рисунок 8

Повторяемость системы (*System repeatability*)

Повторяемость системы, выражаемая в виде рассчитанного относительного стандартного отклонения (%RSD) последовательных серий измерений не менее чем для трёх введений или нанесений раствора сравнения, рассчитывают по формуле (21):

$$\%RSD = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad (21)$$

где: u_i – индивидуальные значения, выраженные как площадь пика, высота пика или отношения площадей в методе внутреннего стандарта;
 \bar{u} – среднее индивидуальных значений;
 n – количество индивидуальных значений.

Общее время подвижной фазы (t_t) (*Total mobile phase time*)

В эксклюзионной хроматографии время удерживания компонента, молекулы которого меньше, чем размер наименьшей поры геля (Рисунок 5).

Общий объём подвижной фазы (V_t) (*Total mobile phase volume*)

В эксклюзионной хроматографии объём удерживания компонента, молекулы которого меньше, чем размер наименьшей поры геля, может быть рассчитан по общему времени подвижной фазы (t_t) и скорости потока (F) в миллилитрах в минуту по формуле (22):

$$V_t = t_t \cdot F \quad (22)$$

ПРИГОДНОСТЬ СИСТЕМЫ

В этом разделе рассматриваются только жидкостная и газовая хроматографии.

Различные компоненты используемого оборудования должны быть квалифицированы и должны обеспечивать уровень функционирования, необходимый для проведения испытания или количественного определения.

Испытания для проверки пригодности хроматографической системы являются неотъемлемой частью аналитической методики и их используют для обеспечения надлежащего функционирования хроматографической системы. Для оценки функционирования хроматографической системы могут быть использованы такие параметры, как число теоретических тарелок, коэффициент удерживания (коэффициент распределения масс), повторяемость системы, отношение сигнал/шум, разрешение/отношение пик/впадина и фактор симметрии. В случае сложных хроматографических профилей (например, для биотехнологических/биологических лекарственных средств) в качестве испытания для проверки пригодности системы в

конкретной фармакопейной статье может быть указано использование визуального сравнения профилей.

Факторы, которые могут повлиять на хроматографическое поведение:

- состав и температура подвижной фазы;
- ионная сила и рН водного компонента подвижной фазы;
- скорость потока, размеры колонки, температура колонки и давление;
- характеристики неподвижной фазы, включая тип хроматографического носителя (состоящий из частиц или монолитный), размер частиц или пор, пористость, удельная площадь поверхности;
- обращённо-фазовая и другие модификации поверхности неподвижной фазы, степень химической модификации (такой как эндкепирование, содержание углерода и т. д.).

Указанные в фармакопейных статьях времена удерживания и относительные удерживания приведены только в информационных целях, если не указано иное. К относительным удерживаниям не применимы критерии приемлемости.

Критерии приемлемости системы необходимо соблюдать на протяжении всего процесса хроматографирования. Испытание образца не должно проводиться, пока не продемонстрирована пригодность хроматографической системы.

В дополнение к любым другим критериям пригодности системы, указанным в фармакопейной статье, необходимо выполнить следующие требования. Если в фармакопейной статье указаны особые требования, они заменяют требования, указанные в данном разделе.

Повторяемость системы – количественное определение фармацевтической субстанции или вспомогательного вещества

При количественном определении фармацевтической субстанции или вспомогательного вещества, в случае, если искомое значение составляет 100 % для чистого вещества и требование к повторяемости системы не указано, то максимально допустимое относительное стандартное отклонение ($\%RSD_{max}$)

для заданных пределов рассчитывают для серии вводов раствора сравнения ($n=3-6$). Максимально допустимое относительное стандартное отклонение для пика не должно превышать соответствующее значение, приведённое в таблице 1.

$$\%RSD_{max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}} \quad (23)$$

- где: K – константа (0,349), полученная из уравнения $K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \cdot \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$, в котором $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$ представляет собой требуемое значение относительного стандартного отклонения в процентах, определённое при шести повторных вводах пробы для $B = 1,0$;
- B – верхний предел количественного содержания, указанный в определении конкретной фармакопейной статьи, за вычетом 100 %;
- n – количество повторных введений раствора сравнения ($3 \leq n \leq 6$);
- $t_{90\%,n-1}$ – коэффициент Стьюдента t при доверительной вероятности 90 % для двустороннего критерия с числом степеней свободы $n-1$.

Таблица 1 – Максимально допустимое относительное стандартное отклонение (количественное определение)

	Количество отдельных вводов пробы n			
	3	4	5	6
B (%)	Максимально допустимое относительное стандартное отклонение (%)			
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

Чувствительность системы

Отношение сигнал/шум используют для определения чувствительности системы. Предел количественного содержания (соответствующий отношению сигнал/шум, равному 10) должен быть равен или меньше, чем порог информирования.

Для определения отношения сигнал/шум, вводят раствор испытуемого образца в концентрации, соответствующей порогу информирования (например, 0,05 %). В качестве альтернативы можно применять раствор сравнения, используемый для количественного определения неспецифицированных примесей (например, 0,10 % от концентрации испытуемого раствора) и экстраполировать отношение сигнал/шум для основного пика до порога информирования.

Симметричность пика

Если не указано иное, при проведении испытания или количественного определения, фактор симметрии (фактор асимметрии) пика, используемого для количественных расчётов, должен составлять 0,8–1,8.

КОРРЕКТИРОВКА УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

Описанные условия хроматографирования валидированы в ходе разработки фармакопейной статьи.

Ниже приведены параметры хроматографических испытаний, которые можно корректировать без существенного изменения фармакопейной аналитической методики. Изменения, не описанные ниже, требуют повторной валидации методики.

Многочисленные корректировки могут оказывать кумулятивный эффект на функционирование работы системы и должны быть должным образом оценены пользователями. Это особенно важно в случаях, когда образец разделения приводят в виде профиля. В таких случаях должна быть проведена оценка рисков.

Любые корректировки должны быть осуществлены в соответствии с фармакопейной методикой.

Если к фармакопейной методике была применена корректировка, то могут потребоваться дополнительные верификационные испытания. Чтобы убедиться в пригодности скорректированной фармакопейной методики, необходимо оценить соответствующие аналитические характеристики

функционирования, на которые потенциально может повлиять внесённые изменения.

Если фармакопейная аналитическая методика была скорректирована в соответствии с приведёнными ниже требованиями, то последующая корректировка скорректированной методики не допускается без соответствующей повторной валидации.

Соответствие критериям пригодности системы подтверждает обеспечение надлежащих условий для удовлетворительного выполнения испытания или количественного определения.

Корректировка условий хроматографирования с градиентным элюированием (ВЭЖХ) или программированием температуры (ГХ) более критична, чем корректировка с изократическим (ВЭЖХ) или изотермическим (ГХ) элюированием, поскольку она может привести к сдвигу некоторых пиков на другой уровень градиента или на другие значения температуры элюирования, что может вызвать частичное или полное совместное элюирование соседних пиков или инверсию пиков, и таким образом, к некорректному отнесению пиков и их маскированию или к такому их смещению, при котором элюирование будет происходить за пределами предписанного времени элюирования.

Для некоторых параметров в фармакопейной статье приводят чёткие указания по их корректировке для обеспечения пригодности системы.

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Состав подвижной фазы: содержание компонента-растворителя, присутствующего в меньшем количестве, может быть откорректировано в пределах ± 30 % (относительное содержание) или ± 2 % (абсолютное содержание), в зависимости от того, что из них больше; абсолютное содержание других компонентов не может быть изменено более чем на 10 %. Количество компонента, содержание которого в смеси минимально, составляет $(100/n)$ % или менее, где n – общее количество компонентов подвижной фазы. Для меньшего по содержанию компонента,

составляющего 10 % подвижной фазы, корректирование относительного содержания на 30 % допускает предельные значения от 7 % до 13 %, а корректирование абсолютного содержания на 2 % допускает предельные значения от 8 % до 12 %, т. е. корректирование по относительному содержанию больше; для меньшего по содержанию компонента, составляющего 5 % подвижной фазы, корректирование относительного содержания на 30 % допускает предельные значения от 3,5 % до 6,5 %, а корректирование абсолютного содержания на 2 % допускает предельные значения от 3 % до 7 %, т. е. в данном случае корректирование по абсолютному содержанию больше.

pH водного компонента подвижной фазы: $\pm 0,2$ единицы pH, если не указано иное.

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

Объём наносимой пробы: от 10 % до 20 % от указанного объёма при использовании пластинок с мелким размером частиц (2–10 мкм).

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ: ИЗОКРАТИЧЕСКОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Параметры колонки и скорость потока

Неподвижная фаза: не допускается изменение характера заместителя (например, не допускается замена C_{18} на C_8); другие физико-химические характеристики неподвижной фазы (т. е. хроматографическая основа, модификация поверхности и степень химической модификации) должны быть аналогичными; допускается замена колонок с полностью пористыми частицами (TPP) на колонки с поверхностно-пористыми частицами (SPP) при условии соблюдения вышеуказанных требований.

Размеры колонки (размер частиц, длина): размер частиц и/или длина колонки могут быть модифицированы при условии, что отношение длины колонки (L) к размеру частиц (dp) остается постоянным или находится в диапазоне от -25 % до $+50$ % от указанного отношения L/dp . Для перехода от полностью пористых частиц к поверхностно-пористым можно использовать

другие комбинации L и dp при условии, что число теоретических тарелок (N) находится в диапазоне от -25% до $+50\%$ относительно указанной колонки.

Данные изменения допустимы при условии, что требования к пригодности системы выполнены, а селективность и эквивалентность порядка элюирования контролируемых специфицированных примесей подтверждены.

Размеры колонки (внутренний диаметр): внутренний диаметр колонки может быть откорректирован даже в случае отсутствия изменения в размере частиц и/или длине колонки.

Необходимо соблюдать осторожность, если в результате корректировки уменьшается ширина пика из-за уменьшения размера частиц или уменьшения внутреннего диаметра; в этом случае может потребоваться корректировка для минимизации вне колоночного уширения пика из-за таких факторов, как соединения прибора, объём ячейки детектора и скорость отбора проб, а также объём вводимой пробы.

При изменении размера частиц необходимо скорректировать скорость потока, так как для колонок с меньшим размером частиц необходимы более высокие линейные скорости для достижения той же эффективности (определяемой приведённой высотой тарелки). Скорость потока корректируют в зависимости от изменения диаметра колонки и размера частиц, используя формулу (24):

$$F_2 = F_1 \cdot \frac{dc_2^2 \cdot dp_1}{dc_1^2 \cdot dp_2} \quad (24)$$

где: F_1 – скорость потока, указанная в фармакопейной статье, в миллилитрах в минуту;

F_2 – откорректированная скорость потока в миллилитрах в минуту;

dc_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в фармакопейной статье, в миллиметрах;

dc_2 – внутренний диаметр используемой колонки в миллиметрах;

dp_1 – размер частиц, указанный в фармакопейной статье, в микрометрах;

dp_2 – размер частиц используемой колонки в микрометрах.

При изменении размера частиц от ≥ 3 мкм до < 3 мкм при изократическом элюировании, дополнительное увеличение линейной скорости (посредством регулирования скорости потока) может быть обосновано при условии, что эффективность колонки не снижается более чем на 20 %. Аналогично, при изменении размера частиц от < 3 мкм до ≥ 3 мкм во избежание снижения эффективности колонки более чем на 20 %, может быть обосновано дополнительное уменьшение линейной скорости (скорости потока).

После корректировки размеров колонки допускается дополнительное изменение скорости потока на ± 50 %.

Температура колонки: ± 10 °С, если указана рабочая температура и не указано иное.

Может потребоваться дополнительная корректировка условий аналитической методики (подвижная фаза, температура, pH и др.) в допустимых пределах, указанных в разделах *Пригодность системы* и *Корректировка условий хроматографирования* данной общей фармакопейной статьи.

Подвижная фаза

Состав: содержание компонента-растворителя, присутствующего в меньшем количестве, может быть откорректировано в пределах ± 30 % (относительное содержание) (см. пример в разделе *Тонкослойная хроматография*); ни один компонент не должен изменяться более чем на 10 % (абсолютное содержание). Количество компонента, содержание которого в смеси минимально, составляет $(100/n)$ % или менее, где n – общее количество компонентов подвижной фазы.

pH водного компонента подвижной фазы: $\pm 0,2$ единицы pH, если не указано иное.

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

Скорость потока: при отсутствии изменения размеров колонки допускается корректирование скорости потока в пределах ± 50 %.

Длина волны детектора: корректировка не допускается.

Объём вводимой пробы: при изменении размеров колонки для корректировки объёма вводимой пробы может быть использована формула (25):

$$V_{inj2} = V_{inj1} \cdot \frac{L_2 \cdot dc_2^2}{L_1 \cdot dc_1^2} \quad (25)$$

- где: V_{inj1} – объём вводимой пробы, указанный в фармакопейной статье, в микролитрах;
- V_{inj2} – откорректированный объём вводимой пробы в микролитрах;
- L_1 – длина колонки, указанная в фармакопейной статье в миллилитрах;
- L_2 – новая длина колонки в миллиметрах;
- dc_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в фармакопейной статье, в миллиметрах;
- dc_2 – новый внутренний диаметр колонки в миллиметрах.

Данная формула может быть не применима при замене колонок TPR на колонки SPP.

Даже при отсутствии каких-либо корректировок размеров колонки объём вводимой пробы может быть изменён при условии, что критерии пригодности системы остаются в установленных пределах приемлемости. При уменьшении объёма вводимой пробы особое внимание необходимо уделять пределу обнаружения и повторяемости сигнала (сигналов) определяемого(ых) пика(ов). Увеличение допускается при условии, что, в частности, линейность и разрешение определяемого(ых) пика(ов) остаются удовлетворительными.

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ: ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Корректировка условий хроматографирования для градиентных систем требует большей осторожности, чем для изократических систем.

Параметры колонки и скорость потока

Неподвижная фаза: не допускается изменение характера заместителя (например, не допускается замена C_{18} на C_8); другие физико-химические характеристики неподвижной фазы (т. е. хроматографический носитель, модификация поверхности и степень химической модификации) должны быть аналогичными; допускается замена колонок с полностью пористыми частицами (TPP) на колонки с поверхностно-пористыми частицами (SPP) при условии выполнения вышеуказанных требований.

Размеры колонки (размер частиц, длина): размер частиц и/или длина колонки могут быть модифицированы при условии, что отношение длины колонки (L) к размеру частиц (dp) остается постоянным или находится в диапазоне от -25% до $+50\%$ от указанного отношения L/dp . Для перехода от полностью пористых частиц к поверхностно-пористым можно использовать другие комбинации L и dp , при условии, что отношение $(t_R/w_h)^2$ находится в диапазоне от -25% до $+50\%$ относительно указанной колонки, для каждого пика, используемого для проверки пригодности системы в соответствии с указаниями данной общей фармакопейной статьи и конкретной фармакопейной статьи.

Данные изменения допустимы при условии, что требования к пригодности системы выполнены, а селективность и эквивалентность порядка элюирования контролируемых специфицированных примесей подтверждены.

Размеры колонки (внутренний диаметр): внутренний диаметр колонки можно корректировать даже при отсутствии изменения в размере частиц и/или длине колонки.

Необходимо соблюдать осторожность, если в результате корректировки уменьшается ширина пика из-за уменьшения размера частиц или уменьшения внутреннего диаметра; в этом случае может потребоваться корректировка, для минимизации вне колоночного уширения пика из-за таких факторов, как соединения прибора, объем ячейки детектора и скорость отбора проб, а также объем вводимой пробы.

При изменении размера частиц необходимо скорректировать скорость потока, так как для колонок с меньшим размером частиц необходимы более высокие линейные скорости для достижения одинаковой эффективности (определяемой приведённой высотой тарелки). Скорость потока корректируют в зависимости от изменения диаметра колонки и размера частиц, используя формулу (26):

$$F_2 = F_1 \cdot \frac{dc_2^2 \cdot dp_1}{dc_1^2 \cdot dp_2} \quad (26)$$

- где F_1 – скорость потока, указанная в методике, в миллилитрах в минуту;
 F_2 – откорректированная скорость потока в миллилитрах в минуту;
 dc_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в фармакопейной статье, в миллиметрах;
 dc_2 – внутренний диаметр используемой колонки в миллиметрах;
 dp_1 – размер частиц, указанный в фармакопейной статье, в микрометрах;
 dp_2 – размер частиц используемой колонки в микрометрах.

Изменение размеров колонки и, следовательно, её объёма, влияет на объём градиента, который контролирует селективность. Градиенты корректируют в зависимости от объёма колонки путём изменения объёма градиента пропорционально объёму колонки. Это применимо к объёму каждого сегмента градиента. Поскольку объём градиента представляет собой время градиента (t_G), умноженное на скорость потока (F), время градиента для каждого сегмента градиента необходимо корректировать для сохранения постоянным отношения объёма градиента к объёму колонки (выраженному как $L \cdot dc^2$). Таким образом, новое время градиента (t_{G2}) может быть рассчитано на основе исходного времени градиента (t_{G1}), скорости (скоростей) потока и размеров колонки по формуле (27):

$$t_{G2} = t_{G1} \cdot \frac{F_1}{F_2} \cdot \frac{L_2 \cdot dc_2^2}{L_1 \cdot dc_1^2} \quad (27)$$

Таким образом, изменение условий градиентного элюирования включает 3 этапа:

(1) регулирование длины колонки и размеров частиц в соответствии с отношением L/dp ;

(2) регулирование скорости потока в соответствии с изменёнными размером частиц и диаметром колонки;

(3) регулирование времени градиента каждого сегмента в соответствии с изменёнными длиной колонки, её диаметром и скоростью потока.

Приведённый ниже пример иллюстрирует этот процесс.

Таблица 2 – Пример корректировки для жидкостной хроматографии – градиентное элюирование

Изменяемый параметр	Исходные условия	Откорректированные условия	Примечание
Длина колонки (L) в мм	150	100	Выбор пользователя
Диаметр колонки (dc) в мм	4,6	2,1	Выбор пользователя
Размер частиц (dp) в мкм	5	3	Выбор пользователя
L/dp	30,0	33,3	(1)
Скорость потока (F) в мл/мин	2,0	0,7	(2)
Фактор корректирования градиента (t_{G2}/t_{G1})		0,4	(3)
Градиентные условия			
V (%)	Время (мин)	Время (мин)	
30	0	0	
30	3	$(3 \cdot 0,4) = 1,2$	
70	13	$[1,2 + (10 \cdot 0,4)] = 5,2$	
30	16	$[5,2 + (3 \cdot 0,4)] = 6,4$	
(1) 11-процентное увеличение в пределах допустимого изменения L/dp от –25 % до + 50 %;			
(2) рассчитано с использованием $F_2 = F_1 \cdot [(dc_2^2 \cdot dp_1) / (dc_1^2 \cdot dp_2)]$;			
(3) рассчитано с использованием $t_{G2} = t_{G1} \cdot (F_1/F_2) [(L_2 \cdot dc_2^2) / (L_1 \cdot dc_1^2)]$.			

Температура колонки: ± 5 °С, если указана рабочая температура и не указано иное.

Может потребоваться дополнительная корректировка условий аналитической методики (подвижная фаза, температура, рН и др.) в допустимых пределах, указанных в разделах *Пригодность системы* и *Корректировка условий хроматографирования* данной общей фармакопейной статьи.

Подвижная фаза

Состав/градиент: корректировка состава подвижной фазы и градиента допустима при условиях, что:

- выполняются требования пригодности системы;
- основной(ые) пик(и) элюируется(ются) в пределах $\pm 15\%$ от указанного(ых) времени(времён) удерживания, полученного(ых) в исходных условиях; это требование не применимо, если изменяются размеры колонки;
- состав подвижной фазы и градиент подобраны таким образом, что первые пики удерживаются в достаточной степени, а последние пики элюируются.

рН водного компонента подвижной фазы: $\pm 0,2$ единицы рН, если не указано иное.

Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: $\pm 10\%$.

Если соответствие требованиям пригодности системы не может быть достигнуто, зачастую предпочтительнее пересмотреть объём задержки или заменить колонку.

Объём задержки

Конфигурация используемого оборудования может существенно повлиять на разрешение, время удерживания и относительное удерживание, описанные в методике. Если это происходит, то это может быть обусловлено изменением объёма задержки. В фармакопейную статью предпочтительно включать изократическую стадию до начала программы градиентного элюирования, чтобы можно было адаптировать систему к временным точкам градиента с учётом разницы в объёме задержки между системой, использованной при разработке аналитической методики, и фактически

используемой системы. Адаптация продолжительности изократической стадии в зависимости от используемого аналитического оборудования входит в ответственность пользователя. Если в фармакопейной статье приведён объём задержки, установленный при разработке методики, то временные точки (t) в минутах, указанные в таблице градиента, могут быть заменены на адаптированные временные точки (t_c) в минутах, рассчитанные по формуле (28):

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F} \quad (28)$$

где: D – объём задержки в миллилитрах;
 D_0 – объём задержки, использованный при разработке аналитической методики, в миллилитрах;
 F – скорость потока в миллилитрах в минуту.

Изократическая стадия, введённая для этой цели, может быть исключена, если имеются валидационные данные по применению аналитической методики без этой стадии.

Длина волны детектора: корректировка не допускается.

Объём вводимой пробы: при изменении размеров колонки для корректировки объёма вводимой пробы можно использовать формулу (29):

$$V_{inj2} = V_{inj1} \cdot \frac{L_2 \cdot dc_2^2}{L_1 \cdot dc_1^2} \quad (29)$$

где: V_{inj1} – объём вводимой пробы, указанный в фармакопейной статье, в микролитрах;
 V_{inj2} – откорректированный объём вводимой пробы в микролитрах;
 L_1 – длина колонки, указанная в фармакопейной статье в миллиметрах;
 L_2 – новая длина колонки в миллиметрах;
 dc_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в фармакопейной статье, в миллиметрах;
 dc_2 – новый внутренний диаметр используемой колонки в миллиметрах.

Данная формула может быть не применима при замене колонок TPR на колонки SPP.

Даже при отсутствии каких-либо корректировок в размерах колонки объём вводимой пробы может быть изменён при условии, что критерии пригодности системы остаются в установленных пределах приемлемости. При уменьшении объёма вводимой пробы особое внимание необходимо уделять пределу обнаружения и повторяемости сигнала(ов) определяемого пика(ов). Увеличение допускается при условии, что, в частности, линейность и разрешение определяемого пика(ов) остаются удовлетворительными.

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Параметры колонки

Неподвижная фаза:

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

– *толщина слоя:* от – 50 % до + 100 % (капиллярные колонки).

Размеры колонки:

– *длина:* от – 70 % до + 100 %;

– *внутренний диаметр:* $\pm 50\%$.

Температура колонки: $\pm 10\%$.

Температурная программа: допускается корректирование температуры, как указано выше; допускается регулирование скоростей подъёма температуры и времён выдержки на изотермическом участке в пределах $\pm 20\%$.

Скорость потока: $\pm 50\%$.

Приведённые выше изменения применимы при условии, что требования к пригодности системы выполнены, а селективность и эквивалентность порядка элюирования контролируемых специфицированных примесей подтверждены.

Объём вводимой пробы и деление потока: могут быть изменены при условии, что критерии пригодности системы остаются в установленных

пределах приемлемости. При уменьшении объёма вводимой пробы или увеличении деления потока особое внимание необходимо уделять пределу обнаружения и повторяемости сигнала(ов) определяемого(ых) пика(ов). Допускается увеличение объёма вводимой пробы или уменьшение деления потока при условии, что, в частности, линейность и разрешение определяемого(ых) пика(ов) остаются удовлетворительными.

Температура блока ввода и температура линии подачи образца в условиях статистической парофазной системы ввода: $\pm 10^\circ\text{C}$ при условии, что не происходит разложение или конденсация.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Следующие подходы к количественному определению могут быть использованы в общих фармакопейных статьях и фармакопейных статьях.

Метод внешнего стандарта

Использование калибровочной функции. Готовят несколько растворов сравнения с разными концентрациями стандартного образца анализируемого компонента в диапазоне, где был подтверждён линейный отклик; вводят заданный объём приготовленных растворов сравнения. Используя полученные хроматограммы растворов сравнения, строят калибровочную кривую, откладывая площади пика или высоты пика по оси ординат в зависимости от количества стандартного образца, откладываемого по оси абсцисс. Уравнение калибровочной функции обычно получают с помощью линейной регрессии. Затем готовят раствор испытуемого образца в соответствии с методикой, указанной в конкретной фармакопейной статье. Хроматографирование проводят при соблюдении тех же рабочих условий, что и при построении калибровочной функции. Измеряют площадь пика или высоту пика анализируемого компонента и считывают содержание компонента или рассчитывают его, используя калибровочную функцию.

Использование одноточечной калибровки. В соответствии с конкретной фармакопейной статьёй, как правило, готовят один из растворов сравнения с

концентрацией, находящейся в линейном диапазоне калибровочной функции, и раствор испытуемого образца с концентрацией, близкой по значению к концентрации раствора сравнения. Хроматографирование проводят при соблюдении заданных условий и определяют содержание анализируемого компонента, сравнивая полученные сигналы. При использовании данного метода все действия, такие как ввод пробы, должны выполняться при соблюдении постоянных условий.

Метод внутреннего стандарта

Использование калибровочной функции. В методе внутреннего стандарта в качестве внутреннего стандарта выбирают стабильный компонент, время удерживания которого близко по значению ко времени удерживания анализируемого компонента, и пик которого хорошо разделён со всеми остальными пиками на хроматограмме. Готовят несколько растворов сравнения с заданной концентрацией внутреннего стандарта и несколькими разными концентрациями стандартного образца анализируемого компонента. На основании хроматограмм, полученных при вводе заданного объёма отдельных растворов сравнения, рассчитывают отношения площадей или высот пиков стандартного образца к площади пика или высоте пика внутреннего стандарта. Строят калибровочную кривую, откладывая значения этих отношений по оси ординат в зависимости от количества стандартного образца (или отношения количеств стандартного образца к количеству внутреннего стандарта), откладываемого по оси абсцисс. Калибровочную функцию обычно получают с помощью линейной регрессии. Затем в соответствии с методикой, указанной в конкретной фармакопейной статье, готовят раствор испытуемого образца, содержащий такое же количество внутреннего стандарта, что и растворы сравнения, используемые для построения калибровочной функции. Хроматографирование проводят при соблюдении тех же рабочих условий, что и при построении калибровочной кривой. Рассчитывают отношения площадей или высот пиков стандартного

образца к таковым для внутреннего стандарта и считывают содержание компонента или рассчитывают его, используя калибровочную функцию.

Использование одноточечной калибровки. В соответствии с конкретной фармакопейной статьёй, как правило, готовят один из растворов сравнения с концентрацией, находящейся в линейном диапазоне калибровочной функции, и раствор испытуемого образца с концентрацией, близкой по значению к концентрации раствора сравнения (оба раствора содержат заданное количество внутреннего стандарта). Хроматографирование проводят при соблюдении заданных условий и определяют содержание анализируемого компонента, сравнивая полученные отношения.

Метод нормализации

При условии, что линейность пиков доказана, в конкретных фармакопейных статьях может быть указано, что содержание компонента испытуемого образца в процентах рассчитывают путём определения процентной доли площади соответствующего пика от суммы площадей всех пиков в процентах, за исключением пиков растворителей или реактивов, или пиков, обусловленных компонентами подвижной фазы или матрицы испытуемого образца, а также пиков веществ с площадью, равной или меньшей порога информирования.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ

Сигнал детектора

Чувствительность детектора представляет собой выходной сигнал на единицу концентрации или единицу массы вещества в подвижной фазе, попадающей в детектор. Относительный коэффициент чувствительности детектора, называемый обычно коэффициентом чувствительности, выражает чувствительность детектора к данному веществу относительно стандартного образца. Поправочный коэффициент представляет собой обратный коэффициент чувствительности. В испытаниях на родственные примеси применяют все поправочные коэффициенты, указанные в фармакопейной

статье (т. е. когда коэффициент чувствительности выходит за пределы диапазона 0,8–1,2).

Интерферирующие пики

Пики, обусловленные растворителями и реактивами, а также пики, возникающие из-за подвижной фазы или матрицы испытуемого образца, не учитывают.

Измерение пиков

Интегрирование площади пика любой примеси, пик которой не полностью отделён от основного пика, обычно выполняют методом тангенциального сканирования (Рисунок 9).

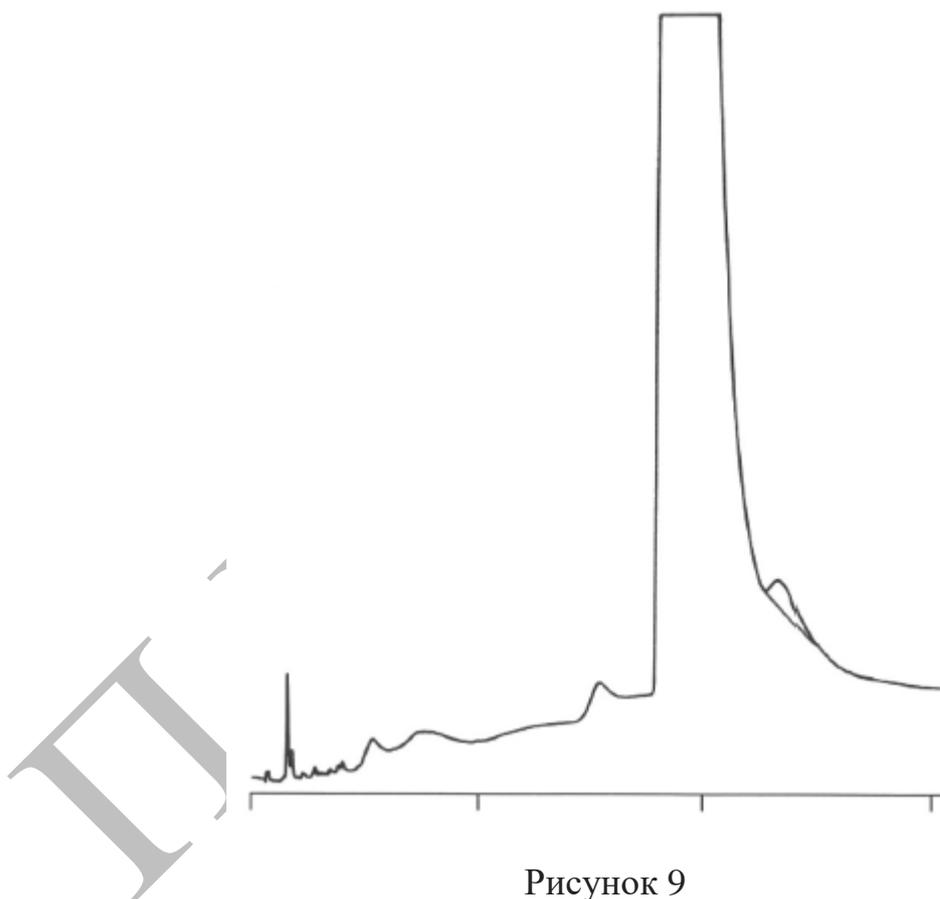


Рисунок 9

Порог информирования

Если в испытании на родственные примеси установлен предел для суммы примесей или для количественного определения одной примеси, важно выбрать соответствующий порог информирования и подходящие условия для интегрирования площадей пиков.

В таких испытаниях порог информирования, т. е. предел, при превышении которого пик учитывается, как правило, составляет 0,05 %.

ПРОЕКТ